



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

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

(11)



1-0036506

(51)⁷ A61K 9/08; A61K 47/00; A61K 47/18; (13) B
A61K 47/28; A61K 39/395; A61K 47/12

(21) 1-2019-01408

(22) 30/08/2017

(86) PCT/US2017/049415 30/08/2017

(87) WO 2018/045054 08/03/2018

(30) 62/382,156 31/08/2016 US

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/07/2019 376A

(73) OMEROS CORPORATION (US)

201 Elliott Avenue West, Seattle, WA 98119, United States of America

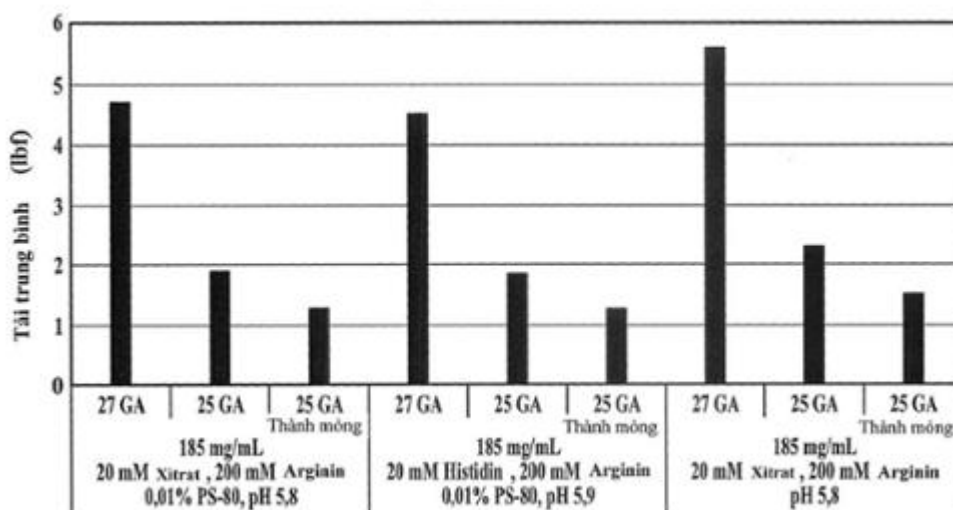
(72) DEMOPULOS, Gregory, A. (US); FERGUSON, Kenneth, M. (US); LAMBERT, William, Joseph (US); WHITAKER, John, Steven (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ ỨC CHẾ MASP-2 CÓ ĐỘ NHỚT THẤP, CÔ ĐẶC VÀ KIT CHỨA DƯỢC PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm có độ nhớt thấp, nồng độ cao, ổn định chứa kháng thể ức chế MASP-2, kit chứa dược phẩm này và dược phẩm và kit để dùng trong phương pháp điều trị để ức chế các tác dụng phụ của sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2.

Khả năng dùng bơm tiêm: Tải trung bình



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến được phẩm có độ nhớt thấp, nồng độ cao, ổn định chứa kháng thể ức chế MASP-2, kit chứa được phẩm này và được phẩm và kit để dùng trong phương pháp điều trị để ức chế các tác dụng phụ của sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2.

Sự trình bày liên quan đến danh mục trình tự

Danh mục trình tự liên quan đến đơn này được cung cấp ở dạng văn bản thay vì bản sao bằng giấy và được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Tên của tài liệu bằng văn bản chứa danh mục trình tự này là MP_1_0261_PCT_SequenceListing_20170809_ST25. Tài liệu bằng văn bản là 17 KB; được tạo ra vào ngày 9 tháng 8 năm 2017; và được nộp qua EFS-Web cùng với việc nộp bản mô tả.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Liệu pháp dựa vào kháng thể thường được sử dụng một cách thường xuyên và thường yêu cầu liều vài mg/kg bằng cách tiêm. Dạng phân phối được ưu tiên để điều trị tình trạng bệnh mạn tính là dùng kháng thể đơn dòng liều cao cho bệnh nhân ngoại trú (vài mg mỗi kg) thông qua tiêm dưới da (subcutaneous - SC) (Stockwin và Holmes, *Expert Opin Biol Ther* 3:1133-1152 (2003); Shire et al., *J Pharm Sci* 93:1390-1402 (2004)). Cần có được phẩm chứa kháng thể điều trị rất cô đặc vì chúng cho phép việc dùng thể tích ít hơn và/hoặc việc dùng ít hơn do đó ít gây khó chịu hơn cho bệnh nhân. Ngoài ra, thể tích ít hơn cho phép việc đóng gói các liều điều trị của kháng thể đơn dòng ở liều đơn riêng rẽ, ống tiêm được nạp sẵn để tự dùng. Việc phân phối SC nhờ ống tiêm được nạp sẵn hoặc kỹ thuật tiêm tự động cho phép dùng ở nhà và sự tuân thủ việc dùng thuốc của bệnh nhân được cải thiện.

Tuy nhiên, sự phát triển của chế phẩm có nồng độ protein cao có thách thức liên quan đến độ ổn định vật lý và hóa học của protein, cũng như khó khăn trong sản xuất, bảo quản và phân phối chế phẩm chứa protein (xem ví dụ, Wang et al., *J of Pharm Sci* vol 96(1):1-26, (2007)). Thách thức trong việc phát triển chế phẩm có nồng

độ protein cao là độ nhớt dung dịch phụ thuộc nồng độ. Ở nồng độ protein nhất định, độ nhớt thay đổi đột ngột dưới dạng hàm của chế phẩm. Cụ thể, kháng thể đơn dòng được biết là có profin nồng độ độ nhớt riêng biệt và khác nhau mà cho thấy độ nhớt của dung dịch tăng theo hàm mũ nhanh chóng khi tăng nồng độ kháng thể đơn dòng (xem ví dụ, Connolly B.D. et al., *Biophysical Journal* vol 103:69-78, (2012)). Một thách thức khác đối với chế phẩm lỏng ở nồng độ kháng thể đơn dòng cao là độ ổn định vật lý protein (Alford et al., *J. Pharm Sci* 97:3005-3021 (2008); Salinas et al., *J Pharm Sci* 99:82-93 (2010); Sukumar et al., *Pharm Res* 21:1087-1093 (2004)). Do đó, độ nhớt cao của dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng ở nồng độ cao cùng với tiềm năng làm cho độ ổn định giảm có thể cản trở việc phát triển của chúng thành dạng sản phẩm thích hợp để phân phối dưới da và/hoặc trong tĩnh mạch.

Hệ bổ thể giữ vai trò trong quá trình đáp ứng viêm và trở nên hoạt hóa như là kết quả của sự tổn thương mô hoặc lây nhiễm vi sinh vật. Sự hoạt hóa bổ thể phải được điều hòa chặt chẽ để đảm bảo sự hướng đích chọn lọc vi sinh vật xâm lấn và tránh tổn thương tự gây ra (Ricklin et al., *Nat. Immunol.* 11:785-797, 2010). Hiện nay, được chấp nhận rộng rãi rằng hệ bổ thể có thể được hoạt hóa qua ba con đường riêng biệt: con đường cổ điển, con đường lectin và con đường thay thế. Con đường cổ điển thường được kích hoạt bằng phức chất được cấu thành từ kháng thể của vật chủ gắn với hạt ngoại lai (*tức là*, kháng nguyên) và thường yêu cầu phơi nhiễm trước với kháng nguyên để sinh ra đáp ứng kháng thể đặc hiệu. Vì sự hoạt hóa của con đường cổ điển tùy thuộc vào sự đáp ứng miễn dịch thích ứng trước bởi vật chủ, nên con đường cổ điển là một phần của hệ miễn dịch mắc phải. Ngược lại, cả con đường lectin và con đường thay thế độc lập với sự miễn dịch thích ứng và là một phần của hệ miễn dịch bẩm sinh.

Serin proteaza-2 liên kết với lectin gắn manan (MASP-2) thể hiện là cần cho chức năng của con đường lectin, một trong các con đường hoạt hóa bổ thể chủ yếu (Vorup-Jensen et al., *J. Immunol* 165:2093-2100, 2000; Ambrus et al., *J Immunol.* 170:1374-1382, 2003; Schwaebler et al., *PNAS* 108:7523-7528, 2011). Quan trọng là, sự ức chế MASP-2 không xuất hiện để cản trở con đường hoạt hóa bổ thể cổ điển phụ thuộc kháng thể, mà là thành phần quyết định của đáp ứng miễn dịch mắc phải đối với sự lây nhiễm. Như được mô tả trong patent Mỹ số 9,011,860 (được chuyển nhượng cho Omeros corporation), được đưa vào phần mô tả bằng cách viện dẫn, OMS646,

kháng thể đơn dòng đầy đủ của người hướng đích MASP-2 ở người được sinh ra mà gắn với MASP-2 ở người có ái lực cao và phong bế hoạt tính của bổ thể trong con đường lectin và do đó hữu ích để điều trị nhiều bệnh và rối loạn liên quan đến con đường bổ thể lectin.

Như được mô tả thêm trong patent Mỹ số 7,919,094, patent Mỹ số 8,840,893, patent Mỹ số 8,652,477, patent Mỹ số 8,951,522, patent Mỹ số 9,011,860; patent Mỹ số 9,644,035, các công bố đơn sáng chế Mỹ số US2013/0344073, US2013/0266560, US 2015/0166675; US2017/0189525; và chuỗi đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Mỹ cùng chờ xử lý số 15/476,154, 15/347,434, 15/470,647, 62/315,857, 62/275,025 và 62/527,926 (từng đơn này được chuyển nhượng cho Omeros Corporation, bên nhận chuyển nhượng đơn cùng lúc, từng đơn được đưa vào phần mô tả này bằng cách viện dẫn), sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2 được chỉ ra là góp phần vào sự phát sinh bệnh của nhiều tình trạng bệnh mạn tính và cấp tính. Do đó, cần có chế phẩm chứa kháng thể đơn dòng MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao, ổn định thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, dưới da), để điều trị cho đối tượng mắc các bệnh và rối loạn liên quan đến con đường bổ thể MASP-2.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất được phẩm ổn định thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa cho đối tượng là động vật có vú, chứa: (a) dung dịch nước chứa hệ đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0; và (b) kháng thể đơn dòng hoặc mảnh của kháng thể này gắn đặc hiệu với MASP-2 ở người có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 50 mg/mL đến khoảng 250 mg/mL, trong đó kháng thể hoặc mảnh của kháng thể này chứa (i) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 của SEQ ID NO:2 và (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 của SEQ ID NO:3, hoặc biến thể của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có độ đồng nhất ít nhất 95% với SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có độ đồng nhất ít nhất bằng 95% với SEQ ID NO:3; trong đó chế phẩm này có độ nhớt nằm trong khoảng từ 2 đến 50 centipoise (cP), và trong đó chế phẩm này là ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất một tháng. Theo một số phương án, nồng độ của kháng thể trong chế phẩm này nằm trong khoảng từ khoảng 150 mg/mL đến khoảng 200 mg/mL. Theo một số phương án, độ nhớt của chế

phẩm này nhỏ hơn 25 cP. Theo một số phương án, hệ đệm chứa histidin. Theo một số phương án, hệ đệm chứa xitrat. Theo một số phương án, chế phẩm còn chứa tá dược, như chất biến đổi độ trương ở lượng đủ để chế phẩm này là ưu trương. Theo một số phương án, chế phẩm còn chứa chất hoạt động bề mặt. Theo một số phương án, chế phẩm còn chứa enzym hyaluronidaza ở lượng hữu hiệu để làm tăng sự phân tán và/hoặc hấp thụ của kháng thể sau khi dùng dưới da.

Theo khía cạnh khác, chế phẩm được chứa trong thiết bị dùng dưới da, như ống tiêm được nạp sẵn.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit bao gồm vật chứa được nạp sẵn chứa chế phẩm.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm để sử dụng trong điều trị cho bệnh nhân mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc tình trạng bệnh phụ thuộc MASP-2, trong đó được phẩm này là vô trùng, dạng liều dùng một lần chứa từ khoảng 350 mg đến khoảng 400 mg (tức là, 350 mg, 360 mg, 370 mg, 380 mg, 390 mg, hoặc 400 mg) kháng thể ức chế MASP-2, trong đó được phẩm chứa từ khoảng 1,8 mL đến khoảng 2,2 mL (tức là, 1,8 mL, 1,9 mL, 2,0 mL, 2,1 mL hoặc 2,2 mL) chế phẩm chứa kháng thể 185 mg/mL, như được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó kháng thể hoặc mảnh của kháng thể này chứa (i) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 và (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:3; và trong đó chế phẩm này là ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất sáu tháng. Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh phụ thuộc MASP-2 được chọn từ nhóm bao gồm aHUS, HSCT-TMA, IgAN và luput viêm thận (lupus nephritis - LN).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn phải điều trị bằng kháng thể ức chế MASP-2 bao gồm việc dùng chế phẩm chứa kháng thể MASP-2, như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các khía cạnh nêu trên và nhiều ưu điểm có trong sáng chế này sẽ được đánh giá rõ ràng hơn vì chúng trở nên được hiểu rõ hơn bằng cách tham khảo đến phần mô tả chi tiết dưới đây, khi kết hợp với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1A minh họa dưới dạng biểu đồ lượng lắng đọng phức chất tấn công màng phụ thuộc con đường lectin (membrane attack complex - MAC) trong sự có mặt lượng kháng thể đơn dòng MASP-2 ở người (OMS646) khác nhau, chứng minh rằng OMS646 ức chế sự lắng đọng MAC được trung gian bởi con đường lectin có giá trị IC_{50} xấp xỉ 1 nM, như được mô tả trong ví dụ 1;

Fig.1B minh họa dưới dạng biểu đồ lượng lắng đọng MAC phụ thuộc con đường cổ điển trong sự có mặt lượng kháng thể đơn dòng MASP-2 ở người (OMS646) khác nhau, chứng minh rằng OMS646 không ức chế sự lắng đọng MAC được trung gian bởi con đường cổ điển, như được mô tả trong ví dụ 1;

Fig.1C minh họa dưới dạng biểu đồ lượng lắng đọng MAC phụ thuộc con đường thay thế khi có mặt kháng thể đơn dòng MASP-2 ở người (OMS646), chứng minh rằng OMS646 không ức chế sự lắng đọng MAC được trung gian bởi con đường thay thế, như được mô tả trong ví dụ 1;

Fig.2A minh họa dưới dạng biểu đồ các kết quả phân tích sự tán xạ ánh sáng động (dynamic light scattering - DLS) đối với việc sàng lọc tá dược trong chế phẩm OMS646, thể hiện đường kính hạt tổng thể quan sát được đối với chế phẩm chứa các tá dược đề xuất khác nhau, như được mô tả trong ví dụ 2;

Fig.2B minh họa dưới dạng biểu đồ các kết quả phân tích DLS đối với việc sàng lọc tá dược trong chế phẩm OMS646, thể hiện sự đa phân tán tổng thể quan sát được đối với chế phẩm chứa các tá dược đề xuất khác nhau, như được mô tả trong ví dụ 2;

Fig.3 minh họa dưới dạng biểu đồ các kết quả phân tích độ nhớt nằm trong khoảng nồng độ OMS646 trong các chế phẩm khác nhau như được đo ở độ pH bằng 5,0 và pH 6,0, như được mô tả trong ví dụ 2;

Fig.4 minh họa dưới dạng biểu đồ phần trăm protein thu hồi sau khi trao đổi đệm để nghiên cứu độ tan/độ nhớt OMS646 bằng các chế phẩm đề xuất khác nhau, như được mô tả trong ví dụ 2;

Fig.5 minh họa dưới dạng biểu đồ độ nhớt (như được xác định bằng cách lắp vào hàm mũ của số liệu độ nhớt) với nồng độ protein để nghiên cứu độ tan/độ nhớt OMS646 bằng các chế phẩm đề xuất khác nhau, như được mô tả trong ví dụ 2;

Fig.6 minh họa dưới dạng biểu đồ số liệu nồng độ protein-độ nhớt được bình thường hóa để nghiên cứu độ nhớt bằng các chế phẩm chứa OMS646 đề xuất khác nhau, như được mô tả trong ví dụ 2;

Fig.7A minh họa dưới dạng biểu đồ tải trung bình (lbf) của ba chế phẩm OMS646 đề xuất trong nghiên cứu khả năng bơm tiêm bằng cách sử dụng các kim tiêm 27 GA (1,25”), 25GA (1”) và 25GA thành mỏng (1”) như được mô tả trong ví dụ 3; và

Fig.7B minh họa dưới dạng biểu đồ tải tối đa (lbf) của ba chế phẩm OMS646 đề xuất trong nghiên cứu khả năng bơm tiêm bằng cách sử dụng các kim tiêm 27 GA (1,25”), 25GA (1”) và 25GA thành mỏng (1”) như được mô tả trong ví dụ 3.

Mô tả danh mục trình tự

SEQ ID NO:1: protein MASP-2 ở người (trưởng thành)

SEQ ID NO:2: polypeptit chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của OMS646

SEQ ID NO:3: polypeptit chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của OMS646

SEQ ID NO:4: polypeptit có chiều dài đầy đủ chứa chuỗi nặng đột biến IgG4 trong chuỗi nặng của OMS646

SEQ ID NO:5: polypeptit có chiều dài đầy đủ chứa chuỗi nhẹ OMS646

SEQ ID NO:6: ADN mã hóa polypeptit chứa chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của OMS646

SEQ ID NO:7: ADN mã hóa polypeptit chứa chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của OMS646.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Định nghĩa

Trừ khi được định nghĩa cụ thể trong bản mô tả này, tất cả các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Các định nghĩa dưới đây được cung cấp để làm rõ các thuật ngữ khi chúng được sử dụng trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ để mô tả sáng chế.

Các kỹ thuật chuẩn có thể được sử dụng cho ADN tái tổ hợp, tổng hợp oligonucleotit, và nuôi cấy mô và biến nạp (ví dụ, phương pháp xung điện, chuyển gen bằng liposom). Các phản ứng bằng enzym và các kỹ thuật tinh chế có thể được thực hiện theo thông số kỹ thuật của nhà sản xuất hoặc thường được thực hiện trong lĩnh vực kỹ thuật hoặc như được mô tả trong bản mô tả này. Các kỹ thuật và quy trình này và kỹ thuật và quy trình có liên quan thường có thể được thực hiện theo các phương án thông thường đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và như được mô tả trong các tài liệu tham khảo chung và các tài liệu tham khảo cụ thể hơn được trích dẫn và được thảo luận xuyên suốt bản mô tả này. Xem ví dụ, Sambrook *et al.*, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Current Protocols in Immunology (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); hoặc các công bố về quy trình hiện nay có liên quan và các tài liệu tham khảo tương tự khác. Trừ khi các định nghĩa cụ thể được cung cấp, danh pháp được sử dụng liên quan đến sinh học phân tử, hóa phân tích, hóa hữu cơ tổng hợp, và hóa dược và hóa dược phẩm và các quy trình và các kỹ thuật phòng thí nghiệm của các lĩnh vực trên được mô tả trong bản mô tả này là các định nghĩa đã được biết đến và được sử dụng phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật. Các kỹ thuật chuẩn có thể được sử dụng cho công nghệ tái tổ hợp, sinh học phân tử, vi sinh, tổng hợp hóa chất, phân tích hóa chất, điều chế, bào chế dược phẩm, và phân phối và điều trị cho bệnh nhân.

Thuật ngữ “dược phẩm” chỉ dạng điều chế mà ở dạng này cho phép hoạt tính sinh học của chất có hoạt tính (ví dụ, kháng thể ức chế MASP-2) là hiệu quả để điều trị và không chứa các thành phần bổ sung là độc không thể chấp nhận được cho đối tượng dùng dược phẩm. Các dược phẩm này là vô trùng. Theo một phương án, dược phẩm này thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa, như dùng dưới da.

Thuật ngữ “MASP-2” chỉ serin proteaza-2 liên kết với lectin gắn manan. Protein MASP-2 ở người (trưởng thành) được nêu trong SEQ ID NO:1.

Thuật ngữ "sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2" gồm sự hoạt hóa con đường lectin phụ thuộc MASP-2, xảy ra dưới điều kiện sinh lý (tức là, khi có mặt

Ca^{++}) dẫn đến sự hình thành của C3 convertaza C4b2a trong con đường lectin và sự tích tụ sản phẩm phân cắt C3 là C3b sau đó đến C5 convertaza C4b2a(C3b)_n.

Thuật ngữ "con đường lectin" chỉ sự hoạt hóa bổ thể mà xảy ra thông qua sự gắn đặc hiệu của protein gắn hydrat cacbon không chứa huyết thanh và chứa huyết thanh bao gồm lectin gắn manan (MBL), CL-11 và các ficolin (H-ficolin, M-ficolin, hoặc L-ficolin).

Thuật ngữ "con đường cổ điển" chỉ sự hoạt hóa bổ thể được kích hoạt bởi kháng thể gắn với hạt ngoại lai và yêu cầu sự gắn của phân tử nhận diện C1q.

Thuật ngữ "kháng thể ức chế MASP-2" chỉ kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, mà gắn với MASP2 và ức chế hiệu quả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2 (ví dụ, OMS646). Kháng thể ức chế MASP-2 hữu ích trong phương pháp theo sáng chế có thể làm giảm sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2 đến lớn hơn 20%, như lớn hơn 30%, hoặc lớn hơn 40%, hoặc lớn hơn 50%, hoặc lớn hơn 60%, hoặc lớn hơn 70%, hoặc lớn hơn 80%, hoặc lớn hơn 90% hoặc lớn hơn 95%.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng OMS646" chỉ kháng thể đơn dòng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 của trình tự axit amin trong vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:2 và chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 của trình tự axit amin trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:3. Kháng thể cụ thể này là ví dụ của kháng thể ức chế MASP-2 mà gắn đặc hiệu với MASP-2 và ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2.

"Kháng thể đơn dòng" chỉ quần thể kháng thể đồng nhất trong đó kháng thể đơn dòng này được cấu thành bởi các axit amin (tồn tại trong tự nhiên và không tồn tại trong tự nhiên) mà liên quan đến sự gắn chọn lọc của epitop. Kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao đối với kháng nguyên đích. Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" không chỉ bao gồm các kháng thể đơn dòng nguyên vẹn và các kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ, mà còn bao gồm các mảnh của chúng (như Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), chuỗi đơn (scFv), biến thể của chúng, protein dung hợp chứa phần gắn kháng nguyên, kháng thể đơn dòng được làm giống người, kháng thể đơn dòng khảm và bất kỳ cấu hình được cải biến khác của phân tử globulin miễn dịch mà chứa mảnh gắn kháng nguyên (vị trí nhận diện epitop) có tính đặc hiệu được yêu cầu và khả năng để gắn với epitop. Không được dự định bị giới hạn liên quan đến nguồn của kháng thể hoặc cách

mà kháng thể được tạo ra (ví dụ, bằng cách lai tế bào, chọn lọc thể thực khuẩn, sự biểu hiện tái tổ hợp, động vật chuyển gen, v.v.). Thuật ngữ này bao gồm toàn bộ globulin miễn dịch cũng như các mảnh v.v. được mô tả ở trên dưới định nghĩa "kháng thể".

Thuật ngữ "mảnh kháng thể" chỉ một phần thu được từ hoặc liên quan đến kháng thể có chiều dài đầy đủ, như, ví dụ, kháng thể ức chế MASP-2, thường chứa vùng gắn kháng nguyên hoặc vùng biến đổi kháng nguyên của nó. Các ví dụ minh họa về các mảnh kháng thể bao gồm các mảnh Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ và Fv, các mảnh scFv, kháng thể thể đôi, kháng thể thẳng, phân tử kháng thể chuỗi đơn và kháng thể đa hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, mảnh kháng thể "Fv chuỗi đơn" hoặc mảnh kháng thể "scFv" chứa các miền V_H và V_L của kháng thể, trong đó các miền này có mặt trong chuỗi polypeptit đơn. Thông thường, polypeptit Fv còn chứa nhóm liên kết polypeptit giữa các miền V_H và V_L, mà cho phép scFv tạo ra cấu trúc mong muốn để gắn kháng nguyên.

Thuật ngữ "vùng CDR" hoặc "CDR" được dự định để chỉ vùng siêu biến của chuỗi nặng và nhẹ của globulin miễn dịch như được xác định bởi Kabat et al., 1991 (Kabat, E. A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, tái bản lần thứ 5 và các lần tái bản sau đó. Một kháng thể thường chứa 3 chuỗi nặng CDR và 3 chuỗi nhẹ CDR. Thuật ngữ CDR hoặc các CDR được sử dụng ở đây để chỉ, trong trường hợp này, một trong số các vùng, hoặc nhiều, hoặc thậm chí toàn bộ các vùng mà chứa phần lớn các gốc axit amin chịu trách nhiệm gắn bằng ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên của epitop mà nó nhận diện.

Thuật ngữ "sự gắn đặc hiệu" chỉ khả năng của kháng thể để ưu tiên gắn vào chất phân tích cụ thể mà có trong hỗn hợp đồng nhất của các chất phân tích khác nhau. Theo các phương án nhất định, sự tương tác gắn đặc hiệu sẽ phân biệt các chất phân tích mong muốn và các chất phân tích không mong muốn trong mẫu, theo một số phương án, cao hơn khoảng 10 đến 100 lần hoặc cao hơn (ví dụ, cao hơn khoảng 1000 lần hoặc 10.000 lần). Theo các phương án nhất định, ái lực giữa chất bắt giữ và chất phân tích khi chúng được gắn đặc hiệu trong phức hợp chất bắt giữ/chất phân tích được đặc trưng bởi K_D (hằng số phân ly) nhỏ hơn khoảng 100 nM, hoặc nhỏ hơn

khoảng 50 nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 25 nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 10 nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 5 nM hoặc nhỏ hơn khoảng 1 nM.

Thuật ngữ "kháng thể được phân tách" chỉ kháng thể được xác định và được tách và/hoặc được thu hồi và/hoặc được tinh chế từ thành phần của môi trường tự nhiên của nó hoặc hệ thống biểu hiện nuôi cấy tế bào. Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể sẽ được tinh chế (1) đến lớn hơn 95% khối lượng của kháng thể và tốt hơn nhất là lớn hơn 99% khối lượng; như được xác định bằng phương pháp thích hợp để đo nồng độ protein, như, ví dụ, phương pháp Lowry, hoặc độ hấp thụ ở OD280, (2) đến mức độ đủ để thu được ít nhất 15 gốc của trình tự axit amin đầu tận cùng N hoặc trình tự axit amin bên trong bằng cách sử dụng bộ giải trình tự cốc quay; hoặc (3) đến độ đồng nhất bởi SDS-PAGE ở điều kiện khử hoặc không khử bằng cách sử dụng xanh Coomassie hoặc, tốt hơn là, chất nhuộm bạc. Thông thường, kháng thể được phân tách để sử dụng trong chế phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này sẽ được chuẩn bị bởi ít nhất một bước tinh chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các gốc axit amin được viết tắt như sau: alanin (Ala;A), asparagin (Asn;N), axit aspartic (Asp;D), arginin (Arg;R), xystein (Cys;C), axit glutamic (Glu;E), glutamin (Gln;Q), glyxin (Gly;G), histidin (Hush), isoleuxin (Iliia), leuxin (Lull), lysin (Lys;K), methionin (Met;M), phenylalanin (Phe;F), prolin (Pro;P), serin (Ser;S), threonin (Thr;T), tryptophan (Trp;W), tyrosin (Tyr;Y) và valin (Val;V).

Theo nghĩa rộng nhất, axit amin tồn tại trong tự nhiên có thể được chia thành các nhóm dựa trên đặc tính hóa học của chuỗi bên của các axit amin tương ứng. Axit amin "kỵ nước" là Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys hoặc Pro. Axit amin "ưa nước" là Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg hoặc His. Sự tạo nhóm của axit amin có thể còn được phân nhóm phụ như sau. Axit amin "ưa nước không tích điện" là Ser, Thr, Asn hoặc Gln. Axit amin "có tính axit" là Glu hoặc Asp. Axit amin "có tính bazơ" là Lys, Arg hoặc His.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "sự thay thế axit amin bảo toàn" được minh họa bởi sự thay thế giữa các axit amin trong từng nhóm sau đây: (1) glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin, (2) phenylalanin, tyrosin và tryptophan, (3) serin và threonin, (4) aspartat và glutamat, (5) glutamin và asparagin, và (6) lysin,

arginin và histidin.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "đối tượng" bao gồm tất cả động vật có vú, bao gồm mà không giới hạn, người, linh trưởng không phải người, chó, mèo, ngựa, cừu, dê, bò sữa, thỏ, lợn và động vật gặm nhấm.

Thuật ngữ "dược dụng" liên quan đến tá dược trong dược phẩm nghĩa là tá dược thích hợp dùng cho đối tượng là người.

Thuật ngữ "dùng dưới da" chỉ việc dùng chế phẩm dưới tất cả các lớp da của đối tượng.

Thuật ngữ "đệm" chỉ dung dịch đệm mà chống lại sự thay đổi độ pH bằng hoạt động của các thành phần liên hợp axit-bazơ. Đệm theo sáng chế có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 4 đến khoảng 8; tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 5 đến khoảng 7; và tốt hơn nhất là có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,5. Ví dụ về đệm mà sẽ kiểm soát độ pH trong khoảng này bao gồm axetat (ví dụ, natri axetat), suxinat (như natri suxinat), gluconat, histidin, xitrat và các đệm axit hữu cơ khác. "Chất đệm" là hợp chất được sử dụng để tạo ra dung dịch đệm.

Thuật ngữ "histidin" cụ thể bao gồm L-histidin trừ khi được nêu khác.

Thuật ngữ "đẳng trương" chỉ chế phẩm mà có áp suất thẩm thấu cơ bản giống như ở máu người. Chế phẩm đẳng trương thường sẽ có áp suất thẩm thấu nằm trong khoảng từ khoảng 250 đến khoảng 350 mOsm/KgH₂O. Độ đẳng trương có thể được đo bằng cách sử dụng ví dụ, áp suất hơi nước hoặc thẩm thấu kế đo sự hạ điểm đông lạnh.

Thuật ngữ "ưu trương" chỉ chế phẩm có áp suất thẩm thấu cao hơn áp suất thẩm thấu của người (tức là, lớn hơn 350 mOsm/KgH₂O).

Thuật ngữ "chất biến đổi độ trương" chỉ chất được dụng thích hợp để tạo ra chế phẩm đẳng trương, hoặc theo một số phương án, chế phẩm ưu trương.

Thuật ngữ "khử trùng" chỉ sản phẩm dược vô trùng hoặc không có vi khuẩn, nấm hoặc vi sinh vật sống khác, có thể đạt được bằng các cách thích hợp bất kỳ, như, ví dụ, chế phẩm được xử lý vô trùng và được nạp, hoặc được lọc qua màng lọc khử trùng, trước khi, hoặc sau khi, điều chế chế phẩm và nạp.

Thuật ngữ “chế phẩm ổn định” chỉ sự duy trì độ tinh khiết ban đầu của chế phẩm qua thời gian. Nói cách khác, nếu chế phẩm có độ tinh khiết ít nhất là 95%, như độ tinh khiết ít nhất là 96%, độ tinh khiết ít nhất là 97%, độ tinh khiết ít nhất là 98% hoặc độ tinh khiết ít nhất là 99% so với các loại kháng thể nhất định (ví dụ, kháng thể ức chế MASP-2) ở thời điểm 0, thì độ ổn định là phép đo chế phẩm về cơ bản giữ lại độ tinh khiết này tốt như thế nào và trong bao lâu (ví dụ, mà không tạo thành các loại khác, như các phần bị phân mảnh (LMW) hoặc sự kết tụ các loại tinh khiết (HMW)). Chế phẩm là ổn định nếu độ tinh khiết về cơ bản là không giảm khi được bảo quản ở nhiệt độ xấp xỉ từ 2°C đến 8°C trong thời gian nhất định, như ít nhất 6 tháng, ít nhất 9 tháng, ít nhất 12 tháng hoặc ít nhất 24 tháng. “Về cơ bản là không giảm”, nghĩa là độ tinh khiết của chế phẩm thay đổi ít hơn 5%, như ít hơn 4%, hoặc ít hơn 3%, hoặc ít hơn 2% hoặc ít hơn 1% mỗi khoảng thời gian (ví dụ, trên 6 tháng, trên 9 tháng hoặc trên 12 tháng hoặc trên 24 tháng). Theo một phương án, chế phẩm ổn định là ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian ít nhất sáu tháng. Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm ổn định là ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian ít nhất một năm hoặc trong thời gian ít nhất hai năm. Theo một phương án, chế phẩm này là ổn định nếu kháng thể ức chế MASP-2 còn lại ít nhất 95% monome khi bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất một tháng hoặc trong ít nhất sáu tháng hoặc trong ít nhất 12 tháng, được xác định bởi SEC-HPLC.

Thuật ngữ "chất bảo quản" chỉ hợp chất có thể được chứa trong chế phẩm để về cơ bản làm giảm sự sinh trưởng và sự nhiễm vi khuẩn. Các ví dụ không giới hạn về các chất bảo quản tiềm năng bao gồm octadexyldimetylbenzyl amoni clorua, hexametoni clorua, benzalkoni clorua (hỗn hợp của các alkylbenzyldimetylamoni clorua trong đó các nhóm alkyl là các hợp chất chuỗi dài) và benzetoni clorua. Các loại chất bảo quản khác bao gồm rượu thơm như rượu phenolic, butylic và benzylic, alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben, catechol, resorcinol, xyclohexanol, 3-pentanol và m-cresol.

Thuật ngữ “tá dược” chỉ chất trợ trong chế phẩm mà truyền tính chất vật lý có lợi cho chế phẩm như độ ổn định protein tăng và/hoặc độ nhớt giảm. Ví dụ về các tá dược thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, protein (ví dụ, albumin trong huyết thanh), axit amin (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic, lysin arginin, glyxin và

histidin), sacarit (ví dụ, glucoza, sucroza, maltoza và trehaloza), rượu polyhydric (ví dụ, manitol và sorbitol), axit béo và phospholipit (ví dụ, alkyl sulfonat và caprylat).

Thuật ngữ "về cơ bản không chứa" nghĩa là không có mặt chất đó hoặc chỉ lượng vết rất nhỏ của chất có mặt không có bất kỳ tác động đáng kể đến các đặc tính của chế phẩm. Nếu việc tham khảo được thực hiện đến lượng chất không có, nên được hiểu là "lượng không thể phát hiện được".

Thuật ngữ "độ nhớt" chỉ phép đo sự chống lại của chất lỏng bị biến dạng bởi ứng suất kéo hoặc ứng suất căng; có thể được đánh giá bằng cách sử dụng nhớt kế (ví dụ, nhớt kế kiểu thả bi) hoặc lưu biến kế. Trừ khi được chỉ ra khác, phép đo độ nhớt (centipoise, cP) ở nhiệt độ khoảng 25°C có tốc độ trượt nằm trong khoảng từ 100.000 đến 250.000 1/giây.

Thuật ngữ "dùng ngoài đường tiêu hóa" chỉ đường dùng khác đường ruột và bao gồm việc tiêm dạng liều vào cơ thể bằng ống tiêm hoặc thiết bị cơ học khác như bơm truyền. Đường ngoài đường tiêu hóa có thể bao gồm đường dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da và trong màng bụng. Tiêm dưới da là đường dùng được ưu tiên.

Thuật ngữ "sự điều trị" chỉ sự điều trị bệnh và/hoặc phòng bệnh hoặc ngăn ngừa. Các đối tượng cần điều trị bao gồm các đối tượng mắc bệnh cũng như các đối tượng trong đó bệnh này cần ngăn ngừa. Do đó, bệnh nhân cần điều trị trong bản mô tả này có thể được chẩn đoán là mắc bệnh hoặc có thể có khuynh hướng hoặc dễ mắc bệnh.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" chỉ lượng chất mà cung cấp tác dụng mong muốn. Trong trường hợp của hoạt chất được, nó là lượng thành phần có hoạt tính hữu hiệu để điều trị bệnh ở bệnh nhân. Trong trường hợp thành phần của chế phẩm, ví dụ, enzym hyaluronidaza, lượng hữu hiệu là lượng cần thiết để làm tăng sự phân tán và hấp thụ của kháng thể ức chế MASP-2 cùng được dùng theo cách mà kháng thể ức chế MASP-2 có thể hoạt động theo cách hữu hiệu có tác dụng điều trị như được nêu ở trên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "khoảng" như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là để xác định rằng giá trị cụ thể được đề cập có thể thay

đổi ở mức nhất định, như thay đổi ở khoảng $\pm 10\%$, tốt hơn là $\pm 5\%$, tốt hơn nhất là $\pm 2\%$ được bao gồm trong giá trị nhất định. Ví dụ, cụm từ “dược phẩm chứa khoảng 200 mg/mL kháng thể ức chế MASP-2” được hiểu nghĩa là dược phẩm này có thể chứa kháng thể ức chế MASP-2 nằm trong khoảng từ 180 mg/mL đến 220 mg/mL (ví dụ, OMS646). Ở khoảng được nêu, điểm cuối được bao gồm trong khoảng này trừ khi được nêu khác đi hoặc nếu không thì là hiển nhiên từ nội dung của sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này dạng số ít của “một” bao gồm các khía cạnh số nhiều trừ khi nội dung của sáng chế rõ ràng chỉ ra khác. Do đó, ví dụ, sự viện dẫn đến “tá dược” bao gồm số nhiều của các tá dược này và tương đương của chúng được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, sự viện dẫn đến “chất” bao gồm một chất, cũng như hai hoặc nhiều chất; sự viện dẫn đến “kháng thể” bao gồm nhiều kháng thể và sự viện dẫn đến “vùng khung làm việc” bao gồm sự viện dẫn đến một hoặc nhiều vùng khung làm việc và tương đương của chúng được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và vân vân.

Từng phương án trong bản mô tả này được áp dụng một khi những thay đổi cần thiết đã được thực hiện đến mọi phương án khác trừ khi được nêu khác đi. Sáng chế bao gồm phương án bất kỳ được thảo luận trong bản mô tả này có thể được thực hiện liên quan đến phương pháp, kit, chất phản ứng, hoặc chế phẩm bất kỳ theo sáng chế và ngược lại. Hơn nữa, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để đạt được các phương pháp của sáng chế.

II. Khái quát sáng chế

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao, ổn định thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, dùng dưới da) và cũng thích hợp để pha loãng trước khi dùng trong tĩnh mạch. Dược phẩm rất cô đặc chứa kháng thể điều trị là mong muốn bởi vì chúng cho phép dùng thể tích thấp hơn và/hoặc dùng thể tích ít hơn, kết quả là ít gây khó chịu hơn cho bệnh nhân. Ngoài ra, thể tích thấp hơn cho phép đóng gói các liều điều trị của kháng thể ức chế MASP-2 ở liều đơn riêng rẽ, ống tiêm được nạp sẵn hoặc lọ nhỏ để tự dùng. Chế phẩm có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế chứa dung dịch nước chứa hệ đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0, tốt hơn nữa là có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0, và kháng thể đơn dòng ức chế MASP-2 (ví dụ, OMS646)

hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 50 mg/mL đến khoảng 250 mg/mL. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể ức chế MASP-2 (ví dụ, OMS646) có trong chế phẩm có nồng độ cao thích hợp để dùng dưới da có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 mg/mL đến khoảng 250 mg/mL. Theo các phương án cụ thể, kháng thể ức chế MASP-2 (ví dụ, OMS646) có trong chế phẩm có nồng độ cao có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 150 mg/mL đến khoảng 200 mg/mL, như nằm trong khoảng từ khoảng 175 mg/mL đến khoảng 195 mg/mL, như khoảng 185 mg/mL.

Theo các phương án khác nhau, ngoài kháng thể ức chế MASP-2 nồng độ cao và hệ đệm, dược phẩm còn chứa một hoặc nhiều tá dược, như chất biến đổi độ trương (ví dụ, axit amin có chuỗi bên tích điện), và tùy ý chất hoạt động bề mặt không ion. Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế này còn chứa enzym hyaluronidaza.

Ưu điểm đáng kể của dược phẩm rất cô đặc chứa kháng thể ức chế MASP-2 của sáng chế là độ nhớt thấp của chúng ở nồng độ protein cao. Được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, độ nhớt cao của dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng ở nồng độ ≥ 100 mg/mL có thể cản trở việc phát triển chúng làm sản phẩm thích hợp để phân phối dưới da và/hoặc trong tĩnh mạch. Do đó, dược phẩm có độ nhớt thấp hơn có thể rất được mong đợi bởi vì chúng dễ sản xuất, nhưng không bị giới hạn ở bước xử lý, lọc và nạp. Như được mô tả trong các ví dụ 2 và 3 trong bản mô tả này, chế phẩm theo sáng chế chứa từ 100 mg/mL đến 200 mg/mL kháng thể OMS646 ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp đáng ngạc nhiên, như độ nhớt nhỏ hơn khoảng 50 cP, như từ 2 cP đến 50 cP, như từ 2 cP đến 40 cP, như từ 2 cP đến 30 cP hoặc từ 2 cP đến 25 cP hoặc từ 2 cP đến 20 cP hoặc từ 2 cP đến 18 cP.

Ngoài ra, dược phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, rất cô đặc theo sáng chế cho phép dược phẩm này được dùng qua ống tiêm và kim tiêm, thiết bị tiêm tự động và thiết bị vi truyền đạt chuẩn được biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Như được mô tả trong ví dụ 3, dược phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao như được bộc lộ trong bản mô tả này được xác định để có khả năng bơm tiêm và khả năng tiêm thích hợp để dùng dưới da. Khả năng bơm tiêm và khả năng tiêm là các thông số biểu hiện sản phẩm chính của dược phẩm được dự định để

dùng ngoài đường tiêu hóa bất kỳ, ví dụ, trong cơ hoặc dưới da và cho phép dùng các dược phẩm này bằng cách tiêm trong cơ hoặc dưới da qua kim tiêm cỡ nhỏ thường được sử dụng để tiêm, như, ví dụ, kim tiêm 29GA thành đều hoặc thành mỏng, 27GA (1,25”) thành đều hoặc thành mỏng, hoặc 25GA (1”) thành đều hoặc thành mỏng. Trong một số trường hợp, dược phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp như được bộc lộ trong bản mô tả này cho phép dùng thể tích tiêm có thể chấp nhận được (ví dụ, 1-3 cc) trong khi phân phối lượng hữu hiệu của kháng thể OMS646 ức chế MASP-2 trong một lần tiêm duy nhất ở một vị trí tiêm.

Ưu điểm đáng kể khác của chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm có độ nhớt thấp, nồng độ cao chứa kháng thể ức chế MASP-2 (tức là, ≥ 100 mg/mL đến 200 mg/mL) là ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất 30 ngày, lên đến ít nhất 9 tháng, hoặc lên đến ít nhất 12 tháng hoặc lâu hơn, như được mô tả trong nghiên cứu độ ổn định trong ví dụ 2 và 4.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình điều chế chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao, vật chứa chứa chế phẩm này, kit điều trị chứa chế phẩm này; và các phương pháp điều trị sử dụng chế phẩm này, vật chứa và kit để điều trị cho đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2.

Kháng thể ức chế MASP-2

Như được mô tả chi tiết trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa kháng thể đơn dòng gắn đặc hiệu với MASP-2 và ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2 và mảnh gắn kháng nguyên của nó. Theo các phương án nhất định, kháng thể ức chế MASP-2 hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó để sử dụng trong chế phẩm được bảo hộ là kháng thể ức chế MASP-2 được gọi là “OMS646” như được mô tả trong WO2012/151481 (được đưa vào phần mô tả này bằng cách viện dẫn) mà chứa polypeptit chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:2 và polypeptit chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:3. Như được mô tả trong WO2012/151481 và được mô tả trong ví dụ 1, OMS646 gắn đặc hiệu với MASP-2 ở người có ái lực cao và có khả năng phong bế hoạt tính bổ thể của con đường lectin. Theo phương án nhất định, kháng thể ức chế MASP-2 hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó để sử dụng trong chế phẩm được bảo hộ là kháng thể ức chế MASP-2 chứa

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin từ 31-35 của SEQ ID NO:2, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin từ 50-65 của SEQ ID NO:2, và iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin từ 95-107 của SEQ ID NO:2; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa: i) CDR-L1 chứa trình tự axit amin từ 24-34 của SEQ ID NO:3, ii) CDR-L2 chứa trình tự axit amin từ 50-56 của SEQ ID NO:3, và iii) CDR-L3 chứa trình tự axit amin từ 89-97 của SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, kháng thể ức chế MASP-2 để sử dụng trong chế phẩm được bảo hộ chứa biến thể của OMS646 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có độ đồng nhất ít nhất 95% với SEQ ID NO:2 và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có độ đồng nhất ít nhất 95% với SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, kháng thể ức chế MASP-2 để sử dụng trong chế phẩm được bảo hộ chứa biến thể của OMS646 chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 95% với SEQ ID NO:2, trong đó gốc 31 là R, gốc 32 là G, gốc 33 là K, gốc 34 là M, gốc 35 là G, gốc 36 là V, gốc 37 là S, gốc 50 là L, gốc 51 là A, gốc 52 là H, gốc 53 là I, gốc 54 là F, gốc 55 là S, gốc 56 là S, gốc 57 là D, gốc 58 là E, gốc 59 là K, gốc 60 là S, gốc 61 là Y, gốc 62 là R, gốc 63 là T, gốc 64 là S, gốc 65 là L, gốc 66 là K, gốc 67 là S, gốc 95 là Y, gốc 96 là Y, gốc 97 là C, gốc 98 là A, gốc 99 là R, gốc 100 là I, gốc 101 là R, gốc 102 là R hoặc A, gốc 103 là G, gốc 104 là G, gốc 105 là I, gốc 106 là D và gốc 107 là Y; và b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 95% với SEQ ID NO:3, trong đó gốc 23 là S, gốc 24 là G, gốc 25 là E hoặc D, gốc 26 là K, gốc 27 là L, gốc 28 là G, gốc 29 là D, gốc 30 là K, gốc 31 là Y hoặc F, gốc 32 là A, gốc 33 là Y, gốc 49 là Q, gốc 50 là D, gốc 51 là K hoặc N, gốc 52 là Q hoặc K, gốc 53 là R, gốc 54 là P, gốc 55 là S, gốc 56 là G, gốc 88 là Q, gốc 89 là A, gốc 90 là W, gốc 91 là D, gốc 92 là S, gốc 93 là S, gốc 94 là T, gốc 95 là A, gốc 96 là V và gốc 97 là F.

Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng ức chế MASP-2 (ví dụ, OMS646 hoặc biến thể của chúng) để sử dụng trong chế phẩm được bảo hộ là kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng ức chế MASP-2 là kháng thể IgG4 có chiều dài đầy đủ của người. Theo một số phương án, IgG4 chứa đột biến điểm trong vùng bản lề để làm tăng cường độ ổn định của kháng thể.

Theo một số phương án, kháng thể ức chế MASP-2 (ví dụ, OMS646 hoặc biến thể của chúng) được cấu thành bởi các vùng biến đổi có nguồn gốc từ người được dung hợp với chuỗi nặng IgG4 ở người và vùng không đổi chứa chuỗi nhẹ lambda,

trong đó chuỗi nặng chứa đột biến điểm trong vùng bản lề (ví dụ, trong đó phân tử IgG4 chứa đột biến S228P) để làm tăng cường độ ổn định của kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể ức chế MASP-2 là tetrame chứa hai chuỗi nặng tương đồng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:4 và hai chuỗi nhẹ tương đồng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:5.

Theo một số phương án, nồng độ của kháng thể ức chế MASP-2 trong chế phẩm này nằm trong khoảng từ khoảng 100 mg/mL đến khoảng 250 mg/mL, như từ khoảng 150 mg/ml đến khoảng 220 mg/mL, như từ khoảng 175 mg/mL đến khoảng 200 mg/mL, hoặc từ khoảng 175 mg/mL đến khoảng 195 mg/mL. Theo phương án nhất định, kháng thể ức chế MASP-2 có trong chế phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 175 mg/ml đến khoảng 195 mg/ml, như từ khoảng 180 mg/mL đến khoảng 190 mg/mL, như khoảng 175 mg/mL, như khoảng 180 mg/mL, khoảng 181 mg/mL, khoảng 182 mg/mL, khoảng 183 mg/mL, khoảng 184 mg/mL, khoảng 185 mg/mL, khoảng 186 mg/mL, khoảng 187 mg/mL, khoảng 188 mg/mL, khoảng 189 mg/mL hoặc như khoảng 190 mg/mL.

Theo một số phương án, sự thay đổi nhỏ trong các trình tự axit amin của kháng thể ức chế MASP-2 hoặc các mảnh của nó được dự định bao gồm bởi chế phẩm được bảo hộ, với điều kiện là các thay đổi trong trình tự axit amin duy trì ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với kháng thể ức chế MASP-2 hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó được mô tả trong bản mô tả này (tức là, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:2 và/hoặc ít nhất ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:3) và giữ lại khả năng ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2.

Như sẽ được đánh giá, kháng thể ức chế MASP-2 hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó mà được bào chế theo ngữ cảnh của sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, công nghệ tái tổ hợp, công nghệ hiển thị thể thực khuẩn, công nghệ tổng hợp hoặc sự kết hợp của các công nghệ này hoặc các công nghệ khác đã biết rõ ràng trong lĩnh vực kỹ thuật). Phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể và mảnh gắn kháng nguyên đã được biết

rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được tìm thấy trong các tài liệu, ví dụ, Harlow và Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Chapters 5-8 và 15.

Ví dụ, kháng thể ức chế MASP-2, như OMS646 có thể được biểu hiện trong dòng tế bào động vật có vú thích hợp. Các trình tự mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể cụ thể cần quan tâm như OMS646 (ví dụ, SEQ ID NO:6 và SEQ ID NO:7) có thể được sử dụng để biến nạp tế bào chủ động vật có vú đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm phương pháp lây nhiễm được trung gian bởi dextran, phương pháp kết tủa canxi phosphat, phương pháp lây nhiễm được trung gian bởi polybren, dung hợp thể nguyên sinh, phương pháp xung điện, phương pháp nang hóa (các) polynucleotit trong liposom và vi tiêm trực tiếp AND vào nhân.

Các dòng tế bào động vật có vú có sẵn dưới dạng vật chủ để biểu hiện đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm nhiều dòng tế bào bất tử có sẵn từ Bộ lưu giữ chủng giống Hoa Kỳ (American Type Culture Collection - ATCC), bao gồm nhưng không bị giới hạn ở tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào HeLa, tế bào thận chuột đồng sơ sinh (BNK), tế bào thận khỉ (COS), tế bào caxinom tế bào gan ở người (ví dụ, HepG2), tế bào biểu mô thận 293 ở người (HEK293) và nhiều dòng tế bào khác.

Sau giai đoạn sản xuất protein của quy trình nuôi cấy tế bào, kháng thể ức chế MASP-2 được thu hồi từ môi trường nuôi cấy tế bào bằng cách sử dụng các kỹ thuật được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Cụ thể, theo một số phương án kháng thể ức chế MASP-2 polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thu hồi từ môi trường nuôi cấy là các polypeptit được tiết ra.

Kháng thể ức chế MASP-2 có thể được tinh chế bằng cách sử dụng, ví dụ, sắc ký hydroxyapatit, điện di gel, sự thẩm tách, và sắc ký ái lực và sự kết hợp các phương pháp bất kỳ đã biết hoặc kỹ thuật tinh chế chưa được phát hiện, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở sắc ký protein A, sự phân đoạn trên cột trao đổi ion, sự kết tủa etanol, HPLC pha đảo, sắc ký trên silic, sắc ký trên heparin SEPHAROS[®], sắc ký nhựa trao đổi anion và cation (như cột axit polyaspartic), sắc ký tập trung, SDS-PAGE và

sự kết tủa amoni sulfat. Phương pháp tinh chế có thể còn bao gồm các bước bổ sung mà bất hoạt và/hoặc loại bỏ virus và/hoặc retrovirus mà có thể có tiềm năng có mặt trong môi trường nuôi cấy tế bào của các dòng tế bào động vật có vú. Số bước thanh thải virus đáng kể là có sẵn, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, xử lý bằng chất chaotrop như ure hoặc guanidin, chất tẩy rửa, bước siêu lọc/lọc thẩm tách bổ sung, sự tách thông thường, như sắc ký loại trừ kích thước hoặc trao đổi ion, giới hạn độ pH, nhiệt độ, proteaza, dung môi hữu cơ hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng.

Kháng thể ức chế MASP-2 được tinh chế thường yêu cầu bước cô và trao đổi đệm trước khi bảo quản hoặc xử lý tiếp. Hệ thống lọc dòng tuyến tính (tangential flow filtration - TFF) là ví dụ không giới hạn có thể được sử dụng để cô và trao đổi đệm rửa giải từ cột tinh chế trước đó với đệm cuối cùng được mong đợi đối với dược chất.

Kháng thể đơn dòng ức chế MASP-2 được bào chế trong bản mô tả này tốt hơn về cơ bản là tinh khiết và mong đợi về cơ bản là đồng nhất (tức là, không bị nhiễm protein, v.v.). Kháng thể “về cơ bản là tinh khiết” nghĩa là chế phẩm chứa ít nhất 90% khối lượng kháng thể, tính trên tổng khối lượng chế phẩm, tốt hơn là ít nhất 95% khối lượng. Kháng thể “về cơ bản là đồng nhất” nghĩa là chế phẩm chứa ít nhất khoảng 99% khối lượng kháng thể, tính trên tổng khối lượng chế phẩm.

Dung dịch nước

Chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế chứa dung dịch nước chứa hệ đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0 (ví dụ, có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0, hoặc có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,5) và kháng thể ức chế MASP-2 (ví dụ, OMS646 hoặc biến thể của chúng) hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 50 mg/mL đến khoảng 250 mg/mL (ví dụ, từ khoảng 100mg/mL đến khoảng 250 mg/mL). Dung dịch nước để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là dung dịch dược phẩm chứa nước dụng (an toàn và không độc để dùng cho người) và hữu ích để điều chế chế phẩm lỏng. Theo một số phương án, dung dịch nước là nước, như nước vô trùng để tiêm (water for injection - WFI), là dạng điều chế vô trùng, không chứa chất tan của nước cất. Theo cách khác, các dung dịch nước khác thích hợp để dùng điều trị và không có tác động bất lợi đến độ ổn định của chế phẩm có thể được sử dụng, như nước khử ion. Các dung dịch nước thích hợp khác bao gồm

nước kìm hãm vi khuẩn để tiêm (bacteriostatic water for injection - BWFI), nước muối vô trùng, dung dịch Ringer, hoặc dung dịch nước tương tự khác được sử dụng cho dung dịch được.

Hệ đệm

Chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế được điều chỉnh đến độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0, tốt hơn là độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0. Độ pH mong muốn được duy trì thích hợp bằng cách sử dụng hệ đệm. Theo một số phương án, hệ đệm chứa ít nhất một chất đệm được dùng có hằng số phân ly axit trong 2 đơn vị pH của độ pH của chế phẩm. Hệ đệm được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 4,0 đến khoảng 8,0. Các chất đệm khác nhau được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ về chất đệm mà sẽ kiểm soát độ pH trong khoảng này bao gồm axetat, suxinat, gluconat, histidin, xitrat và các đệm axit hữu cơ khác. Theo một số phương án, chất đệm này được chọn từ nhóm bao gồm suxinat, histidin và xitrat. Theo một số phương án, được phẩm chứa hệ đệm với chất đệm có nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 50 mM, như nằm trong khoảng từ 10 đến 40 mM, hoặc như nằm trong khoảng từ 10 đến 30 mM, hoặc nằm trong khoảng từ 20 đến 30mM, hoặc khoảng 20 mM.

Theo một số phương án, chất đệm là đệm histidin. “Đệm histidin” là đệm chứa axit amin histidin. Ví dụ về đệm histidin chứa histidin hoặc muối histidin bất kỳ bao gồm histidin hydroclorua, histidin axetat, histidin phosphat và histidin sulfat, bao gồm tổ hợp của các muối bất kỳ này chứa hoặc không chứa histidin. Theo một phương án, hệ đệm chứa đệm histidin hydroclorua (L-Histidin/HCL). Đệm histidin hydroclorua này có thể được điều chế bằng cách chuẩn độ L-histidin (không chứa bazơ, rắn) bằng axit clohydric loãng hoặc bằng cách sử dụng hỗn hợp thích hợp của histidin và histidin hydroclorua. Theo một số phương án, độ pH của đệm L-Histidin/HCl nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0, như từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,0, ví dụ, khoảng 5,8 hoặc khoảng 5,9.

Theo một số phương án, chất đệm là đệm xitrat. Đệm xitrat này có thể được điều chế bằng cách chuẩn độ axit xitric, muối mono-natri của axit xitric, và/hoặc muối di-natri của axit xitric bằng dung dịch natri hydroxit loãng đến độ pH thích hợp hoặc

bằng cách sử dụng hỗn hợp của axit xitric thích hợp và (các) muối để đạt được cùng độ pH. Theo phương án khác, đệm xitrat có thể được điều chế bằng cách chuẩn độ muối tri-natri xitrat bằng dung dịch axit clohydric đến độ pH thích hợp. Trong trường hợp này, độ bền ion có thể cao hơn một chút so với lúc bắt đầu có axit xitric do sự tạo thành của các ion natri và clorua bổ sung trong dung dịch. Theo phương án nhất định, độ pH của đệm xitrat nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0, như từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,0, ví dụ, khoảng 5,8 hoặc khoảng 5,9. Theo một số phương án, chất đệm là đệm suxinat. Theo phương án nhất định, độ pH của đệm suxinat nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,0, ví dụ, khoảng 5,8 hoặc khoảng 5,9.

Theo một số phương án, chất đệm là đệm natri xitrat, trong đó natri xitrat có trong chế phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 mM đến khoảng 50 mM, như nằm trong khoảng từ khoảng 10 mM đến khoảng 25 mM, như khoảng 20 mM. Theo một số phương án, chất đệm là đệm L-histidin, trong đó L-histidin có trong chế phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10mM đến khoảng 50 mM, như nằm trong khoảng từ khoảng 10 mM đến khoảng 25 mM, như khoảng 20 mM. Theo một số phương án, chế phẩm chứa khoảng 20 mM natri xitrat và có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0. Theo một số phương án, chế phẩm chứa khoảng 20 mM L-histidin và có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0.

Tá dược

Theo một số phương án, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế còn chứa ít nhất một tá dược. Ví dụ về tá dược thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, protein (ví dụ, albumin trong huyết thanh), axit amin (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic, lysin, arginin, glyxin và histidin), sacarit (ví dụ, glucoza, sucroza, maltoza và trehaloza), rượu polyhydric (ví dụ, manitol và sorbitol), axit béo và phospholipit (ví dụ, alkyl sulfonat và caprylat).

Theo một số phương án, chế phẩm chứa tá dược được chọn từ nhóm bao gồm axit amin có chuỗi bên tích điện, đường hoặc rượu polyhydric khác và muối. Theo một số phương án, chế phẩm chứa đường hoặc rượu polyhydric khác, như, ví dụ, sucroza, trehaloza, manitol hoặc sorbitol. Theo một số phương án, chế phẩm chứa muối, như, ví dụ NaCl hoặc muối của axit amin.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa tá dược là chất biến đổi độ trương. Theo một số phương án, chất biến đổi độ trương được chứa trong chế phẩm ở nồng độ thích hợp để tạo ra chế phẩm đẳng trương. Theo một số phương án, chất biến đổi độ trương được chứa trong chế phẩm ở nồng độ thích hợp để tạo ra chế phẩm ưu trương. Theo một số phương án, chất biến đổi độ trương để sử dụng trong chế phẩm được chọn từ nhóm bao gồm axit amin có chuỗi bên tích điện, đường hoặc rượu polyhydric khác và muối. Theo một số phương án, chất biến đổi độ trương là axit amin có chuỗi bên tích điện (tức là, chuỗi bên tích điện âm hoặc chuỗi bên tích điện dương) có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 50 mM đến khoảng 300 mM. Theo một số phương án, chất biến đổi độ trương là axit amin có chuỗi bên tích điện âm, như glutamat. Theo một số phương án, chế phẩm chứa glutamat có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 50mM đến khoảng 300 mM. Theo một số phương án, chất biến đổi độ trương là axit amin có chuỗi bên tích điện dương, như arginin. Theo một số phương án, chế phẩm chứa arginin (ví dụ, arginin HCl), có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 50 mM đến khoảng 300 mM, như nằm trong khoảng từ khoảng 150 mM đến khoảng 225 mM.

Tốt hơn là, dược phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này là ưu trương (tức là, có áp suất thẩm thấu cao hơn máu người). Như được mô tả trong bản mô tả này, bất ngờ quan sát thấy rằng tính ưu trương dẫn đến độ nhớt của mẫu giảm, mà đạt được, ví dụ, bằng cách làm tăng vừa phải nồng độ arginin. Như được mô tả trong ví dụ 2, bất ngờ quan sát thấy rằng đạt được độ nhớt thấp (ví dụ, nhỏ hơn 25 cP) bằng chế phẩm xitrat/arginin và histidin/arginin chứa kháng thể ức chế MASP-2 có nồng độ cao chứa nồng độ arginin cao hơn hoặc bằng 200 mM khi không có mặt CaCl_2 . Theo đó, theo một số phương án, chế phẩm chứa arginin (ví dụ, arginin HCl) ở nồng độ ưu trương nằm trong khoảng từ khoảng 200 mM đến khoảng 300 mM.

Như được mô tả thêm trong ví dụ 2, cũng quan sát thấy rằng chế phẩm chứa cation hóa trị hai (CaCl_2 hoặc MgCl_2) có nguyên liệu có khối lượng phân tử cao tăng khi so với chế phẩm mà không chứa chất phụ gia CaCl_2 hoặc MgCl_2 . Theo đó, theo một phương án, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế về cơ bản không chứa chất phụ gia CaCl_2 . Theo một phương án, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế về cơ bản không chứa chất phụ gia MgCl_2 .

Như được mô tả thêm trong ví dụ 2, được xác định đối với chế phẩm chứa kháng thể MASP-2 nồng độ cao mà bao gồm sucroza liên quan đến sự đa phân tán tăng trong tất cả hệ đệm được kiểm tra. Theo đó, theo một phương án, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế về cơ bản không chứa sucroza.

Như được mô tả trong ví dụ 2, cũng được xác định đối với chế phẩm chứa kháng thể MASP-2 có nồng độ cao mà bao gồm sorbitol liên quan đến sự đa phân tán tăng trong tất cả các hệ đệm được kiểm tra. Theo đó, theo một phương án, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế về cơ bản không chứa sorbitol.

Chất hoạt động bề mặt

Tùy ý, theo một số phương án, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế còn chứa chất hoạt động bề mặt được dụng. Các ví dụ không giới hạn về chất hoạt động bề mặt được dụng thích hợp bao gồm este của polyoxyetylen-sorbitan axit béo (ví dụ, Tween), polyetylen-polypropylen glycol, polyoxyetylen-stearat, polyoxyetylen alkyl ete (ví dụ, polyoxyetylen monolauryl ete), alkylphenylpolyoxyetylen ete (ví dụ, Triton-X), polyoxyetylen-polyoxypropylen copolyme (ví dụ, Poloxame và Pluronic) và natri dodexyl sulphat (SDS). Theo phương án nhất định, chất hoạt động bề mặt được dụng là este của polyoxyetylen-sorbitan-axit béo (polysorbat), như polysorbat 20 (được bán dưới nhãn hiệu Tween 20TM) và polysorbat 80 (được bán dưới nhãn hiệu Tween 80TM). Theo một số phương án, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế chứa chất hoạt động bề mặt không ion. Chất hoạt động bề mặt không ion có thể là polysorbat, (ví dụ, được chọn từ nhóm polysorbat 20, polysorbat 80 và polyetylen-polypropylen copolyme). Theo một số phương án, nồng độ của chất hoạt động bề mặt nằm trong khoảng từ khoảng 0,001 đến 0,1% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,1% (khối lượng/thể tích), hoặc từ 0,01 đến 0,1% (khối lượng/thể tích), hoặc từ 0,01 đến 0,08% (khối lượng/thể tích), hoặc từ 0,025 đến 0,075% (khối lượng/thể tích), hoặc cụ thể hơn là khoảng 0,01% (khối lượng/thể tích), khoảng 0,02% (khối lượng/thể tích), khoảng 0,04% (khối lượng/thể tích), hoặc khoảng 0,06% (khối lượng/thể tích), hoặc khoảng 0,08% (khối lượng/thể tích), hoặc

khoảng 0,10% (khối lượng/thể tích). Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất hoạt động bề mặt không ion (ví dụ, polysorbat 80) có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,001 đến 0,1% (khối lượng/thể tích), hoặc từ 0,005% đến 0,1% (khối lượng/thể tích), hoặc từ 0,01 đến 0,1% (khối lượng/thể tích), hoặc từ 0,01 đến 0,08% (khối lượng/thể tích), hoặc từ 0,025 đến 0,075% (khối lượng/thể tích), hoặc cụ thể hơn là khoảng 0,01% (khối lượng/thể tích), khoảng 0,02% (khối lượng/thể tích), khoảng 0,04% (khối lượng/thể tích), hoặc khoảng 0,06% (khối lượng/thể tích), hoặc khoảng 0,08% (khối lượng/thể tích), hoặc khoảng 0,10% (khối lượng/thể tích). Như được mô tả trong ví dụ 2, bất ngờ quan sát thấy rằng việc bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion polysorbat 80 (PS-80) dẫn đến sự giảm hơn nữa độ nhớt trong khi cũng bảo toàn sự thu hồi protein, theo đó cho phép kháng thể OMS646 có nồng độ cao trong khi duy trì độ nhớt thấp thích hợp để sử dụng trong thiết bị tiêm, như dụng cụ tiêm tự động.

Chất ổn định

Tùy ý, theo một số phương án, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế còn chứa chất ổn định. Chất ổn định (được sử dụng đồng nghĩa với thuật ngữ "chất làm ổn định" trong bản mô tả này) có thể là hydrat cacbon hoặc sacarit hoặc đường được chấp nhận bởi các cơ quan quản lý là chất phụ gia hoặc tá dược thích hợp trong dược phẩm, ví dụ, trehaloza hoặc sucroza. Nồng độ điển hình của chất ổn định nằm trong khoảng từ 15 đến 250 mM, hoặc nằm trong khoảng từ 150 đến 250 mM, hoặc khoảng 210 mM. Chế phẩm có thể chứa chất ổn định thứ hai, như methionin, ví dụ, có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 25 mM hoặc có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 15 mM (ví dụ, methionin ở nồng độ bằng khoảng 5 mM, khoảng 10 mM hoặc khoảng 15 mM).

Chất bảo quản

Tùy ý, theo một số phương án, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế còn chứa chất bảo quản (ví dụ, chất kháng khuẩn). Chất kháng khuẩn thường được yêu cầu đối với sản phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa được dự định cho nhiều liều. Tương tự, chất bảo quản được bổ sung vào dược phẩm được đóng gói khử trùng trong lọ nhỏ liều duy nhất nếu (các) thành phần có hoạt tính không có đặc tính diệt vi khuẩn hoặc kìm hãm vi khuẩn hoặc thúc đẩy sự phát triển. Một vài chất bảo quản điển hình được sử dụng là rượu benzylic (từ 0,9%

đến 1,5%), metylparaben (từ 0,18% đến 0,2%), propylparaben (0,02%), benzalkoni clorua (từ 0,01% đến 0,02%), và thimerosal (từ 0,001% đến 0,01%).

Khả năng bơm tiêm

Đường dùng dưới da yêu cầu tiêm bằng cách sử dụng các thiết bị tiêm, như ống tiêm, dụng cụ tiêm tự động, bơm có thể mang được, hoặc các thiết bị khác, mà hạn chế chế phẩm dạng sản phẩm liên quan đến thể tích tiêm và độ nhớt dung dịch. Ngoài ra, chế phẩm dạng sản phẩm phải thích hợp để sử dụng trong thiết bị tiêm liên quan đến lực tiêm và thời gian yêu cầu để tiêm. “Khả năng bơm tiêm” như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ khả năng điều trị bằng cách tiêm để đi qua dễ dàng thông qua kim tiêm dưới da để chuyển từ lọ nhỏ trước khi tiêm. “Khả năng tiêm” như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ hiệu quả của chế phẩm khi tiêm (xem, ví dụ, Cilurzo F, Selmin F, Minghetti P, et al. *Injectability Evaluation: An Open Issue. AAPS PharmSciTech*. 2011;12(2):604-609). Khả năng bơm tiêm bao gồm các yếu tố như dễ rút, dễ tắc và có xu hướng tạo bọt, và độ chính xác của phép đo liều. Khả năng tiêm bao gồm áp lực hoặc lực yêu cầu để tiêm, tính đều đặn của dòng chảy, và không bị tắc (tức là, không làm tắc kim tiêm ống tiêm). Khả năng bơm tiêm và khả năng tiêm có thể bị ảnh hưởng bởi hình dạng kim, tức là, đường kính trong, chiều dài, hình dạng khoảng hở, cũng như mặt kết thúc của ống tiêm, đặc biệt là trong thiết bị tự tiêm như bút và dụng cụ tiêm tự động (ví dụ, được trang bị kim tiêm 29–31 GA), và trong ống tiêm được nạp sẵn cho liều dưới da (ví dụ, được trang bị kim tiêm 24-27 GA). Lực tiêm (hoặc lực trượt) là yếu tố phức tạp bị ảnh hưởng bởi độ nhớt dung dịch, kích thước của kim tiêm (tức là, số đo của kim tiêm), và sức căng bề mặt của vật chứa/vật đóng. Các kim tiêm nhỏ hơn, ví dụ, $\geq$ số đo, sẽ gây cảm giác ít đau cho bệnh nhân. Overcashier và cộng sự đã thiết lập mối tương quan độ nhớt-lực trượt là hàm của số đo kim tiêm dựa vào phương trình Hagen-Poiseuille (Overcashier et al., *Am Pharm Rev* 9(6):77-83 (2006). Ví dụ, bằng kim tiêm 27-gauge thành mỏng, độ nhớt chất lỏng nên được duy trì nhỏ hơn hoặc bằng 20 cP để không vượt quá lực trượt 25 Newton (N).

Theo phương án nhất định, được phẩm theo sáng chế được đặc trưng bởi việc có lực trượt khi tiêm bằng khoảng 25N hoặc nhỏ hơn khi được tiêm qua kim 27GA (1,25”) ở nhiệt độ trong phòng.

Theo phương án nhất định, được phẩm theo sáng chế được đặc trưng bởi việc có lực trượt khi tiêm bằng khoảng 20N hoặc nhỏ hơn khi được tiêm qua kim 25GA (1'') ở nhiệt độ trong phòng.

Được ví dụ trong ví dụ 3, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao (ví dụ, OMS646) theo sáng chế có khả năng bơm tiêm và khả năng tiêm tốt đáng ngạc nhiên. Chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao như được bộc lộ trong bản mô tả này cho phép dùng chế phẩm này tiêm trong cơ hoặc tiêm dưới da nhờ kim cỡ nhỏ thường được sử dụng để tiêm, ví dụ, kim tiêm 27G (1,25''), 27G thành mỏng, 25G thành mỏng (1''), hoặc 25G (1''). Trong một số trường hợp, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp như được bộc lộ trong bản mô tả này cho phép dùng thể tích được tiêm dung nạp (ví dụ, 1-3 cc) trong khi phân phối lượng hữu hiệu của kháng thể ức chế MASP-2 trong một lần tiêm duy nhất ở một vị trí tiêm.

Độ ổn định

Đối với nội dung bất kỳ ở trên, cần lưu ý rằng kháng thể ức chế MASP-2 hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó trong chế phẩm giữ lại khả năng để ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2. Ví dụ, kháng thể ức chế MASP-2 giữ lại khả năng để gắn MASP-2 và ức chế sự hoạt động của con đường lectin như được mô tả trong ví dụ 1 hoặc thử nghiệm con đường lectin khác, ví dụ như được mô tả trong WO2012/151481. Ngoài thử nghiệm hoạt lực, các thử nghiệm vật lý-hóa học khác nhau có thể được sử dụng để đánh giá độ ổn định bao gồm sự tập trung đẳng điện, polyacrylamit điện di gel, sắc ký loại trừ kích cỡ và sự đánh giá hạt nhìn thấy được và dưới ngưỡng nhìn thấy được.

Theo phương án nhất định, chế phẩm theo sáng chế thể hiện độ ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -20°C đến 8°C trong ít nhất 30 ngày, lên đến ít nhất 9 tháng hoặc lâu hơn, hoặc lên đến ít nhất 12 tháng hoặc lâu hơn, như được mô tả trong các nghiên cứu độ ổn định trong các ví dụ 2 và 4. Ngoài ra hoặc theo cách khác, theo phương án nhất định, chế phẩm là ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -20°C đến 8°C, như từ 2°C đến 8°C trong ít nhất 6 tháng, ít nhất 1 năm, hoặc ít nhất 2 năm hoặc lâu hơn. Theo phương án nhất định, độ ổn định có thể được đánh giá, ví dụ, bằng việc duy trì độ tinh khiết qua thời gian. Ví dụ, theo phương án nhất định, chế phẩm theo

sáng chế có độ tinh khiết giảm ít hơn 5%, như giảm ít hơn 4%, như giảm ít hơn 3%, như giảm ít hơn 2%, như giảm ít hơn 1% mỗi tháng, 6 tháng, 9 tháng hoặc 1 năm khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C, như được xác định bằng phương pháp sắc ký loại trừ kích cỡ (size exclusion chromatography - SEC), là các bộ kiểm tra sự có mặt hoặc không có mặt của các mảnh (LMW) và/hoặc loại kết tụ (HMW).

Theo phương án nhất định, chế phẩm theo sáng chế thúc đẩy chậm đến mức kết tụ và/hoặc phân mảnh không thể phát hiện được và duy trì hoạt lực sau khi bảo quản trong thời gian xác định. Con đường khác được mô tả, chế phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này có khả năng duy trì tình nguyên vẹn về cấu trúc của kháng thể OMS646 ức chế MASP-2 có mặt ở nồng độ cao trong dung dịch, ví dụ, ở nồng độ lớn hơn 150 mg/mL, hoặc lớn hơn 175 mg/mL, hoặc ít nhất 185 mg/mL, sao cho kháng thể ức chế MASP-2 có thể duy trì monome chiếm ưu thế (tức là, ít nhất 95% hoặc cao hơn) sau khi bảo quản trong thời gian xác định ở nhiệt độ xấp xỉ từ 2°C đến 8°C. Tốt hơn là, không nhiều hơn 5%, không nhiều hơn 4%, không nhiều hơn 3%, không nhiều hơn 2%, không nhiều hơn 1%, và tốt hơn nhất là không nhiều hơn 0,5% kháng thể tạo ra mảnh (LMW) hoặc dạng kết tụ (HMW) như được đo bởi SEC sau khi bảo quản trong thời gian xác định ở nhiệt độ xấp xỉ từ 2°C đến 8°C.

Như được ví dụ trong ví dụ 4 được mô tả trong bản mô tả này, các tác giả sáng chế đề xuất chế phẩm thích hợp để duy trì kháng thể ức chế MASP-2, OMS646, ở khoảng 185 mg/mL ở dạng monome chiếm ưu thế trong ít nhất 12 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2°C đến 8°C.

Chất cải biến tính thấm của mô

Theo phương án khác, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế còn chứa chất cải biến tính thấm của mô mà làm tăng sự hấp thụ hoặc phân tán của kháng thể ức chế MASP-2 sau khi dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, tiêm dưới da). Theo một số phương án, chất cải biến tính thấm của mô là enzym hyaluronidaza hoạt động dưới dạng chất cải biến tính thấm của mô và làm tăng sự phân tán và hấp thụ của kháng thể ức chế MASP-2 được tiêm. Chất cải biến tính thấm của mô đặc biệt hữu ích là hyaluronidaza (ví dụ, hyaluronidaza tái tổ hợp ở người). Hyaluronidaza làm việc dưới dạng chất cải biến tính thấm của mô bằng cách

phá vỡ tạm thời hàng rào hyaluronan để mở đường vào mạch bạch huyết và mao mạch cho phép thuốc và chất lỏng được tiêm được hấp thụ nhanh chóng vào hệ tuần hoàn toàn thân. Hyaluronan tái tạo một cách tự nhiên, và hàng rào được thu hồi lại hoàn toàn, ví dụ, trong 48 giờ. Việc bổ sung hyaluronidaza trong dược phẩm có thể tiêm được làm tăng độ sinh khả dụng của kháng thể ức chế MASP-2 sau khi dùng ngoài đường tiêu hóa, cụ thể là dùng dưới da. Nó cũng cho phép thể tích vị trí tiêm lớn hơn (tức là, lớn hơn 1 mL) ít đau và ít gây khó chịu hơn, và giảm thiểu tỷ lệ trường hợp mắc phản ứng vị trí tiêm (ví dụ, làm phẳng vết sưng ở vị trí tiêm).

Theo một số phương án, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao (ví dụ, OMS646) theo sáng chế chứa từ khoảng 100 U/mL đến khoảng 20.000 U/mL enzym hyaluronidaza. Nồng độ thực tế của enzym hyaluronidaza tùy thuộc loại enzym hyaluronidaza được sử dụng trong việc điều chế chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 của sáng chế. Lượng hữu hiệu của hyaluronidaza có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Nó cần được cung cấp ở lượng đủ sao cho có thể làm tăng sự phân tán và hấp thụ của kháng thể ức chế MASP-2 mà được dùng đồng thời hoặc được dùng tuần tự. Lượng tối thiểu của enzym hyaluronidaza là lớn hơn 100 U/mL. Cụ thể hơn, lượng hữu hiệu của enzym hyaluronidaza nằm trong khoảng từ khoảng 150U/mL đến khoảng 20.000U/mL, nhờ đó lượng này tương ứng nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 mg đến 0,16 mg protein dựa trên hoạt tính cụ thể được giả định bằng 100.000 U/mg. Theo một số phương án, dược phẩm chứa hyaluronidaza có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1.000 đến khoảng 20.000 U/ml, như khoảng 1.000 đến khoảng 16.000 U/ml. Theo cách khác, nồng độ của hyaluronidaza nằm trong khoảng từ khoảng 1.500 đến khoảng 12.000 U/mL, hoặc cụ thể hơn là từ khoảng 2.000 U/mL đến khoảng 12.000 U/mL. Lượng cụ thể trong bản mô tả này tương ứng với lượng hyaluronidaza được bổ sung ban đầu vào dược phẩm. Theo một số phương án, tỷ lệ (khối lượng/khối lượng) của hyaluronidaza so với kháng thể ức chế MASP-2 nằm trong khoảng từ 1:1.000 đến 1:8.000, hoặc nằm trong khoảng từ 1:4.000 đến 1:6.000 hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 1:4.000 đến 1:5000.

Hyaluronidaza có thể có mặt dưới dạng thành phần của chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao theo sáng chế, hoặc có thể được cung cấp dưới dạng dung dịch riêng rẽ trong các phần của kit. Do đó, theo một

phương án, kháng thể ức chế MASP-2 được bào chế đồng thời với hyaluronidaza. Theo phương án khác, kháng thể ức chế MASP-2 và hyaluronidaza được bào chế riêng rẽ và được trộn ngay trước khi dùng dưới da. Theo phương án khác, từng kháng thể ức chế MASP-2 và hyaluronidaza được bào chế và được dùng riêng rẽ, ví dụ, hyaluronidaza được dùng dưới dạng tiêm riêng rẽ trực tiếp trước hoặc sau khi dùng chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2. Trong một số trường hợp, hyaluronidaza được dùng dưới da từ khoảng 5 giây đến khoảng 30 phút trước khi tiêm được phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 theo sáng chế vào cùng khu vực vị trí tiêm. Theo phương án nhất định, dược phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 và dung dịch hyaluronidaza được chứa trong các ngăn riêng của thiết bị được mà tự động phân phối đồng thời hoặc tuần tự (ví dụ, bằng cách sử dụng ống tiêm ống kép).

Vật chứa được nạp sẵn

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao như được bộc lộ trong bản mô tả này được chứa trong vật chứa kín được nạp sẵn ở lượng đủ để dùng cho đối tượng là động vật có vú. Do đó, lượng thành phần dược chất trong thuốc đủ được bào chế theo sáng chế, là bằng hoặc nhiều hơn một chút (tức là, không vượt quá 25%, như không vượt quá 10%) lượng kháng thể ức chế MASP-2 được mong đợi để được dùng cho đối tượng là động vật có vú được chứa trong vật chứa được nạp sẵn mà thuận lợi để phân phối chế phẩm chứa kháng thể để dùng ngoài đường tiêu hóa (tức là, tiêm hoặc truyền). Theo một số phương án, vật chứa được nạp sẵn chứa ít nhất một dạng liều đơn vị được của kháng thể ức chế MASP-2.

Ví dụ, lượng chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao sử dụng một lần được mong muốn có thể được đóng gói trong vật chứa được nạp sẵn, như, ví dụ, lọ nhỏ thủy tinh được đậy bằng nút hoặc vật đậy khác mà bao gồm vách qua đó kim tiêm dưới da có thể được chèn để rút chế phẩm, hoặc có thể được đóng gói trong ống tiêm được nạp sẵn hoặc vật chứa khác được nạp sẵn thích hợp để tiêm (ví dụ, tiêm dưới da) hoặc truyền. Ví dụ về các vật chứa này bao gồm, không giới hạn, lọ nhỏ, ống tiêm, ống thuốc tiêm, chai, bút tiêm và túi. Tốt hơn là, vật chứa là từng ống tiêm được nạp sẵn sử dụng một lần, có thể được tạo ra thích hợp bằng thủy tinh hoặc vật liệu polyme khác như olefin polyme vòng hoặc acrylonitril

butadien styren (ABS), polycacbonat (PC), polyoxymetylen (POM), polystyren (PS), polybutylen terephthalat (PBT), polypropylen (PP), polyetylen (PE), polyamit (PA), chất đàn hồi dẻo nhiệt (TPE) và tổ hợp của chúng. Ống của ống tiêm hoạt động bằng pit tông đàn hồi mà có thể được đẩy dọc theo ống để đẩy lượng chất lỏng qua kim tiêm nối với nó. Theo một số phương án của sáng chế, từng ống tiêm bao gồm kim tiêm được gắn vào đó.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao như được bộc lộ trong bản mô tả này được chứa trong vật chứa được nạp sẵn được chọn từ nhóm bao gồm: ống tiêm (ví dụ, ống tiêm ống đơn hoặc kép), dụng cụ tiêm dạng bút, lọ nhỏ kín (ví dụ, lọ nhỏ buồng kép), dụng cụ tiêm tự động, caset và thiết bị bơm (ví dụ, bơm dán trên cơ thể, bơm khí áp hoặc bơm thẩm thấu). Để phân phối dưới da, chế phẩm này có thể được chứa trong thiết bị được nạp sẵn thích hợp để phân phối dưới da, như, ví dụ, ống tiêm được nạp sẵn, bộ tiêm tự động, thiết bị tiêm (ví dụ, thiết bị INJECT-EASE™ hoặc GENJECT™), bút có bộ tiêm (như GENPEN™) hoặc thiết bị khác thích hợp để dùng dưới da.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được điều chế dưới dạng dạng liều đơn vị trong vật chứa được nạp sẵn, có thể đặc biệt thích hợp để tự dùng. Ví dụ, mỗi lọ nhỏ, bút tiêm hoặc vật chứa khác được nạp sẵn (ví dụ, ống tiêm được nạp sẵn hoặc bút dùng một lần) có thể chứa liều đơn vị khoảng 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL, 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL, 0,9 mL, 1 mL, 1,1 mL, 1,2 mL, 1,3 mL, 1,4 mL, 1,5 mL, 1,6 mL, 1,7 mL, 1,8 mL, 1,9 mL, 2,0 mL, 2,1 mL, 2,2 mL, 2,3 mL, 2,4 mL, 2,5 mL, 2,6 mL, 2,7 mL, 2,8 mL, 2,9 mL, 3,0 mL, 3,5 mL, 4,0 mL, 4,5 mL, 5,0 mL, 5,5 mL, 6,0 mL, 6,5 mL, 7,0 mL, 7,5 mL, 8,0 mL, 8,5 mL, 9,0 mL, 9,5 mL, hoặc khoảng 10,0 mL hoặc thể tích lớn hơn của chế phẩm có nồng độ cao chứa nồng độ kháng thể ức chế MASP-2 khác nhau (ví dụ, OMS646) nằm trong khoảng từ khoảng 100 mg/mL đến khoảng 250 mg/mL, từ khoảng 150 mg/mL đến khoảng 200 mg/mL, từ khoảng 175 mg/mL đến khoảng 200 mg/mL, như khoảng 185 mg/mL, dẫn đến tổng liều đơn vị của OMS646 mỗi vật chứa nằm trong khoảng từ khoảng 20 mg đến khoảng 1000 mg hoặc cao hơn.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế được điều chế dưới dạng dạng liều đơn vị trong vật chứa được nạp sẵn, như lọ nhỏ hoặc ống tiêm, ở liều đơn vị

nằm trong khoảng từ khoảng 350mg đến 400mg, như khoảng 350mg, khoảng 360mg, khoảng 370mg, khoảng 380mg, khoảng 390mg hoặc khoảng 400mg.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế được điều chế dưới dạng dạng liều đơn vị trong ống tiêm được nạp sẵn với thể tích nằm trong khoảng từ 0,1 mL đến 3,0 mL, như khoảng 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL, 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL, 0,9 mL, 1 mL, 1,1 mL, 1,2 mL, 1,3 mL, 1,4 mL, 1,5 mL, 1,6 mL, 1,7 mL, 1,8 mL, 1,9 mL, 2,0 mL, 2,1 mL, 2,2 mL, 2,3 mL, 2,4 mL, 2,5 mL, 2,6 mL, 2,7 mL, 2,8 mL, 2,9 mL, hoặc khoảng 3,0 mL chứa từ khoảng 20 mg đến 750 mg kháng thể ức chế MASP-2 (ví dụ, OMS646). Như được mô tả trong bản mô tả này, chế phẩm ổn định được điều chế dưới dạng liều đơn vị có thể được dùng trực tiếp cho đối tượng (ví dụ, nhờ tiêm dưới da), hoặc theo cách khác được điều chế cũng thích hợp để pha loãng trước khi dùng trong tĩnh mạch.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được khử trùng bằng các phương pháp khử trùng khác nhau thích hợp cho chế phẩm chứa kháng thể, như lọc khử trùng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa kháng thể được khử trùng bằng bộ lọc, ví dụ, bằng bộ lọc 0,2 micron được khử trùng trước. Chế phẩm được khử trùng theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng để ngăn ngừa, điều trị hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2.

Theo khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra sản phẩm sản xuất bao gồm việc nạp vật chứa bằng chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có nồng độ cao theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm để sử dụng trong điều trị cho bệnh nhân mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc tình trạng bệnh phụ thuộc MASP-2, trong đó được phẩm này là vô trùng, dạng liều dùng một lần chứa từ khoảng 350 mg đến khoảng 400 mg (tức là, 350 mg, 360 mg, 370 mg, 380 mg, 390 mg, hoặc 400 mg) kháng thể ức chế MASP-2, trong đó được phẩm này chứa từ khoảng 1,8mL đến khoảng 2,2 mL (tức là, 1,8 mL, 1,9mL, 2,0 mL, 2,1 mL hoặc 2,2 mL) chế phẩm chứa kháng thể 185 mg/mL, như được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó kháng thể hoặc mảnh của kháng thể này chứa (i) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 và (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:3; và trong đó chế phẩm này là ổn định khi được

bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất sáu tháng. Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh phụ thuộc MASP-2 được chọn từ nhóm bao gồm aHUS, HSCT-TMA, IgAN và luput viêm thận (lupus nephritis - LN).

Kit chứa chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao

Sáng chế cũng đề xuất kit điều trị chứa ít nhất một vật chứa chứa chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kit chứa (i) vật chứa chứa chế phẩm bất kỳ chứa kháng thể ức chế MASP-2 được mô tả trong bản mô tả này; và (ii) phương tiện thích hợp để phân phối chế phẩm cho bệnh nhân cần điều trị. Theo một số phương án về kit bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này, phương tiện này là thích hợp để phân phối dưới da chế phẩm cho bệnh nhân.

Các loại vật chứa khác nhau thích hợp để chứa được phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 được chứa trong kit của sáng chế. Theo các phương án nhất định của kit theo sáng chế, vật chứa là ống tiêm được nạp sẵn (ví dụ, ống tiêm ống đơn hoặc kép) hoặc lọ nhỏ kín được nạp sẵn.

Theo một số phương án, vật chứa chứa chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 là vật chứa được nạp sẵn được chọn từ nhóm bao gồm: ống tiêm (ví dụ, ống tiêm ống đơn hoặc kép), dụng cụ tiêm dạng bút, lọ nhỏ kín (ví dụ, lọ nhỏ buồng kép), dụng cụ tiêm tự động, caset, và thiết bị bơm (ví dụ, bơm dán trên cơ thể hoặc bơm khí áp hoặc bơm thẩm thấu). Để phân phối dưới da, chế phẩm này có thể được chứa trong thiết bị được nạp sẵn thích hợp để phân phối dưới da, như ví dụ, ống tiêm được nạp sẵn, bộ tiêm tự động, thiết bị tiêm (ví dụ, thiết bị INJECT-EASE™ và GENJECT™), bút có bộ tiêm (như GENPEN™) hoặc thiết bị khác thích hợp để dùng dưới da.

Ngoài vật chứa được nạp sẵn với liều đơn được phẩm, kit theo sáng chế cũng có thể chứa vật chứa bên ngoài mà vật chứa nạp sẵn được đặt trong đó. Ví dụ, vật chứa bên ngoài có thể bao gồm khay nhựa hoặc khay bìa cứng trong đó các chỗ lõm được tạo ra để nhận vật chứa được nạp sẵn và cố định nó khi vận chuyển và xử lý trước khi sử dụng. Theo một số phương án, vật chứa bên ngoài thích hợp là cản quang

và hoạt động để ngăn vật chứa được nạp sẵn khỏi ánh sáng để ngăn ánh sáng gây ra sự phân hủy các thành phần của dược phẩm. Ví dụ, khay nhựa hoặc khay bìa cứng mà nhận vật chứa được nạp sẵn có thể được đóng gói tiếp trong bìa cứng mà tạo ra sự ngăn ánh sáng. Kit theo sáng chế cũng có thể bao gồm bộ hướng dẫn dùng và sử dụng chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 theo sáng chế, có thể được in trên vật chứa bên ngoài hoặc được in trên tờ giấy chứa trong vật chứa bên ngoài.

Theo một số phương án, kit chứa vật chứa thứ hai (ví dụ, ống tiêm được nạp sẵn) chứa liều hữu hiệu của hyaluronidaza.

Kit có thể còn chứa các vật liệu khác được mong muốn theo quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm kim tiêm, ống tiêm, vật chèn khi đóng gói và tương tự.

Chế phẩm làm ví dụ

Như được mô tả ở trên, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 theo sáng chế có độ nhớt thấp, nồng độ cao, ổn định chứa kháng thể ức chế MASP-2 có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mg/mL đến 250 mg/mL trong dung dịch nước chứa chất đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0.

Hệ đệm, như histidin, xitrat hoặc suxinat, thích hợp được chứa ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 mM đến khoảng 50 mM, và tốt hơn là ở khoảng 20 mM. Theo một vài phương án được ưu tiên, chế phẩm này còn chứa axit amin có chuỗi bên tích điện có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 300 mM. Theo một số phương án, chế phẩm này chứa axit amin có chuỗi bên tích điện dương, như arginin, có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 300 mM. Theo một vài phương án được ưu tiên, chế phẩm còn chứa chất hoạt động bề mặt không ion, như polysorbat 80, ở lượng nằm trong khoảng từ 0,001 % (khối lượng/thể tích) đến 0,1 % (khối lượng/thể tích), như từ khoảng 0,05% (khối lượng/thể tích) đến khoảng 0,1% (khối lượng/thể tích). Theo một số phương án, chế phẩm này còn chứa enzym hyaluronidaza ở lượng hữu hiệu để làm tăng sự phân tán và/hoặc hấp thụ kháng thể ức chế MASP-2 sau khi dùng dưới da.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao, ổn định theo sáng chế chủ yếu chứa, gồm hoặc bao gồm một trong số các thành phần dưới đây:

a) từ 100 đến 200 mg/mL kháng thể ức chế MASP-2; từ 10 đến 50 mM đệm histidin ở độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0; từ 100 mM đến 225 mM arginin; và tùy ý từ 100 đến 20.000 U/mL hyaluronidaza.

b) từ 100 đến 200 mg/mL kháng thể ức chế MASP-2; từ 10 đến 50 mM đệm histidin ở độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0; từ 100 mM đến 225 mM arginin, từ khoảng 0,01% đến 0,08% (khối lượng/thể tích) chất hoạt động bề mặt không ion; và tùy ý từ 100 đến 20.000 U/mL hyaluronidaza.

c) từ 100 đến 200 mg/mL kháng thể ức chế MASP-2; từ 10 đến 50 mM đệm xitrat ở độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0; từ 100 mM đến 225 mM arginin, và tùy ý từ 100 đến 20.000 U/mL hyaluronidaza.

d) từ 100 đến 200 mg/mL kháng thể ức chế MASP-2; từ 10 đến 50 mM đệm xitrat ở độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0; từ 100 mM đến 225 mM arginin, khoảng từ 0,01% đến 0,08% (khối lượng/thể tích) chất hoạt động bề mặt không ion; và tùy ý từ 100 đến 20.000 U/mL hyaluronidaza.

e) từ 100 đến 200 mg/mL kháng thể ức chế MASP-2; từ 10 đến 50 mM đệm suxinat ở độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0; từ 100 mM đến 225 mM arginin, và tùy ý từ 100 đến 20.000 U/mL hyaluronidaza.

f) từ 100 đến 200 mg/mL kháng thể ức chế MASP-2; từ 10 đến 50 mM đệm suxinat ở độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0; từ 100 mM đến 225 mM arginin, khoảng từ 0,01% đến 0,08% (khối lượng/thể tích) chất hoạt động bề mặt không ion; và tùy ý từ 100 đến 20.000 U/mL hyaluronidaza.

Theo phương án nhất định, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao, ổn định theo sáng chế chủ yếu chứa, gồm hoặc bao gồm một trong số các thành phần dưới đây:

g) $185 \pm 18,5$ mg/mL kháng thể ức chế MASP-2; 20 ± 2 mM đệm xitrat ở độ pH bằng khoảng 5,8; 200 ± 20 mM arginin, và tùy ý từ 100 đến 20.000 U/mL hyaluronidaza.

h) $185 \pm 18,5$ mg/mL kháng thể ức chế MASP-2; 20 ± 2 mM đệm xitrat ở độ pH bằng khoảng 5,8; 200 ± 20 mM arginin, khoảng 0,01% (khối lượng/thể tích) polysorbat 80, và tùy ý từ 100 đến 20.000 U/mL hyaluronidaza.

i) 185±18,5 mg/mL kháng thể ức chế MASP-2; 20±2 mM đệm histidin ở độ pH bằng khoảng 5,9, 200±20 mM arginin, và tùy ý từ 100 đến 20.000 U/mL hyaluronidaza.

j) 185±18,5 mg/mL kháng thể ức chế MASP-2; 20±2 mM đệm histidin ở độ pH bằng khoảng 5,9, 200±20 mM arginin, khoảng 0,01% polysorbat 80, và tùy ý từ 100 đến 20.000 U/mL hyaluronidaza.

Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm chứa 100 mg/mL kháng thể ức chế MASP-2 hoặc nhiều hơn, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) tạo ra dược phẩm thứ nhất chứa OMS646 được tinh chế, được phẩm thứ nhất chứa chế phẩm thứ nhất và chứa không nhiều hơn 50 mg/mL protein OMS646; (b) lọc dược phẩm thứ nhất theo đó tạo ra dược phẩm thứ hai, trong đó dược phẩm thứ hai này chứa chế phẩm thứ hai là kết quả của việc lọc; và (c) cô dược phẩm thứ hai để tạo ra dung dịch chứa kháng thể được cô chứa 100 mg/mL OMS646 hoặc nhiều hơn. Lượng lớn dung dịch được bào chế thường được cài đặt ở nồng độ protein cố định sao cho thể tích nạp mong muốn có thể được giữ không đổi. Quy trình sản xuất sản phẩm là thuốc dạng lỏng thường liên quan đến việc trộn kháng thể ức chế MASP-2 với hệ đệm, tá dược và tùy ý chất hoạt động bề mặt, sau đó lọc vô trùng và nạp trong lọ nhỏ (hoặc vật chứa khác, như ống tiêm) và bọc kín (ví dụ, bằng nút, nắp, hoặc tương tự).

Bảng 1: Chế phẩm làm ví dụ 1

Thành phần (USP) được bổ sung vào nước để tiêm	Nồng độ
Kháng thể OMS646	185 mg/mL
Natri xitrat	20 mM
L-Arginin HCl	200 mM
Polysorbat 80	0,01%

Bảng 2: Chế phẩm làm ví dụ 2

Thành phần (USP) được bổ sung vào nước để tiêm	Nồng độ
Kháng thể OMS646	185 mg/mL
L-Histidin	20 mM
L-Arginin HCl	200 mM
Polysorbat 80	0,01%

Phương pháp điều trị

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể phụ thuộc MASP-2 bao gồm việc dùng chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao (ví dụ, OMS646) như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Như được mô tả trong patent Mỹ số 7,919,094; patent Mỹ số 8,840,893; patent Mỹ số 8,652,477; patent Mỹ số 8,951,522, patent Mỹ số 9,011,860, patent Mỹ số 9,644,035, Công bố đơn sáng chế Mỹ số US2013/0344073, US2013/0266560, US 2015/0166675, US2017/0137537, US2017/0189525 và chuỗi đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Mỹ cùng chờ xử lý số 15/476,154, 15/347,434, 15/470,647, 62/315,857, 62/275,025 và 62/527,926 (từng tài liệu trên được chuyển nhượng cho Omeros Corporation, bên nhận chuyển nhượng đơn, từng tài liệu này được đưa vào phần mô tả này bằng cách viện dẫn), sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2 được chỉ ra là góp phần vào sự phát sinh bệnh của nhiều tình trạng bệnh mạn tính và cấp tính. Ví dụ, như được mô tả trong patent Mỹ số 8,951,522, chức năng chủ yếu của hệ bổ thể, một phần của hệ miễn dịch bẩm sinh, là bảo vệ vật chủ chống lại các tác nhân lây nhiễm, tuy nhiên, sự hoạt hóa không thích hợp hoặc hoạt hóa quá mức của hệ bổ thể có thể dẫn đến các bệnh nghiêm trọng, như bệnh mao mạch huyết khối (TMA, bao gồm aHUS, TTP và HUS) trong đó phá hủy nội mô cũng như cục huyết khối giàu fibrin và tiểu cầu trong hệ mạch dẫn đến phá hủy cơ quan. Con đường lectin giữ vai trò ưu thế trong sự hoạt hóa bổ thể khi thiết đặt áp lực hoặc tổn thương tế bào nội mô, và ngăn ngừa sự hoạt hóa MASP-2 và con đường lectin làm tạm dừng thứ tự phản ứng enzym mà dẫn đến sự tạo thành phức chất tấn công màng, sự hoạt hóa tiểu cầu và sự bổ sung bạch cầu. Như được mô tả trong patent Mỹ số 8,652,477, ngoài việc khởi động con đường lectin, MASP-2 cũng có thể hoạt hóa hệ thống gây đông tụ và có thể phân cắt protrombin thành trombin.

Như được mô tả trong ví dụ 1 và patent Mỹ số 9,011,860, OMS646 là chất ức chế tiềm năng sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc lectin. Kháng thể này cho thấy về cơ bản là không gắn kết (ái lực thấp hơn ít nhất 5000 lần) với serin proteaza C1r, C1s, MASP-1 và MASP-3 trong con đường bổ thể còn lại, và không ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc con đường cổ điển.

Do đó, theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc dùng cho bệnh

nhân đang mắc hoặc nguy cơ phát triển bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể phụ thuộc MASP-2 lượng chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này ở lượng đủ để ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2 ở đối tượng là động vật có vú theo đó điều trị bệnh hoặc rối loạn. Theo một số phương án, các phương pháp này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kit hoặc vật chứa bất kỳ được nạp sẵn (ví dụ, ống tiêm hoặc lọ nhỏ được nạp sẵn) được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, phương pháp này có thể còn bao gồm, trước khi dùng chế phẩm cho bệnh nhân, bước xác định rằng bệnh nhân bị đau do bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể lectin. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc dùng chất cải biến tính thấm của mô (ví dụ, hyaluronidaza) mà làm tăng sự hấp thụ hoặc phân tán của kháng thể ức chế MASP-2 sau khi dùng ngoài đường tiêu hóa. Chất cải biến tính thấm của mô có thể được dùng đồng thời với chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 hoặc được dùng tuần tự (ví dụ, trong 5 phút dùng chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 tại hoặc gần vị trí tiêm giống nhau).

Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc tiêm đối tượng cần điều trị từ ống tiêm được nạp sẵn thứ nhất chứa chế phẩm có độ nhớt thấp, nồng độ cao chứa kháng thể ức chế MASP-2 (ví dụ, OMS646) để ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc tiêm đối tượng từ ống tiêm được nạp sẵn thứ hai chứa chất cải biến tính thấm của mô, trong đó việc tiêm tại hoặc gần vị trí tiêm với kháng thể ức chế MASP-2.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể phụ thuộc MASP-2 là bệnh mao mạch huyết khối (thrombotic microangiopathy - TMA) bao gồm ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP), kháng TTP, hội chứng Upshaw-Schulman (USS), hội chứng tan máu tăng ure huyết (HUS), hội chứng tan máu không điển hình (atypical hemolytic syndrome - aHUS), hội chứng tan máu không điển hình phụ thuộc không có yếu tố H, aHUS thứ cấp để lây nhiễm, aHUS chống lại liệu pháp plasma, TMA thứ cấp đến ung thư, TMA thứ cấp để hóa liệu pháp, TMA thứ cấp để cấy ghép, hoặc TMA liên quan đến mảnh ghép tế bào gốc tạo máu.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể phụ thuộc MASP-2 là tình trạng bệnh lý ở thận bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, viêm thận

tiểu cầu tăng sinh màng nâng cuộn mao mạch, viêm thận tiểu cầu thuộc màng, viêm thận tiểu cầu tăng sinh màng (viêm thận tiểu cầu mao dẫn màng nâng cuộn mao mạch), viêm thận tiểu cầu sau lây nhiễm cấp tính (viêm thận tiểu cầu sau liên cầu khuẩn), bệnh tiểu cầu thận C3, viêm thận tiểu cầu cryoglobulin huyết, viêm thận tiểu cầu hình liềm hoại tử phức hợp miễn dịch, luput viêm thận, ban xuất huyết bệnh viêm thận HenochSchonlein và bệnh thận IgA.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là xơ thận (ví dụ, xơ hóa ống thận mô kẽ) và/hoặc protein niệu ở đối tượng đang mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thận mạn tính, suy thận mạn tính, bệnh tiểu cầu (ví dụ, xơ cứng tiểu cầu phân thùy theo ổ), rối loạn phức chất miễn dịch (ví dụ, bệnh thận IgA, bệnh thận thuộc màng), luput viêm thận, hội chứng hư thận, bệnh thận do đái tháo đường, phá hủy ống thận mô kẽ và viêm thận tiểu cầu (ví dụ, bệnh tiểu cầu thận C3), hoặc bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến protein niệu, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở hội chứng hư thận, chứng tiền kinh giật, chứng kinh giật, thương tổn thận do chất độc, thoái hóa dạng tinh bột, bệnh mạch máu-tạo keo (ví dụ, luput ban đỏ toàn thân), sự khử nước, bệnh tiểu cầu (ví dụ, viêm thận tiểu cầu thuộc màng, viêm thận tiểu cầu phân thùy thành ổ, bệnh tiểu cầu thận C3, bệnh thay đổi nhỏ, bệnh hư thận lipoit), bài tập căng thẳng, căng thẳng, protein niệu thể đứng (tư thế) lạnh tính, xơ cứng tiểu cầu phân thùy theo ổ, bệnh thận IgA (tức là, bệnh Berger), bệnh thận IgM, viêm thận tiểu cầu tăng sinh màng, bệnh thận thuộc màng, bệnh thay đổi nhỏ, bệnh saccoit, hội chứng Alport, bệnh đái tháo đường (bệnh thận do đái tháo đường), tính độc do thuốc (ví dụ, NSAIDS, nicotin, penixilamin, lithi cacbonat, vàng và các kim loại nặng khác, các chất ức chế ACE, kháng sinh (ví dụ, adriamycin) hoặc opiat (ví dụ, heroin) hoặc các độc tố hại thận khác); bệnh Fabry, lây nhiễm (ví dụ, HIV, giang mai, viêm gan A, B hoặc C, lây nhiễm sau liên cầu khuẩn, bệnh sán máng tiết niệu); axit amin niệu, hội chứng Fanconi, chứng xơ cứng thận tăng huyết áp, bệnh viêm thận kẽ, bệnh hồng cầu hình liềm, hemoglobin-niêu, đa u tủy, myoglobin-niêu, chứng thải loại cơ quan (ví dụ, chứng thải loại mảnh cấy ghép thận), xuất huyết sốt ebola, hội chứng móng tay xương bánh chè, sốt Địa Trung Hải theo gia đình, hội chứng HELLP, luput ban đỏ toàn thân, bệnh u hạt Wegener, viêm khớp dạng thấp, bệnh dự trữ glycogen typ 1, hội chứng Goodpasture, ban xuất huyết Henoch-Schönlein, lây nhiễm đường tiết niệu lan đến thận, hội chứng Sjögren và viêm thận

tiểu cầu sau lây nhiễm.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là phản ứng viêm kết quả từ sự cấy ghép mô hoặc cơ quan rắn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, cấy ghép dị mô hoặc cấy ghép khác loại của toàn bộ cơ quan (ví dụ, thận, tim, gan, tụy, phổi, giác mạc và tương tự) hoặc ghép mô (ví dụ, van, gân, tủy xương và tương tự).

Theo một số phương án, rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là tổn thương tái tưới máu do thiếu máu cục bộ (I/R), bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, I/R cơ tim, I/R dạ dày-ruột, I/R thận, và I/R sau đó sửa chữa phình động mạch chủ, I/R liên quan đến sun tim phổi, I/R não, đột quy, mảnh ghép cơ quan hoặc gắn lại chi hoặc ngón bị đứt rời hoặc bị chấn thương; sự tái phân bố mạch cho mảnh ghép và/hoặc cấy lại, và phương pháp hồi sức huyết động lực sau quy trình sốc và/hoặc phẫu thuật.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là biến chứng liên quan đến đái tháo đường không do béo phì (đái tháo đường typ 1 hoặc bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin) và/hoặc các biến chứng liên quan đến đái tháo đường typ-1 hoặc typ-2 (khởi phát ở người trưởng thành) bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở bệnh mạch máu đái tháo đường, bệnh thần kinh đái tháo đường, bệnh võng mạc đái tháo đường hoặc phù điểm vàng do đái tháo đường.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là bệnh hoặc rối loạn tim mạch, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, bệnh viêm thận ban xuất huyết Henoch Schonlein, bệnh viêm mạch liên quan đến luput ban đỏ toàn thân, viêm khớp dạng thấp liên quan đến bệnh viêm mạch (cũng được gọi là viêm khớp dạng thấp ác tính), bệnh viêm mạch miễn dịch phức tạp, và bệnh Takayasu; bệnh cơ tim giãn; bệnh mạch máu đái tháo đường; bệnh Kawasaki (viêm động mạch); vật nghẽn mạch khí tĩnh mạch (VGE); và ức chế chứng tái phát hẹp (van tim) sau khi thay thế stent, phẫu thuật loại bỏ vữa xơ động mạch quay và/hoặc thủ thuật nong lòng động mạch vành qua da (PTCA).

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là rối loạn dạ dày-ruột non do viêm, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, viêm tụy, viêm túi thừa và rối loạn ruột bao gồm bệnh Crohn, viêm ruột kết mạn loét,

hội chứng kích thích ruột và bệnh viêm ruột (IBD).

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là rối loạn ở phổi, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, hội chứng suy hô hấp cấp tính, tổn thương phổi cấp tính liên quan đến việc truyền, tổn thương phổi cấp tính do thiếu máu cục bộ/tái tưới máu, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh hen, bệnh u hạt Wegener, bệnh chống cuộn màng nền (bệnh Goodpasture), hội chứng hô hấp phân su, viêm phổi hô hấp, hội chứng tắc viêm tiểu phế quản, xơ hóa phổi tự phát, tổn thương phổi cấp tính thứ phát thành bong, bệnh phù phổi không từ tim, bệnh suy hô hấp liên quan đến việc truyền và bệnh tràn khí.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là phản ứng viêm được kích hoạt bằng cách tiếp xúc ngoài thân thể và phương pháp bao gồm việc điều trị đối tượng mắc chu trình tuần hoàn ngoài thân thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, sự thẩm tách máu, tách hồng cầu khỏi huyết tương, tách bạch cầu khỏi huyết tương, sự oxy hóa màng ngoài thân thể (ECMO), sự kết tủa LDL oxy hóa màng ngoài thân thể gây ra do heparin (HELP) và sun tim phổi (CPB).

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là viêm khớp do viêm hoặc không do viêm và rối loạn cơ xương khác, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, viêm xương khớp, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp dạng thấp tuổi vị thành niên, bệnh gút, bệnh khớp dây thần kinh, bệnh viêm khớp vảy nến, viêm đốt sống dạng thấp hoặc bệnh khớp cột sống khác và bệnh khớp tinh thể, chứng loạn dưỡng cơ và luput ban đỏ toàn thân (systemic lupus erythematosus - SLE).

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là rối loạn da, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh vảy nến, bệnh da bong tự miễn, chứng nề lớp Malpighi ưa eosin, pemphigut bong, chứng bong biểu bì có bong, viêm da dị ứng, ecpet thời kỳ thai nghén và các rối loạn da khác, và để điều trị vết bỏng do nhiệt và hóa chất bao gồm sự rò rỉ mao dẫn bị gây ra theo đó.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là rối loạn hoặc tổn thương hệ thần kinh ngoại vi (PNS) và/hoặc hệ thần kinh trung ương (CNS) bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh xơ cứng rải rác (MS), bệnh nhược cơ năng (MG), bệnh Huntington (HD), bệnh xơ cứng cột bên teo cơ

(ALS), hội chứng Guillain Barre, tái tưới máu sau khi đột quy, đĩa thoái hóa, chấn thương não, bệnh Parkinson (PD), bệnh Alzheimer (AD), hội chứng MillerFisher, chấn thương não và/hoặc xuất huyết, tổn thương não do chấn thương, sự hủy myelin và viêm màng não.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là bệnh nhiễm khuẩn hoặc tình trạng bệnh kết quả từ bệnh nhiễm khuẩn bao gồm mà không giới hạn bệnh nhiễm khuẩn nghiêm trọng, chứng sốc nhiễm khuẩn, hội chứng suy hô hấp cấp tính kết quả từ bệnh nhiễm khuẩn, chứng tan máu thiếu máu, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân, hoặc sốc xuất huyết.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là rối loạn niệu sinh dục bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, hội chứng đau bàng quang, bệnh cảm giác ở bàng quang, viêm không do vi khuẩn mạn tính và viêm bàng quang kẽ, vô sinh ở đàn ông và phụ nữ, loạn chức năng nhau và sảy thai và chứng tiền kinh nguyệt.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là phản ứng viêm ở đối tượng được điều trị bằng hóa liệu pháp và/hoặc liệu pháp bức xạ, bao gồm mà không giới hạn để điều trị tình trạng bệnh ung thư.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là ung thư phụ thuộc sự tạo mạch, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, (các) khối u rắn, (các) khối u sinh ra từ máu, khối u caxioit nguy cơ cao và di căn khối u.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là khối u lành tính phụ thuộc sự tạo mạch, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở u mạch máu, bệnh ung thư dây thần kinh thính giác, u xơ thần kinh, bệnh mắt hột, khối u caxinoit và u hạt sinh mụn.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là rối loạn nội tiết bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, viêm tuyến giáp Hashimoto, căng thẳng, lo âu và các rối loạn hocmon tiềm năng khác liên quan đến sự giải phóng prolactin được điều hòa, yếu tố phát triển hoặc yếu tố phát triển giống insulin, và cocticotropin hocmon hướng vỏ thượng thận từ tuyến yên.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc

MASP-2 là bệnh hoặc rối loạn về mắt bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác, chứng tăng nhãn áp và viêm nội nhãn.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là bệnh hoặc tình trạng bệnh tạo mạch ở mắt bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở bệnh thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác, viêm màng mạch nhỏ, u hắc sắc tố ở mắt, chứng phát triển thần kinh-mạch giác mạc, mộng nguyên phát, viêm giác mạc mô đệm HSV, sự tạo mạch bạch huyết giác mạc do HSV-1, bệnh võng mạc đái tháo đường tăng sinh, phù điểm vàng do đái tháo đường, bệnh võng mạc do sinh non, tắc tĩnh mạch võng mạc, chứng thải loại mảnh ghép võng mạc, chứng tăng nhãn áp mạch mới, thể thủy tinh xuất huyết thứ phát thành bệnh võng mạc đái tháo đường tăng sinh, viêm tủy sống-thần kinh thị giác và chứng đỏ da.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 là bệnh đông máu trong mạch máu rải rác (DIC) hoặc rối loạn đông máu trung gian bỏ thể khác, bao gồm DIC thứ phát thành bệnh nhiễm khuẩn, chấn thương nghiêm trọng, bao gồm chấn thương thần kinh (ví dụ, tổn thương đầu cấp tính, xem tài liệu Kumura et al., *Acta Neurochirurgica* 85:23-28 (1987), lây nhiễm (vi khuẩn, virus, nấm, ký sinh trùng), ung thư, biến chứng sản khoa, bệnh gan, phản ứng chất độc nghiêm trọng (ví dụ, rắn cắn, côn trùng cắn, đáp ứng truyền), sốc, đột quỵ do nhiệt, chứng thải loại mảnh cấy ghép, bệnh phình mạch động mạch, suy gan, điều trị ung thư bằng hóa liệu pháp hoặc liệu pháp bức xạ, bỏng, hoặc sự tiếp xúc bức xạ ngẫu nhiên.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 được chọn từ nhóm bao gồm hội chứng bức xạ cấp tính, bệnh lắng dày đặc, bệnh Degos, hội chứng chống phospholipid dị thường (CAPS), bệnh Behcet, bệnh cryoglobulin-huyết; hemoglobin-niêu đêm kịch phát ("PNH") và bệnh ngưng kết tố lạnh.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bỏ thể phụ thuộc MASP-2 được chọn từ nhóm bao gồm aHUS, HSCT-TMA, IgAN và luput viêm thận (lupus nephritis - LN).

Hội chứng tan máu tăng ure huyết không điển hình (atypical hemolytic syndrome - aHUS)

Hội chứng tan máu tăng ure huyết không điển hình (atypical hemolytic syndrome - aHUS) là một phần của nhóm tình trạng bệnh được định nghĩa là “bệnh mao mạch huyết khối”. Ở dạng không điển hình của HUS (atypical hemolytic syndrome - aHUS), bệnh này liên quan đến sự điều hòa bổ thể thiếu hụt và có thể là đơn phát hoặc theo gia đình. Trường hợp mắc aHUS theo gia đình liên quan đến các đột biến trong gen mã hóa sự hoạt hóa bổ thể hoặc protein điều hòa bổ thể, bao gồm yếu tố bổ thể H, yếu tố I, yếu tố B, đồng yếu tố màng CD46 cũng như protein 1 liên quan đến yếu tố bổ thể H (CFHR1) và protein 3 liên quan đến yếu tố bổ thể H (CFHR3). (Zipfel, P.F., et al., *PloS Genetics* 3(3):e41 (2007)). Dấu hiệu đồng nhất của mảng đột biến di truyền khác nhau này liên quan đến aHUS là tổ bẩm đối với sự hoạt hóa bổ thể được tăng cường trên bề mặt tế bào hoặc mô. Đối tượng này có nguy cơ phát triển aHUS khi khởi phát ít nhất một hoặc nhiều triệu chứng chỉ định của aHUS (ví dụ, sự có mặt của chứng thiếu máu, chứng thiếu phiên huyết nhỏ và/hoặc bệnh suy thận) và/hoặc sự có mặt của bệnh mao mạch huyết khối trong sinh thiết thu được từ đối tượng. Việc xác định liệu một đối tượng có nguy cơ phát triển aHUS hay không bao gồm việc xác định liệu đối tượng này có tổ bẩm di truyền để phát triển aHUS hay không, việc này có thể được thực hiện bằng cách đánh giá thông tin di truyền (ví dụ, từ cơ sở dữ liệu chứa kiểu gen của đối tượng), hoặc thực hiện ít nhất một kiểm tra sàng lọc di truyền trên đối tượng để xác định sự có mặt hoặc không có mặt của chỉ thị di truyền liên quan đến aHUS (tức là, xác định sự có mặt hoặc không có mặt của đột biến di truyền liên quan đến aHUS trong gen mã hóa yếu tố bổ thể H (CFH), yếu tố I (CFI), yếu tố B (CFB), đồng yếu tố màng CD46, C3, protein 1 liên quan đến yếu tố bổ thể H (CFHR1), hoặc THBD (mã hóa protein thrombomodulin chống đông) hoặc protein 3 liên quan đến yếu tố bổ thể H (CFHR3), hoặc protein 4 liên quan đến yếu tố bổ thể H (CFHR4)) nhờ giải trình tự hệ gen hoặc phân tích đặc hiệu gen (ví dụ, phân tích PCR), và/hoặc xác định liệu đối tượng có tiền sử gia đình mắc aHUS. Các phương pháp sàng lọc di truyền sự có mặt hoặc không có mặt của đột biến di truyền liên quan đến aHUS được thiết kế tốt, ví dụ, xem Noris M et al. “Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome”, ngày 16 tháng 11 năm 2007 [cập nhật ngày 10 tháng 3 năm 2011]. Trong: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™, Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Như được mô tả trong US2015/0166675, trong mô hình thí nghiệm bệnh mao

mạch huyết khối (thrombotic microangiopathy - TMA) *ex vivo* ở người, OMS646 ức chế sự hoạt hóa bổ thể và sự tạo thành cục nghẽn trên tế bào nội mô vi mạch tiếp xúc với mẫu huyết thanh từ bệnh nhân aHUS trong cả giai đoạn cấp tính và khi thuyên giảm. Như được mô tả thêm trong US2017/0137537, dữ liệu thu được trong thử nghiệm lâm sàng pha 2 nhãn mở (dùng trong tĩnh mạch 2-4 mg/kg kháng thể OMS646 ức chế MASP-2 một lần một tuần trong 4 tuần liên tiếp), việc điều trị bằng OMS646 thể hiện hiệu lực ở bệnh nhân mắc aHUS. Tổng số tiểu cầu ở cả ba bệnh nhân mắc aHUS trong đoàn hệ liều trung bình và liều cao (hai ở liều trung bình và một đoàn hệ ở liều cao) trở lại bình thường, sự tăng trung bình có ý nghĩa về mặt thống kê từ đường cơ sở đến xấp xỉ 68.000 tiểu cầu/mL ($p=0,0055$).

TMA liên quan đến mảnh ghép tế bào gốc tạo máu (HSCT-TMA)

TMA liên quan đến mảnh ghép tế bào gốc tạo máu (HSCT-TMA) là biến chứng đe dọa đến tính mạng được kích hoạt bởi sự tổn thương nội mô. Thận là cơ quan bị ảnh hưởng phổ biến nhất, tuy nhiên HSCT-TMA có thể là bệnh đa hệ thống cũng liên quan đến phổi, ruột, tim và não. Thậm chí, sự xuất hiện của TMA nhẹ liên quan đến sự suy yếu thận trong thời gian dài. Sự phát triển của TMA liên quan đến HSCT khác loại sau đó khác nhau về tần suất dựa vào sự thay đổi tiêu chuẩn chẩn đoán và tình trạng và chế độ sinh hoạt phòng bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, bằng các chất ức chế canxi niệu là thuốc dùng thường xuyên nhất được được chỉ ra (Ho VT et al., *Biol Blood Marrow Transplant*, 11(8):571-5, 2005).

Như được mô tả trong US2017/0137537, trong thử nghiệm lâm sàng pha 2 (dùng trong tĩnh mạch 4 mg/kg kháng thể OMS646 ức chế MASP-2 một lần một tuần từ 4 đến 8 tuần liên tiếp), việc điều trị bằng OMS646 cải thiện chỉ thị TMA ở bệnh nhân mắc HSCT-TMA, bao gồm sự cải thiện có ý nghĩa về mặt thống kê của mức LDH và haptoglobin. Các bệnh nhân HSCT-TMA được điều trị bằng OMS646 thể hiện một số khó khăn khó điều trị nhất, nhờ đó chứng minh bằng chứng lâm sàng về tác dụng điều trị của OMS646 ở bệnh nhân mắc HSCT-TMA.

Bệnh thận globulin miễn dịch A (IgAN)

Bệnh thận globulin miễn dịch A (IgAN) là bệnh thận tự miễn dẫn đến viêm trong thận và tổn thương thận. IgAN là bệnh tiểu cầu sơ cấp phổ biến nhất trên tổng cầu. Với tỷ lệ mắc bệnh hằng năm xấp xỉ 2,5 người trên 100.000 người, ước tính rằng

cứ 1 người trong số 1400 người ở Hoa Kỳ sẽ phát triển IgAN. Có đến 40% bệnh nhân mắc IgAN sẽ phát triển bệnh thận giai đoạn cuối (end-stage renal disease - ESRD). Các bệnh nhân thường tiểu ra máu phát hiện được trên kính hiển vi cùng với protein niệu ở mức nhẹ đến trung bình và mức độ suy thận biến đổi (Wyatt R.J., et al., *N Engl J Med* 368(25):2402-14, 2013). Các dấu hiệu lâm sàng như chức năng thận suy yếu, tăng huyết áp bền vững và protein niệu nặng (trên 1 g mỗi ngày) liên quan đến tiên lượng kém (Goto M et al., *Nephrol Dial Transplant* 24(10):3068-74, 2009; Berthoux F. et al., *J Am Soc Nephrol* 22(4):752-61, 2011). Protein niệu là yếu tố tiên lượng mạnh nhất không phụ thuộc vào các yếu tố nguy cơ khác trong nhiều nghiên cứu quan sát rộng và các thử nghiệm sau đó (Coppo R. et al., *J Nephrol* 18(5):503-12, 2005; Reich H. N., et al., *J Am Soc Nephrol* 18(12):3177-83, 2007). Ước tính rằng 15-20% bệnh nhân mắc ESRD khởi phát bệnh trong 10 năm nếu không được điều trị (D'Amico G., *Am J Kidney Dis* 36(2):227-37, 2000). Dấu hiệu chẩn đoán của IgAN là sự vượt trội của chất lắng IgA, một mình hoặc với IgG, IgM, hoặc cả hai, trong màng nâng cuộn mao mạch tiểu cầu.

Như được mô tả trong US2017/0189525, trong thử nghiệm thận nhân mở pha 2 (dùng trong tĩnh mạch 4 mg/kg kháng thể OMS646 ức chế MASP-2 một lần một tuần trong 12 tuần liên tiếp), các bệnh nhân mắc bệnh thận IgA mà được điều trị bằng OMS646 chứng minh sự giảm có ý nghĩa về mặt lâm sàng và có ý nghĩa về mặt thống kê tỷ lệ giữa albumin và creatinin trong nước tiểu (uACR) thông qua thử nghiệm và sự giảm mức protein trong nước tiểu trong 24 giờ từ đường cơ sở đến khi kết thúc điều trị.

Luput viêm thận (lupus nephritis - LN)

Biểu chứng chính của luput ban đỏ toàn thân (systemic lupus erythematosus - SLE) là bệnh viêm thận, cũng được biết là luput viêm thận, được phân loại là dạng thứ cấp của viêm thận tiểu cầu. Lên đến 60% người trưởng thành mắc SLE có một số dạng liên quan đến thận ở giai đoạn muộn trong thời gian mắc bệnh (Koda-Kimble et al., Koda-Kimble and Young's Applied Therapeutics: the clinical use of drugs, 10th Ed, Lippincott Williams & Wilkins: pages 792-9, 2012) có tỷ lệ mắc bệnh là 20-70 người trên 100.000 người ở Hoa Kỳ. Luput viêm thận thường có mặt ở bệnh nhân có các triệu chứng khác của SLE hoạt động, bao gồm mệt mỏi, sốt, ban, viêm khớp, viêm

thanh mạc, hoặc bệnh hệ thần kinh trung ương (Pisetsky D.S. et al., *Med Clin North Am* 81(1):113-28, 1997). Một vài bệnh nhân mắc luput viêm thận không triệu chứng; tuy nhiên, khi theo dõi thường xuyên, các bất thường phát hiện được trong phòng thí nghiệm như mức creatinin trong huyết thanh tăng, mức albumin thấp, hoặc protein trong nước tiểu hoặc cặn nước tiểu gợi ý luput viêm thận hoạt động.

Như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế Mỹ số 15/470,647, trong thử nghiệm thận nhân mở pha 2 (dùng trong tĩnh mạch 4 mg/kg kháng thể OMS646 ức chế MASP-2 một lần một tuần trong 12 tuần liên tiếp), 4 trong số 5 bệnh nhân mắc luput viêm thận (lupus nephritis - LN) được điều trị bằng kháng thể kháng MASP-2 chứng minh sự giảm có ý nghĩa về mặt lâm sàng mức protein trong nước tiểu trong 24 giờ từ đường cơ sở đến khi kết thúc điều trị.

Sử dụng

Chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp, nồng độ cao được mô tả trong bản mô tả này có thể được dùng cho đối tượng cần điều trị bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như bằng việc tiêm hoặc truyền một lần hoặc nhiều lần trong một khoảng thời gian theo cách thích hợp, ví dụ, tiêm hoặc truyền dưới da, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ. Như được mô tả trong bản mô tả này, chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được điều chế ở dạng đơn vị liều để dễ dàng dùng và đồng nhất liều lượng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “dạng liều đơn vị” chỉ các đơn vị riêng rẽ về mặt vật lý thích hợp dưới dạng liều đơn nhất cho đối tượng cần điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hợp chất có hoạt tính được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn liên quan đến dung dịch được phẩm chứa nước được chọn.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của kháng thể ức chế MASP-2 sẽ tùy thuộc vào loại bệnh được điều trị, mức độ nghiêm trọng và giai đoạn của bệnh. Kháng thể được dùng thích hợp cho bệnh nhân ở một thời điểm hoặc qua loạt điều trị. Tùy thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, kháng thể ức chế MASP-2 có thể được dùng ở liều cố định, hoặc ở liều miligam trên kilogam (mg/kg). Liều lượng làm ví dụ của kháng thể ức chế MASP-2 được chứa trong chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này bao gồm, ví dụ, từ khoảng 0,05 mg/kg đến khoảng 20 mg/kg, như khoảng 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg,

8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg hoặc 20 mg/kg có thể được dùng hằng ngày, hai lần một tuần, một lần một tuần, hai tuần một lần hoặc hằng tháng.

Liều lượng cố định làm ví dụ của kháng thể ức chế MASP-2, như chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này bao gồm, ví dụ, từ khoảng 10 mg đến khoảng 1000 mg, như từ khoảng 50 mg đến khoảng 750 mg, như từ khoảng 100 mg đến khoảng 500 mg, như từ khoảng 200 mg đến khoảng 400 mg, như khoảng 200 mg, khoảng 225 mg, khoảng 250 mg, khoảng 275 mg, khoảng 300 mg, khoảng 325 mg, khoảng 350 mg, khoảng 375 mg hoặc khoảng 400 mg có thể được dùng hằng ngày, hai lần một tuần, một lần một tuần, hai tuần một lần hoặc hằng tháng.

Liên quan đến thể tích phân phối của chế phẩm, nồng độ của kháng thể trong chế phẩm được sử dụng để áp dụng điều trị được xác định dựa vào việc cung cấp kháng thể ở liều lượng và thể tích được dung nạp bởi bệnh nhân và ở liều lượng và thể tích của giá trị điều trị cho bệnh nhân. Đối với chế phẩm chứa kháng thể điều trị được dùng bằng cách tiêm, nồng độ kháng thể sẽ tùy thuộc vào thể tích tiêm (thường nằm trong khoảng từ 0,5 mL đến 3 mL). Liệu pháp dựa vào kháng thể có thể yêu cầu vài mg/kg liều mỗi ngày, mỗi tuần, mỗi tháng hoặc nhiều tháng. Do đó, nếu kháng thể ức chế MASP-2 được cung cấp với lượng nằm trong khoảng từ 1mg/kg đến 5 mg/kg khối lượng cơ thể của bệnh nhân (ví dụ, 1mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg hoặc 5 mg/kg), và bệnh nhân trung bình nặng 75 kg, thì sau đó từ 75 mg đến 375 mg kháng thể sẽ cần được phân phối ở thể tích tiêm nằm trong khoảng từ 0,5 mL đến 3,0 mL. Theo cách khác, chế phẩm được cung cấp ở nồng độ thích hợp để phân phối ở nhiều hơn một vị trí tiêm mỗi lần điều trị.

Theo phương án được ưu tiên trong đó nồng độ của kháng thể OMS646 trong chế phẩm là khoảng 185 mg/mL, cho liều lượng nằm trong khoảng từ 1 mg/kg đến 5 mg/kg khối lượng cơ thể của bệnh nhân (giả sử 75 kg), chế phẩm này sẽ được phân phối dưới da trong khoảng từ khoảng 0,40 mL đến khoảng 2,0 mL thể tích tiêm.

Như được mô tả trong bản mô tả này, chế phẩm theo sáng chế thích hợp cho cả việc dùng liều trong tĩnh mạch (intravenous - i.v.) và dùng dưới da (subcutaneous - s.c.).

Tùy thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, kháng thể ức chế

MASP-2 có thể được dùng trong tĩnh mạch ở liều cố định, hoặc ở liều miligam trên kilogam (mg/kg). Liều lượng làm ví dụ của kháng thể ức chế MASP-2 được chứa trong chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được phân phối trong tĩnh mạch bằng cách pha loãng lượng thích hợp của chế phẩm có nồng độ cao được mô tả trong bản mô tả này bằng chất pha loãng được dụng trước khi dùng sao cho kháng thể ức chế MASP-2 được dùng cho đối tượng là người ở liều lượng ví dụ, từ khoảng 0,05 mg/kg đến khoảng 20 mg/kg, như khoảng 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg hoặc 20 mg/kg có thể được dùng hằng ngày, hai lần một tuần, một lần một tuần, hai tuần một lần hoặc hằng tháng.

Kháng thể ức chế MASP-2 cũng có thể được phân phối trong tĩnh mạch ở liều lượng cố định bằng cách pha loãng lượng thích hợp của chế phẩm có nồng độ cao được mô tả trong bản mô tả này bằng chất pha loãng được dụng trước khi dùng sao cho kháng thể ức chế MASP-2 được dùng cho đối tượng là người ở liều lượng nằm trong khoảng từ khoảng 10 mg đến khoảng 1000 mg, như từ khoảng 50 mg đến khoảng 750 mg, như từ khoảng 100 mg đến khoảng 500 mg, như từ khoảng 200 mg đến khoảng 400 mg, như từ khoảng 200 mg, khoảng 225 mg, khoảng 250 mg, khoảng 275 mg, khoảng 300 mg, như từ khoảng 300 mg đến khoảng 400 mg, như khoảng 310 mg, khoảng 320 mg, khoảng 325 mg, khoảng 330 mg, khoảng 340 mg, khoảng 350 mg, khoảng 360 mg, khoảng 370 mg, khoảng 375 mg, khoảng 380 mg, khoảng 390 mg hoặc khoảng 400 mg có thể được dùng hằng ngày, hai lần một tuần, một lần một tuần, hai tuần một lần hoặc hằng tháng.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 được pha loãng thành chất pha loãng được dụng trước khi phân phối toàn thân (ví dụ, trong tĩnh mạch). Chất pha loãng làm ví dụ có thể được sử dụng bao gồm nước để tiêm, dextroza 5%, nước muối 0,9%, dung dịch Ringers và các chất pha loãng được dụng khác thích hợp để phân phối trong tĩnh mạch. Mặc dù không được dự định là hạn chế cách nào, nhưng liều lượng làm ví dụ của kháng thể ức chế MASP-2 được dùng trong tĩnh mạch để điều trị cho đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn bẩm sinh phụ thuộc MASP-2 bao gồm, ví dụ, từ khoảng 0,05 mg/kg đến khoảng 20 mg/kg, như khoảng 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg,

12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg hoặc 20 mg/kg có thể được dùng hằng ngày, hai lần một tuần, một lần một tuần, hai tuần một lần hoặc hằng tháng. Liều lượng cố định làm ví dụ của kháng thể ức chế MASP-2 được phân phối trong tĩnh mạch để điều trị cho đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn bổ thể phụ thuộc MASP-2 bao gồm, ví dụ, từ khoảng 10 mg đến khoảng 1000 mg, như từ khoảng 50 mg đến khoảng 750 mg, như từ khoảng 100 mg đến khoảng 500 mg, như từ khoảng 200 mg đến khoảng 400 mg, như từ khoảng 200 mg, khoảng 225 mg, khoảng 250 mg, khoảng 275 mg, khoảng 300 mg, khoảng 325 mg, khoảng 350 mg, khoảng 375 mg hoặc khoảng 400 mg có thể được dùng hằng ngày, hai lần một tuần, một lần một tuần, hai tuần một lần hoặc hằng tháng.

Theo một số phương án, chế phẩm được pha loãng thành chất pha loãng được dụng và được dùng cho đối tượng cần điều trị với liều nạp trong tĩnh mạch ban đầu (ví dụ, từ khoảng 300 mg đến khoảng 750 mg, như từ khoảng 400 mg đến khoảng 750 mg, như từ khoảng 300 mg đến khoảng 500 mg, như từ khoảng 300 mg đến khoảng 400 mg, như khoảng 300 mg, khoảng 310 mg, khoảng 320 mg, khoảng 330 mg, khoảng 340 mg, khoảng 350 mg, khoảng 360 mg, khoảng 370 mg, khoảng 380 mg, khoảng 390 mg hoặc khoảng 400 mg), sau đó là một hoặc nhiều liều tiêm chế phẩm dưới da với liều lượng nằm trong khoảng từ 1mg/kg đến 5 mg/kg khối lượng cơ thể, hoặc liều lượng cố định nằm trong khoảng từ khoảng 100 mg đến khoảng 400 mg, như khoảng 100 mg, khoảng 150 mg, khoảng 200 mg, khoảng 250 mg, khoảng 300 mg, khoảng 350 mg hoặc khoảng 400 mg. Ví dụ, liều nạp trong tĩnh mạch ban đầu có thể là đường dùng được ưu tiên cụ thể ví dụ, như khi bệnh nhân trong bệnh viện hoặc trong phòng khám và đang mắc tình trạng bệnh cấp tính (ví dụ, aHUS) mà yêu cầu liều nạp ban đầu sau đó là liều duy trì bằng việc tiêm chế phẩm dưới da.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế còn được minh họa trong các ví dụ dưới đây, các ví dụ này không nên được hiểu là để hạn chế. Tất cả các trích dẫn tài liệu trong bản mô tả này được đưa vào phần mô tả này bằng cách viện dẫn.

Ví dụ 1

Ví dụ này chứng minh rằng OMS646, kháng thể đơn dòng hướng đích MASP-2 ở người, gắn với MASP-2 ở người có ái lực cao và phong bế hoạt động bổ thể của

con đường lectin.

Tình trạng kỹ thuật

Kháng thể đơn dòng đầy đủ ở người hướng đích MASP-2 ở người (được nêu trong SEQ ID NO:1), được gọi là “OMS646” được tạo ra như được mô tả trong WO2012/151481, được đưa vào phần mô tả này bằng cách viện dẫn. Kháng thể đơn dòng OMS646 này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) được nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) được nêu trong SEQ ID NO:3. OMS646 được cấu thành bởi các vùng biến đổi có nguồn gốc từ người dung hợp với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4 và vùng không đổi chuỗi nhẹ lambda ở người và được tiết ra dưới dạng tetrame glycosyl hóa liên kết disulfua gồm hai chuỗi nặng tương đồng (có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:5) và hai chuỗi nhẹ lambda tương đồng (có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:5). Gốc asparagin (N) ở vị trí 295 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:4) được glycosyl hóa và được chỉ ra bằng chữ in đậm và gạch chân.

Vùng biến đổi chuỗi nặng

Được thể hiện dưới đây là trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) đối với OMS646. Kabat CDR (31-35 (H1), 50-65 (H2) và 95-107 (H3)) được in đậm; và Chothia CDR (26-32 (H1), 52-56 (H2) và 95-101 (H3)) được gạch chân.

Vùng biến đổi chuỗi nặng OMS646 (VH) (SEQ ID NO:2)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSL**SRGKM**GVSWIRQPPGKALEW**LAH**
IFSSDEKSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVD**TATYYCAR****IRRG**
IDYWGQGLTVTVSS

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ

Được thể hiện dưới đây là trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) đối với OMS646. Kabat CDR (24-34 (L1); 50-56 (L2) và 89-97 (L3)) được gạch chân. Các vùng này là giống nhau nếu được đánh số bởi hệ thống Kabat hoặc Chothia.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ OMS646 (VL) (SEQ ID NO:3)

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCS**GEKLGD**KYAYWYQQKPGQSPVLV**MYQDK**
QRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC**AWDSSTA**VFGGGTKL
 TVL

Polypeptit có chiều dài đầy đủ có chuỗi nặng IgG4 bị đột biến chuỗi nặng OMS646 (445 aa) (SEQ ID NO:4)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHI
FSSDEKSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARIRRGID
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

Polypeptit có chiều dài đầy đủ chuỗi nhẹ OMS646 (212 aa) (SEQ ID NO:5)

QPVLTPPPSLVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMYQDKQ
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTV
LGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG
VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC
S

Như được mô tả trong WO2012/151481, OMS646 gắn với MASP-2 và ức chế chọn lọc con đường lectin và về cơ bản không ức chế con đường cổ điển (tức là, ức chế con đường lectin trong khi để nguyên con đường bổ thể cổ điển) và cũng thể hiện ít nhất một hoặc nhiều các đặc điểm dưới đây: kháng thể này gắn MASP-2 ở người có K_D nhỏ hơn hoặc bằng 10 nM, kháng thể này gắn epitop trong miền CCP1 của MASP-2, kháng thể này ức chế sự lắng đọng C3b trong thử nghiệm in vitro trong huyết thanh người 1% ở IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 10 nM, kháng thể này ức chế sự lắng đọng C3b trong huyết thanh người 90% có IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 30 nM, trong đó kháng thể này là mảnh kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm Fv, Fab, Fab', F(ab)2 và F(ab')2, trong đó kháng thể này là phân tử chuỗi đơn, trong đó kháng thể này là phân tử IgG2, trong đó kháng thể này là phân tử IgG1, trong đó kháng thể này là phân tử IgG4, trong đó phân tử IgG4 này chứa đột biến S228P.

Như được mô tả trong WO2012/151481, OMS646 được xác định là gắn chặt với MASP-2 ở người (SEQ ID NO:1) có độ chọn lọc >5000 lần khi so với C1s, C1r, MASP-1 hoặc MASP-3. Như được thể hiện trong ví dụ này, OMS646 gắn đặc hiệu với MASP-2 ở người có ái lực cao và có khả năng phong bế hoạt động bổ thể của con đường lectin.

Như được thể hiện ở trên, OMS646 chứa (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin từ 31-35 của SEQ ID NO:2, ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin từ 50-65 của SEQ ID NO:2, và iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin từ 95-107 của SEQ ID NO:2; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa: i) CDR-L1 chứa trình tự axit amin từ 24-34 của SEQ ID NO:3, ii) CDR-L2 chứa trình tự axit amin từ 50-56 của SEQ ID NO:3, và iii) CDR-L3 chứa trình tự axit amin từ 89-97 của SEQ ID NO:3.

Như được mô tả thêm trong WO2012/151481, biến thể của OMS646, có vùng biến đổi chuỗi nặng có độ đồng nhất ít nhất 95% với SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có độ đồng nhất ít nhất 95% với SEQ ID NO:3 được chứng minh là có hoạt động chức năng tương tự OMS646. Biến thể OMS646 được mô tả trong WO2012/151481 chứa a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa: SEQ ID NO:2, hoặc biến thể của chúng chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 95% với SEQ ID NO:2, trong đó gốc 31 là R, gốc 32 là G, gốc 33 là K, gốc 34 là M, gốc 35 là G, gốc 36 là V, gốc 37 là S, gốc 50 là L, gốc 51 là A, gốc 52 là H, gốc 53 là I, gốc 54 là F, gốc 55 là S, gốc 56 là S, gốc 57 là D, gốc 58 là E, gốc 59 là K, gốc 60 là S, gốc 61 là Y, gốc 62 là R, gốc 63 là T, gốc 64 là S, gốc 65 là L, gốc 66 là K, gốc 67 là S, gốc 95 là Y, gốc 96 là Y, gốc 97 là C, gốc 98 là A, gốc 99 là R, gốc 100 là I, gốc 101 là R, gốc 102 là R hoặc A, gốc 103 là G, gốc 104 là G, gốc 105 là I, gốc 106 là D và gốc 107 là Y; và b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa: SEQ ID NO:3 hoặc biến thể của chúng chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 95% với SEQ ID NO:3, trong đó gốc 23 là S, gốc 24 là G, gốc 25 là E hoặc D, gốc 26 là K, gốc 27 là L, gốc 28 là G, gốc 29 là D, gốc 30 là K, gốc 31 là Y hoặc F, gốc 32 là A, gốc 33 là Y, gốc 49 là Q, gốc 50 là D, gốc 51 là K hoặc N, gốc 52 là Q hoặc K, gốc 53 là R, gốc 54 là P, gốc 55 là S, gốc 56 là G, gốc 88 là Q, gốc 89 là A, gốc 90 là W, gốc 91 là D, gốc 92 là S, gốc 93 là S, gốc 94 là T, gốc 95 là A, gốc 96 là V và gốc 97 là F.

1. OMS646 phong bế đặc hiệu sự hoạt hóa phụ thuộc lectin của các thành phần bổ thể đầu tận cùng

Phương pháp:

Hiệu quả của OMS646 đối với sự lắng đọng phức chất tấn công màng (membrane attack complex - MAC) được phân tích bằng cách sử dụng các điều kiện

cụ thể cho từng con đường đối với con đường lectin, con đường cổ điển và con đường thay thế. Đối với mục đích này, kit sàng lọc bổ thể Wieslab Comp300 (Wieslab, Lund, Sweden) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kết quả:

Fig.1A minh họa dưới dạng biểu đồ lượng lắng đọng MAC phụ thuộc con đường lectin trong sự có mặt lượng kháng thể ức chế MASP-2 ở người (OMS646) khác nhau. Fig.1B minh họa dưới dạng biểu đồ lượng lắng đọng MAC phụ thuộc con đường cổ điển khi có mặt kháng thể ức chế MASP-2 ở người (OMS646). Fig.1C minh họa dưới dạng biểu đồ lượng lắng đọng MAC phụ thuộc con đường thay thế trong sự có mặt lượng kháng thể ức chế MASP-2 ở người (OMS646) khác nhau. Như được thể hiện trên Fig.1A, OMS646 phong bế sự hoạt hóa sự lắng đọng MAC trung gian con đường lectin có giá trị IC_{50} xấp xỉ 1 nM. Tuy nhiên, OMS646 không có tác dụng đối với sự lắng đọng MAC được tạo ra từ sự hoạt hóa trung gian con đường cổ điển (Fig.1B) hoặc từ sự hoạt hóa trung gian con đường thay thế (Fig.1C).

Ví dụ 2

Nghiên cứu tiền chế phẩm chứa OMS646

Tình trạng kỹ thuật/Cơ sở kỹ thuật:

Thành phần của chế phẩm protein có độ nhớt giảm được xác định bằng việc xem xét nhiều yếu tố bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: bản chất của protein, nồng độ của protein, khoảng pH được mong đợi, nhiệt độ mà ở nhiệt độ này chế phẩm protein được bảo quản, khoảng thời gian chế phẩm protein được bảo quản, và chế phẩm được dùng cho bệnh nhân như thế nào. Đối với chế phẩm có độ nhớt giảm được dùng bằng cách tiêm, thì nồng độ protein tùy thuộc vào thể tích tiêm (thường nằm trong khoảng từ 1,0 mL đến 2,25 mL). Nếu protein được cung cấp trong khoảng từ 2 đến 4 mg/kg khối lượng cơ thể của bệnh nhân, và bệnh nhân trung bình nặng 75 kg, thì sau đó 150 mg-300 mg protein sẽ cần được phân phối trong thể tích tiêm nằm trong khoảng từ 1,0 mL đến 1,62 mL. Độ nhớt được duy trì lý tưởng dưới khoảng 25 cP để đảm bảo sản phẩm điều trị dưới da có thể dùng ống tiêm trên thực tế. Theo một số phương án, độ nhớt được duy trì dưới khoảng 20 cP để cho phép phân phối sản phẩm điều trị bằng thiết bị tiêm, và cũng cho phép nhiều loại xử lý sinh học, như lọc

dòng tuyến tính.

Mục đích chính của các nghiên cứu này là để xác định thành phần chế phẩm mà sẽ dẫn đến độ ổn định hóa học, vật lý và cấu trúc của kháng thể OMS646 trong chế phẩm lỏng dẫn đến chế phẩm ổn định có độ nhớt nhỏ hơn 25 cP, như nhỏ hơn 20 cP, có nồng độ OMS646 cao (100 mg/mL hoặc cao hơn) thích hợp để tiêm dưới da vào đối tượng là người.

Các phương pháp phân tích:

Để kiểm tra sự kết hợp của đệm và tá dược khác nhau, chất điều chế được tinh chế của kháng thể OMS646 (102 mg/mL trong 20 mM natri axetat, 50 mg/mL sorbitol, pH 5,0) được pha loãng đến ~ 1 mg/mL trong dung dịch chế phẩm được chọn và 4 mL thể tích được đặt trong máy cô được rửa trước bằng đệm thích hợp. Từng đơn vị được quay đến ~ 1 mL ở 3200 x g. Quy trình này được lặp lại trong tổng số ba vòng trao đổi đệm.

Về bên ngoài của chế phẩm được đánh giá bằng cách sử dụng đèn quan sát máy Eisai, mẫu MIH-DX chống nước bằng cách sử dụng nền trắng và đen. Từng mẫu chế phẩm được kiểm tra màu sắc, độ trong (trắng đục), và sự có mặt của vật chất dạng hạt.

Hàm lượng protein của chế phẩm OMS646 được xác định bằng cách sử dụng hệ số suy giảm bằng 1,49 mL/mg*cm. Việc đo độ hấp thụ ở 280 nm với việc hiệu chỉnh độ hấp thụ ở 320 nm được thực hiện bằng cách sử dụng cuvet dùng một lần và chiều dài đường đi bằng 0,2 cm. Mẫu được điều chế bằng cách pha loãng hai lần bằng nước muối đệm phosphat Dulbecco (DPBS) 1 lần đến nồng độ cuối cùng bằng ~2 mg/mL. Đối với các mẫu có nồng độ cao, các dung dịch nguyên chất được pha loãng lần thứ nhất theo tỷ lệ 1:1 trong đệm chế phẩm, và sau đó được pha loãng đến ~2 mg/mL trong DPBS 1 lần. Tính trung bình kết quả đo hai lần đối với từng mẫu, và phần trăm độ lệch chuẩn tương đối (relative standard deviation - RSD) được tính toán. Đối với mẫu đo hai lần bất kỳ thể hiện > 5% RSD, thì bộ dung dịch pha loãng thêm được chuẩn bị và đo.

Nồng độ protein được tính toán như dưới đây:

$$A_{280} \text{ được hiệu chỉnh} = A_{280} - A_{320}$$

Nồng độ protein (mg/mL) = (A280 được hiệu chỉnh * Yếu tố pha loãng)/ 1,49 mL/mg*cm

Để đánh giá độ đục/sự tán xạ ánh sáng của mẫu, 100 μ L mẫu chưa pha loãng được đo ở 320 nm trong cuvet dùng một lần sử dụng chiều dài đường đi 1 cm. Đối với từng mẫu, quang phổ kế được làm trống bằng dung dịch trao đổi đệm thích hợp mà không có mặt protein. Sau khi đo, các mẫu được thu hồi và được sử dụng để phân tích độ pH. Để bình thường hóa phép đo độ đục đối với nồng độ mẫu, A320 cũng được chia bởi nồng độ có đơn vị mg/mL và giá trị tạo thành có đơn vị mAU*mL/mg được báo cáo.

Phép đo độ pH của tất cả chế phẩm và dung dịch được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng bằng cách sử dụng dụng cụ đo SevenMulti chia độ (Mettler Toledo) có điện cực bù nhiệt độ tự động.

Độ ổn định nhiệt của chế phẩm OMS646 được theo dõi bởi phép đo nhiệt quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC). Số liệu nhiệt độ nóng chảy (T_m) đối với mAb được thu bằng cách sử dụng DSC mao dẫn MicroCal. Mẫu protein được pha loãng đến nồng độ cuối cùng bằng ~2 mg/ml trong dung dịch trao đổi đệm thích hợp. Việc đánh giá mẫu bằng DSC được thực hiện bằng cách quét ở nhiệt độ từ 20 đến 110°C ở 1°C/phút hoặc 2°C/phút. Bộ ổn nhiệt trước khi quét được cài đặt 10 phút, bộ ổn nhiệt sau khi quét được cài đặt 0 phút, và bộ ổn nhiệt chu trình sau được cài đặt đến nhiệt độ 25°C. Để phân tích số liệu T_m , số liệu quét đệm-đệm được trừ từ số liệu quét đệm-mẫu và sau đó biểu đồ nhiệt được bình thường hóa đến nồng độ protein (mol) sử dụng khối lượng phân tử ước tính bằng 150 kDa. Đường cơ sở tiến triển được tạo ra và được trừ từ dữ liệu để thuận tiện xác định T_m . Nhiệt độ nóng chảy được xác định bằng cách sử dụng hàm số đỉnh chọn của phần mềm khoa học Origin® có liên quan.

Sự tán xạ ánh sáng động (dynamic light scattering - DLS) đo sự dao động phụ thuộc thời gian trong cường độ của ánh sáng tán xạ từ các hạt trong mẫu, trong đó phương trình Stokes Einstein được sử dụng để tính toán bán kính thủy động lực của (các) hạt trong dung dịch. Các thí nghiệm DLS đối với chế phẩm OMS646 được thực hiện với mẫu chưa pha loãng hai lần (30 - 40 μ L) bằng cách sử dụng dụng cụ bộ đọc tấm II DynaPro™ (Wyatt). Tổng số 10 lần quét riêng rẽ được thực hiện ở nhiệt độ

25°C, có thời gian thu nhận bằng 5 giây. Độ nhớt được cài đặt đến độ nhớt của nước muối đệm phosphat, 1,019 cP. Sơ đồ phân bố cường độ tạo thành được so sánh để đánh giá tác dụng của các thành phần chế phẩm khác nhau đối với kích cỡ hạt trung bình bởi cường độ (đường kính tổng thể), thông số chiều rộng phân phối kích cỡ tổng thể (phần trăm đa phân tán tổng thể, hoặc % Pd), đường kính đỉnh trung bình của monome OMS646 (đường kính đỉnh 2) và đường kính chiều rộng của đỉnh (đỉnh 2 % Pd). Phần trăm đa phân tán (tổng thể hoặc đỉnh 2) là đường kính chiều rộng mà phản ánh tính không đồng nhất được phát hiện trong sơ đồ phân bố cường độ, trong đó % Pd < 20% chỉ ra dung dịch đơn phân tán gần và/hoặc hình dạng các loại gần.

Độ ổn định chống lại sự biến tính hóa học được đánh giá bằng cách sử dụng hệ biến tính hóa học đẳng nhiệt AVIA (mô hình 2304), mà kiểm tra độ ổn định hóa học trong điều kiện môi trường xung quanh theo hình thức tự động bằng cách tạo ra gradien biến tính bằng cách trộn thể tích không đổi của protein được bào chế với đệm chế phẩm và đệm chế phẩm chứa ure. Tóm lại, protein đã chuẩn bị được pha loãng đến 0,33 mg/mL trong đệm chế phẩm. Đối với chế phẩm nhất định, đệm chế phẩm thứ hai chứa ure 10M cũng được điều chế. Do vấn đề về độ hòa tan, nên dung dịch ure 9M được điều chế cho chế phẩm chứa sucroza và sorbitol. Sau thời gian ủ đồng nhất (~30 phút), huỳnh quang protein nội tại (tức là, huỳnh quang tryptophan) được đo đối với từng điểm số liệu, trong đó sự không gấp nếp hóa học của protein dẫn đến sự tiếp xúc của tryptophan chìm trong dung môi có sự dịch chuyển về phía màu đỏ liên quan trong tín hiệu huỳnh quang. Đối với từng chế phẩm, số liệu thu được đối với tổng số 24 nồng độ ure (0-9,0M đối với dung dịch gốc ure 10 M và 0-8,1M đối với dung dịch gốc ure 9M), và tỷ lệ của Abs350/Abs330 được sử dụng cho việc trừ đường cơ sở của sự thay đổi huỳnh quang cơ sở, và bình phương tối thiểu phi tuyến tính lắp vào số liệu chuyển không gấp nếp được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình 2 trạng thái hoặc 3 trạng thái.

Độ nhớt của chế phẩm được xác định bằng cách sử dụng nhớt kế hoặc lưu biến kế kiểu thả bi. Tất cả phép đo độ nhớt được thực hiện ở nhiệt độ 25°C có tốc độ trượt nằm trong khoảng từ 0,5 giây⁻¹ đến 1000 giây⁻¹. Phép đo kiểu thả bi được thực hiện bằng cách sử dụng nhớt kế Anton Paar AMVn. Đối với phép đo độ nhớt kiểu thả bi, thời gian bi vàng mất để đi qua một khoảng trong mao dẫn đã nạp mẫu được đo sau khi nghiêng mao dẫn đến góc được định trước (80 độ). Các mao dẫn được nghiêng

tổng cộng ba lần và các kết quả được tính trung bình để xác định độ nhớt động cuối cùng, giá trị không phụ thuộc tỷ trọng mẫu. Đối với phép đo kiểu thả bi, mao dẫn đầu tiên được làm sạch sử dụng nước DI và metanol. Sự chia độ của dụng cụ/mao dẫn được xác định bằng phép đo 10 cP, 50cP và/hoặc 100 cP chuẩn độ nhớt Brookfield. Mao dẫn được làm sạch lần nữa bằng nước DI và metanol trước và giữa mỗi phép đo mẫu.

Phép đo độ nhớt dựa vào lưu biến kế được thực hiện bằng cách sử dụng lưu biến kế siêu lập trình DV-III được chia độ bằng chất lỏng chuẩn độ nhớt Brookfield #10 và #50. 0,5 mL mỗi mẫu được đo ở tốc độ trục chính khác nhau (tốc độ trượt). Các mẫu thể hiện kết quả đọc độ nhớt (cP) <10% RSD đối với tất cả tốc độ trượt được xem là Newton trên khoảng này, trong khi các mẫu có độ nhớt phụ thuộc tốc độ trượt được xem là phi Newton.

Phép đo tỷ trọng được thực hiện bằng cách sử dụng vi quang kế Anton Paar DMA 4500M. Tóm lại, dụng cụ này được phun bằng nước DI nhiều lần sau đó là metanol. Dụng cụ này được chia độ đối với không khí và nước trước khi đo tỷ trọng của nước làm mẫu. Dụng cụ này được rửa lần nữa bằng nước và metanol và phép đo từng mẫu được thực hiện trên ~175 mg/mL nguyên liệu gom được từ nhiều chế phẩm. Giá trị báo cáo được sử dụng là xấp xỉ tỷ trọng hợp lý đối với chế phẩm OMS646 có nồng độ cao được sử dụng trong các phép đo lượng trọng lực.

Phép đo nồng độ molal đồng thẩm thấu được thực hiện bằng cách sử dụng thẩm thấu kế đo sự hạ điểm đông lạnh (Multi-Osmette Osmometer, Precision Systems model 2430), đo sự giảm điểm đông lạnh của dung dịch khi nồng độ chất tan tăng.

Hệ đếm hạt trong chất lỏng (mô hình Hach 9703, mô hình bộ cảm biến: HRLD-150) được sử dụng để xác định kích cỡ và độ phong phú hạt trong mẫu chế phẩm OMS646. Số liệu mẫu thu được bằng cách sử dụng 500 μ L mẫu hút một lần (200 μ L thể tích bi). Tóm lại, dụng cụ này được làm ấm trong ~30 phút và cả ống tiêm (1 mL) và hệ này được phun nước khử ion trong ít nhất 10 chu trình trước khi sử dụng. Sự thích hợp về môi trường được kiểm tra bằng cách thể hiện rằng 25 mL nước khử ion chứa không nhiều hơn 25 hạt $\geq 10 \mu$ m về kích cỡ. Sự thích hợp về hệ thống được xác nhận bằng cách phân tích chỉ 500 μ L lượng chất chuẩn 2, 5, 10 và 15 μ M được hút bằng cách sử dụng kích cỡ kênh thích hợp. Nếu lượng tích lũy/mL được phát

hiện trong bản mô tả để làm chuẩn, thì sau đó hệ này được cho là thích hợp để kiểm tra mẫu. Trước khi đo mẫu lần thứ nhất, hệ này được phun một lần bằng nước muối đệm phosphat (PBS) 1 lần để đảm bảo rằng các mẫu này không kết tủa khi tiếp xúc với nước khử ion. Các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng 500 μ L mẫu hút một lần, và lượng tích lũy/mL đối với các kênh 2 μ m, 5 μ m, 10 μ m và 25 μ m được xác định đến số gần nhất.

Sắc ký loại trừ kích cỡ (size exclusion chromatography - SEC) được sử dụng để đánh giá số lượng sản phẩm kết tụ và các sản phẩm phân hủy có trong chế phẩm OMS646. Tóm lại, hệ thống Agilent 1100 HPLC được lắp vào cột G3000SWxl SEC (Tosoh, 7,8 x 300 mm, 5 μ m kích cỡ hạt). Mẫu chế phẩm OMS646 được pha loãng đến 2,5 mg/mL trong pha động SEC (140 mM kali phosphat, 75 mM kali clorua, pH 7,0) và 20 μ L mẫu được tiêm vào cột HPLC. Hệ thống này chạy bằng cách sử dụng lưu lượng bằng 0,4 mL/phút, và protein rửa giải được phát hiện bằng sự hấp thụ ở 280 nm (độ rộng dải bằng 4 nm) không có sự hiệu chỉnh tham chiếu. Để đánh giá sự thích hợp về hệ thống, tất cả các mẫu được xếp bởi mẫu trống ở pha động và sự tiêm đạt chuẩn lọc gel, và nguyên liệu tham chiếu được tiêm hai lần khi bắt đầu quy trình. Phần trăm độ phong phú đối với các loại riêng rẽ và các loại có tổng khối lượng phân tử cao (high molecular weight - HMW) và các loại có khối lượng phân tử thấp (low molecular weight - LMW), ngoài phần trăm monome và tổng diện tích đỉnh nguyên vẹn được xác định.

Sự phân tích bằng điện di gel mao dẫn SDS khử (SDS-CE) được thực hiện bằng hệ điện di mao dẫn Beckman Coulter PA 800 Plus và môđun phát hiện PDA, bằng cách sử dụng kit phân tích SDS-MW. Các mẫu và đối chứng đầu tiên được pha loãng đến 1,0 mg/mL trong đệm mẫu SDS-MW. 5 μ L β -mercaptoetanol và 2 μ L chất chuẩn nội (10 kDa) được bổ sung vào 95 μ L dung dịch làm việc này. Tất cả các mẫu được ly tâm ở 300 x g trong 1 phút, được gia nhiệt ở nhiệt độ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ trong ~10 phút, và được chuyển vào lọ nhỏ PCR và được giữ ở nhiệt độ 25°C cho đến khi phân tích. Việc tách được thực hiện bằng cách tác dụng 15 kV (độ phân cực ngược) đi qua mao dẫn trong 30 phút và tác dụng áp lực 20,0 psi ở cả đầu vào và đầu ra. Số liệu thu được ở 220 nm có tốc độ thu bằng 4 Hz. Mẫu đối chiếu (OMS646 chưa được xử lý) được tiêm hai lần khi bắt đầu mỗi quy trình. Phần trăm LC, HC và IgG được báo cáo.

Các phân tích điện di gel mao dẫn SDS không được khử được thực hiện như mô tả đối với CE-SDS được khử, với ngoại lệ là 250 mM iodoaxetamid mới được điều chế được sử dụng thay cho chất khử, và việc tách được thực hiện trong 35 phút. Tổng diện tích điện sắc ký và % IgG được báo cáo.

Việc điều chế kháng thể OMS646 được tinh chế (102 mg/mL) được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp như được mô tả trong WO2012/151481, được đưa vào phần mô tả này bằng cách viện dẫn. Như được mô tả ngắn gọn, kháng thể OMS646 được tạo ra trong các tế bào CHO chứa các cấu trúc biểu hiện mã hóa chuỗi nặng và polypeptit chuỗi nhẹ của OMS646 và được tinh chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn.

1. So sánh hệ đệm đề xuất:

Phương pháp:

Trong nghiên cứu tiền chế phẩm, độ ổn định của kháng thể OMS646 ức chế MASP-2 ban đầu được đánh giá so với panen của đệm đề xuất bao gồm các đệm được đề xuất được sử dụng phổ biến trong chế phẩm chứa kháng thể điều trị (xitrat, histidin, phosphat), cũng như các đệm không thông thường hơn (axetat, suxinat) để che phủ khoảng pH rộng (pH 4,0 – pH 8,0). Đối với nghiên cứu này, protein được chuyển thành 20 mM đệm suxinat (pH 4,0, 5,0 và 5,5), axetat (pH 4,0, 5,0 và 5,5), xitrat (pH 5,0, 6,0 và 7,0), histidin (pH 6,0 và 7,0) và phosphat (pH 6,0, 7,0 và 8,0) bằng cách sử dụng máy cô Amicon Ultra-4 (10 kDa MWCO). Chế phẩm điều chế kháng thể OMS646 tinh chế (102 mg/mL trong 20 mM natri axetat, 50 mg/mL sorbitol, pH 5,0) được pha loãng đến ~1 mg/mL trong từng dung dịch chế phẩm trong số 14 dung dịch chế phẩm, và 4,0 mL thể tích được đặt trong máy cô được rửa trước bằng đệm thích hợp. Từng đơn vị được quay đến ~1 mL ở 3200 x g. Quy trình này được lặp lại trong tổng số ba vòng trao đổi đệm. Trong vòng cuối cùng của nồng độ, protein được cô kỹ đến < 1 mL. Thể tích và thời gian ly tâm xấp xỉ của từng dung dịch được ghi chép sau mỗi chu trình.

Kết quả: Nói chung, số liệu được tạo ra đối với năm loại đệm là có thể so sánh với tốc độ trao đổi đệm, sự thu hồi hàm lượng protein, phép đo nhiệt quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC), sự tán xạ ánh sáng động (dynamic light scattering - DLS) và độ ổn định hóa học (số liệu không được thể hiện). Axetat, xitrat

và histidin được chọn để đánh giá thêm dựa trên các đặc tính nhiệt độ tối ưu tổng thể rõ ràng và các đặc tính OMS646 về hình dạng trong khoảng pH 5,5-6,0. Axetat được chọn so với suxinat ở độ pH bằng 5,5 chủ yếu là do độ ổn định nhiệt cao, trong khi histidin và xitrat được chọn so với phosphat ở độ pH bằng 6,0 dựa trên số liệu DLS.

2. Sàng lọc tá dược

Độ ổn định của OMS646 được đánh giá khi có mặt nhiều tá dược có các đặc tính làm ổn định kháng thể được báo cáo, bằng cách sử dụng hệ đệm được xác định trong sàng lọc đệm trên đường cơ sở (20 mM axetat, pH 5,5; xitrat, pH 6,0, và histidin, pH 6,0). Đối với nghiên cứu này, OMS646 được trao đổi đệm thành từng đệm đề xuất chứa 150 mM NaCl, 250 mM sorbitol, 250 mM sucroza, 150 mM L-arginin, 150 mM L-glutamat hoặc 250 mM L-prolin sử dụng máy cô Amicon Ultra-4 (10 kDa MWCO). Việc điều chế mẫu được thực hiện như được mô tả khi so sánh hệ đệm trong đó nồng độ protein đích bằng 2,0 mg/mL.

Kết quả:

Liên quan đến việc thu hồi protein, việc thu hồi protein được ước tính nằm trong khoảng từ ~72-106%, thể hiện sự cải thiện thu hồi vừa phải khi không có mặt tá dược. Đệm histidin có vẻ được ưu tiên cho phần lớn tá dược, và axetat và xitrat thể hiện kết quả trộn lẫn.

Liên quan đến DSC, quan sát thấy rằng đệm xitrat dẫn đến sự ổn định nhiệt OMS646 đối với tất cả tá dược được kiểm tra. Fig.2A minh họa dưới dạng biểu đồ các kết quả đối với sự phân tích sự tán xạ ánh sáng động (dynamic light scattering - DLS) cho việc sàng lọc tá dược trong chế phẩm OMS646, thể hiện đường kính hạt tổng thể quan sát được đối với chế phẩm chứa các tá dược đề xuất khác nhau. Fig.2B minh họa dưới dạng biểu đồ các kết quả đối với sự phân tích DLS cho việc sàng lọc tá dược trong chế phẩm OMS646, thể hiện sự đa phân tán tổng thể quan sát được đối với chế phẩm chứa các tá dược đề xuất khác nhau. Như được thể hiện trên Fig.2A và Fig.2B, liên quan đến DLS, hầu hết chế phẩm tạo ra các kết quả có thể so sánh được. Tuy nhiên, đối với tất cả hệ đệm, sucroza liên quan đến sự đa phân tán tăng và đường kính tổng thể và đường kính monome lớn nhất. Sucroza, sorbitol dưới đây ít nhất được ưu tiên vì DLS, thể hiện kích cỡ trung bình lớn hơn và sự đa phân tán tăng. Chế phẩm còn lại thông thường có thể so sánh được bởi DLS có đường kính monome nằm trong

khoảng từ 10 đến 12 nm (xem Fig.2A) và sự đa phân tán <20% chỉ ra quần thể đơn phân tán (xem Fig.2B). Liên quan đến độ ổn định chống lại sự biến tính hóa học, như được đánh giá bằng cách sử dụng hệ biến tính hóa học đẳng nhiệt AVIA, xu hướng đệm/pH được quan sát rõ ràng trong đó axetat có độ pH 5,5 biến tính ở nồng độ ure ~0,5 M thấp hơn chế phẩm chứa xitrat và histidin có độ pH 6,0 đối với tất cả tá được được kiểm tra. Xitrat và histidin có thể so sánh được đối với tất cả tá được.

Tóm lại, số liệu hỗ trợ xitrat ở xấp xỉ độ pH bằng 6,0 là tổ hợp đệm/pH tối ưu, được thực hiện trong nghiên cứu sàng lọc độ hòa tan. Số liệu DLS kém được quan sát với tất cả loại đệm, sucroza được loại trừ khỏi việc xem xét thêm.

3. Sàng lọc độ hòa tan/độ nhớt

Nghiên cứu độ nhớt lần thứ nhất:

Phương pháp:

Để thiết lập điều kiện để độ hòa tan OMS646 tối đa, 20 mM xitrat (pH 5,0 và 6,0) và 20 mM suxinat (pH 4,0) được sử dụng khi có mặt nhiều tổ hợp đẳng trương của NaCl, sorbitol, arginin, glutamat và prolin. OMS646 được trao đổi đệm sử dụng bộ cô Amicon 15 trong nhiều chu trình và ở chu trình cuối cùng, thể tích của từng dung dịch được làm giảm đến ~1 mL. Tốc độ trao đổi đệm đối với tất cả chế phẩm và chu trình trao đổi được báo cáo và phân tích. Sau khi trao đổi đệm, hàm lượng protein được đo, phần trăm thu hồi được tính toán và mẫu được bảo quản qua đêm ở nhiệt độ 5°C. Khi bảo quản, chế phẩm suxinat/glutamat được quan sát đến khi kết tủa và không được đánh giá thêm. Chế phẩm còn lại được bổ sung vào bộ cô Amicon 4 và được cô cho đến khi đạt đến nồng độ đích bằng ~200 mg/mL, hoặc cho đến khi ly tâm không còn dẫn đến giảm thể tích và/hoặc độ nhớt mẫu (thông qua thao tác mẫu) được xem là không thể quản lý được.

Kết quả:

Liên quan đến tốc độ trao đổi đệm, tốc độ trao đổi cao nhất được quan sát rõ ràng trong mẫu có độ pH bằng 4,0, với suxinat/sorbitol thể hiện tốc độ trao đổi nhanh nhất tổng thể. Tốc độ trao đổi ở độ pH bằng 5,0 và 6,0 có thể so sánh được, trong đó chế phẩm chỉ chứa tá được axit amin tích điện thể hiện tốc độ cao hơn các chế phẩm khác. Tốc độ trao đổi chậm nhất được quan sát đối với chế phẩm xitrat/sorbitol ở độ

pH bằng 6,0. Chế phẩm này là mẫu đơn có pH $\geq 5,0$ và thành phần tá dược không tích điện. Giả định rằng tốc độ trao đổi là dấu hiệu chỉ thị đại diện cho sự tự liên kết OMS646, rõ ràng rằng các loại tích điện là quan trọng để làm giảm tình trạng này ở độ pH trung tính hơn. Liên quan đến DLS, tất cả chế phẩm nồng độ cao thể hiện đường kính tổng thể bằng $\sim 12\text{nm}$ có thể so sánh được, ngoại trừ suxinat/arginin có độ pH 4,0 thể hiện sự phân bố kích cỡ tổng thể tăng ở $>18\text{ nM}$.

Mẫu trao đổi đệm được cô cho đến khi dung dịch trở nên không hoạt động về mặt vật lý do độ nhớt cao. Đạt được nồng độ tối đa vượt quá 225 mg/mL đối với cả hai chế phẩm có độ pH bằng 4,0. Đối với các chế phẩm có giá trị pH cao hơn, thì nồng độ protein OMS646 tối đa nằm trong khoảng từ 160,5 đến 207,6 mg/mL. Độ nhớt đối với phần lớn chế phẩm được đánh giá bằng cách sử dụng nhớt kế kiểu thả bi có tốc độ trượt nằm trong khoảng từ $0,5\text{ giây}^{-1}$ đến 1000 giây^{-1} như được mô tả ở trên. Fig.3 minh họa dưới dạng biểu đồ các kết quả phân tích độ nhớt đối với sự sàng lọc độ hòa tan OMS646 nằm trong khoảng nồng độ protein trong các chế phẩm khác nhau như được đo ở độ pH bằng 5,0 và độ pH bằng 6,0. Như được thể hiện trên Fig.3, khi được vẽ biểu đồ đối với nồng độ protein, thì sự tăng độ nhớt theo hàm mũ được quan sát đối với chế phẩm, có độ nhớt cao nhất được báo cáo đối với xitrat/arginin/glutamat có độ pH bằng 5,0 (161,1 cP đối với 196,6 mg/mL dung dịch). Ở độ pH bằng 6,0 và nồng độ protein OMS646 có thể so sánh được, chế phẩm xitrat/sorbitol thể hiện độ nhớt cao hơn đáng kể chế phẩm sorbitol/glutamat hoặc prolin/glutamat. Chế phẩm xitrat/arginin/glutamat có độ pH bằng 6,0 (95,3 mg/mL) thể hiện xấp xỉ một nửa độ nhớt (5,8 với 9,3 cP) của mẫu xitrat/NaCl có độ pH bằng 6,0 (87,5 mg/mL) ở hàm lượng protein cao hơn gợi ý tầm quan trọng của axit amin tích điện đối với tá dược ion.

Quan trọng để lưu ý rằng ở nồng độ nhất định (tức là, 125 mg/mL), độ nhớt thay đổi đột ngột là hàm của chế phẩm này. Độ nhớt được duy trì lý tưởng dưới $\sim 25\text{ cP}$ để đảm bảo sản phẩm điều trị dưới da thực tế có thể sử dụng ống tiêm. Theo một số phương án về chế phẩm OMS646, độ nhớt được duy trì dưới khoảng 20 cP cho phép phân phối sản phẩm điều trị bằng thiết bị tiêm, và cũng cho phép các loại xử lý sinh học khác nhau, như lọc dòng tuyển tính.

Nghiên cứu độ nhớt lần thứ hai

Do đó, trong nỗ lực để làm giảm độ nhớt của chế phẩm OMS646 và tối ưu hóa nồng độ OMS646 trong chế phẩm nhất định, việc nghiên cứu bổ sung được thực hiện. Dựa trên các kết quả ban đầu, chế phẩm có nhiều khả năng tạo ra chế phẩm có độ nhớt giảm ở nồng độ cao được chọn, cụ thể: suxinat/sorbitol ở độ pH bằng 4,0 và chế phẩm xitrat chứa glutamat và arginin ở độ pH bằng 6,0. Dựa vào các nghiên cứu trước đó, axit amin tích điện liên quan đến nhiều đặc tính có lợi ở độ pH trung tính bao gồm tốc độ trao đổi đệm tăng, sự thu hồi xử lý mẫu tăng và độ nhớt giảm. Tác động của axit amin đối với chuỗi bên tích điện dương (ví dụ, arginin) hoặc axit amin có chuỗi bên tích điện âm (ví dụ, glutamat) được đánh giá trên khoảng nồng độ (từ 50 mM đến 150 mM) để đo cả điện tích tá dược và nồng độ đối với độ nhớt. Cuối cùng, CaCl_2 được sử dụng làm chất phụ gia trong cả dung dịch xitrat/glutamat đẳng trương và ưu trương do đặc tính làm giảm độ nhớt tiềm năng của nó như được mô tả trong patent Mỹ số 7,390,786.

Các mẫu được trao đổi đệm và được cô được mô tả ở trên. Sau khi trao đổi đệm, hàm lượng protein của tất cả chế phẩm được tính toán. Ngoại trừ việc chế phẩm chứa glutamat 50 mM và CaCl_2 50 mM, thì chế phẩm được kết tủa sau khi trao đổi đệm và không được đánh giá thêm. Điều này có thể một phần là do độ hòa tan hạn chế của xitrat và cation hóa trị hai như Ca^{2+} .

Kết quả:

Fig.4 minh họa dưới dạng biểu đồ phần trăm protein thu hồi sau khi trao đổi đệm để nghiên cứu độ hòa tan/độ nhớt OMS646 bằng các chế phẩm đề xuất khác nhau. Như được thể hiện trên Fig.4, xu hướng hướng đến sự thu hồi tăng có nồng độ arginin tăng được quan sát, trong đó 150 mM chế phẩm arginin thể hiện sự thu hồi protein cao nhất bằng 85%. Sự thu hồi đối với các chế phẩm còn lại có thể so sánh được và nằm trong khoảng 64-75%. Sau đó, các mẫu được cô như được mô tả ở trên cho đến khi chúng trở nên không thể làm việc được. Tất cả chế phẩm được đánh giá độ nhớt như được mô tả ở trên và các kết quả được thể hiện dưới đây trong bảng 3.

Bảng 3: Tổng kết số liệu độ nhớt từ nghiên cứu tiền chế phẩm

Mẫu	Đệm	Tá dược	Chất phụ gia	Độ pH	Nồng độ (mg/mL)	Độ nhớt (cP)
Chất chuẩn 100 cP (yêu cầu 97,2 cP)					-	97,1
Chất chuẩn 50 cP (yêu cầu 49,2)					-	49,1

S1	20 mM suxinat	250 mM sorbitol	-	4,0	209,3	109,6
S2	20 mM xitrat	150 mM arginin	-	6,0	181,2	70,5
S3	20 mM xitrat	100 mM arginin	-	6,0	170,8	102,8
S4	20 mM xitrat	50 mM arginin	-	6,0	158,3	140,1
S5	20 mM xitrat	150mM glutamat	-	6,0	180,3	71,2
S6	20 mM xitrat	100 mM glutamat	-	6,0	170,7	74,6
S7	20 mM xitrat	50 mM glutamat	-	6,0	152,7	137,0
S8	20 mM xitrat	150 mM glutamat	CaCl ₂ 50 mM	6,0	202,8	73,4

Như được thể hiện ở trên trong bảng 3, độ nhớt đối với tất cả chế phẩm >70 cP, và mặc dù khoảng nồng độ cuối cùng rộng, xu hướng rõ ràng được quan sát. Từ số liệu sơ bộ này, rõ ràng rằng nồng độ arginin hoặc glutamat tăng dẫn đến độ nhớt giảm. Độ nhớt của chế phẩm suxinat/sorbitol xuất hiện có thể so sánh với chế phẩm 150 mM axit amin. Việc chứa CaCl₂ thể hiện sự giảm độ nhớt, trong đó độ nhớt đối với chế phẩm này có thể so sánh với mẫu có hàm lượng protein thấp hơn 10%.

Bốn chế phẩm (S1, S2, S5 và S8 được thể hiện trong bảng 3) được chọn để phân tích độ nhớt chi tiết hơn, trong đó mẫu nguyên chất đã thu hồi được pha loãng thêm trong đệm chế phẩm bằng 25 mg/mL. Fig.5 minh họa dưới dạng biểu đồ độ nhớt (như được xác định bởi sự lấp khít theo hàm mũ của số liệu độ nhớt) đối với nồng độ protein để nghiên cứu độ hòa tan/độ nhớt OMS646 bằng các chế phẩm đề xuất khác nhau. Sự lấp khít theo hàm mũ của số liệu độ nhớt được xác định theo phương pháp được mô tả trong Connolly B. et al., *Biophysical Journal* vol 103:69-78, 2012. Như được thể hiện trên Fig.5, chế phẩm 150 mM glutamat và arginin thể hiện rằng hầu hết đường cong đồng nhất mà thể hiện độ nhớt cao nhất trên mỗi đơn vị nồng độ-độ nhớt bằng 25 cP cân bằng với ~ 150 mg/mL OMS646. Chế phẩm suxinat sorbitol thể hiện ở đâu đó tốt hơn, bằng 25 cP tương ứng với hàm lượng OMS646 được ước tính bằng ~160 mg/mL. Độ nhớt tổng thể thấp nhất được quan sát trong chế phẩm chứa CaCl₂ trong đó hàm lượng được ước tính ở 25 cP bằng ~175 mg/mL. Kết quả hấp dẫn nhất của phân tích này là chế phẩm ưu trương chứa 150 mM glutamat và 50 mM CaCl₂ làm giảm mạnh độ nhớt của mẫu. Với mong muốn tạo ra chế phẩm lỏng có nồng độ cao

nhất có thể, việc áp dụng cation hóa trị hai và tính ưu trương để giảm độ nhớt được chuyển sang hướng nghiên cứu độ nhớt bổ sung.

Nghiên cứu độ nhớt lần thứ ba

Dựa vào các kết quả từ các nghiên cứu độ nhớt ban đầu được mô tả ở trên, nghiên cứu bổ sung được thực hiện để xác định liệu các đặc tính làm giảm độ nhớt rõ ràng của CaCl_2 có liên quan đến Ca^{2+} hóa trị hai hoặc tính ưu trương hay không. Việc thay đổi tá dược vượt trội từ glutamat thành arginin được thực hiện do tốc độ trao đổi đệm cải thiện được quan sát đối với chế phẩm chứa arginin. Sự tích hợp của histidin được thực hiện do tiềm năng đối với sự chelat hóa của Ca^{2+} bằng xitrat có thể dẫn đến kết tủa. Cài đặt phụ của mẫu cũng đánh giá tác động của độ pH và chất hoạt động bề mặt đối với độ nhớt của mẫu, cũng như tác động của CaCl_2 và tính ưu trương đối với chế phẩm suxinat/sorbitol ở độ pH bằng 4,0. Mẫu được trao đổi đệm và được cô như được mô tả đối với các nghiên cứu về độ nhớt trước đó. Độ nhớt đối với tất cả chế phẩm được đo bằng cách sử dụng dụng cụ kiểu thả bi như được mô tả ở trên. Số liệu độ nhớt được bình thường hóa đến nồng độ protein trong mẫu bằng 170 mg/mL. Điều này được thực hiện bằng cách tính toán lần thứ nhất độ nhớt lý thuyết từ hàm lượng protein đo được bằng cách sử dụng hồi quy theo hàm mũ đối với số liệu độ nhớt/độ hòa tan độ nhớt được tính toán trước đó từ chế phẩm xitrat/arginin ở độ pH bằng 6,0 ($y=0,0917e^{0,0361x}$). Độ nhớt được bình thường hóa được tính toán bằng cách nhân độ nhớt lý thuyết đối với xitrat/arginin pH 6,0 ở 170 mg/mL (42,4 cP) với độ nhớt đo được/độ nhớt lý thuyết (xem bảng 4, chú thích cuối trang b). Độ nhớt được bình thường hóa tạo thành bộ lọc xu hướng rõ ràng hơn bằng cách làm bằng khả năng biến đổi liên quan đến nồng độ (xem bảng 4 và Fig.6).

Bảng 4. Tổng kết số liệu độ nhớt đối với chế phẩm OMS646 (170 mg/mL)

Chế phẩm	Đệm/độ pH	Tá dược	Chất phụ gia	PS-80	Độ nhớt (cP)	Nồng độ bình thường hóa trung bình (mg/mL)	Độ nhớt lý thuyết (cP) ^a	Độ nhớt xấp xỉ trung bình ở 170 mg/mL (cP) ^b
Chất chuẩn 100 cP (yêu cầu 97,2 cP)					96,9	-		
1A	20 mM xitrat ở độ pH	112,5 mM arginin	CaCl_2 25 mM	-	38,8	165,5	36,0	45,7

1B	bằng 6,0	112,5 mM arginin	CaCl ₂ 25 mM	0,05%	41,7	168,5	40,2	44,0
2		150 mM arginin	-	-	20,8	155,7	25,3	34,9
3		150 mM arginin	CaCl ₂ 25 mM	-	20,1	157,0	26,5	32,2
4		200 mM arginin	-	-	22,3	169,1	41,0	23,1
5		225 mM arginin	-	-	20,2	169,0	40,9	20,9
6A	20 mM xitrat ở độ pH bằng 5,0	112,5 mM arginin	CaCl ₂ 25 mM	-	34,1	165,4	35,9	40,4
6B		112,5 mM arginin	CaCl ₂ 25 mM	0,05%	31,0	170,0	42,4	31,1
7		150 mM arginin	-	-	22,1	158,9	28,4	33,0
8		150 mM arginin	CaCl ₂ 25 mM	-	17,4	153,9	23,7	31,1
9	20 mM histidin ở độ pH bằng 6,0	75 mM arginin	CaCl ₂ 50 mM	-	19,9	174,5	49,9	16,9
10A		112,5 mM arginin	CaCl ₂ 25 mM	-	27,9	169,6	41,8	28,4
10B		112,5 mM arginin	CaCl ₂ 25 mM	0,05%	28,1	184,6	71,8	16,6
11		135 mM arginin	CaCl ₂ 10 mM	-	34,1	167,1	38,2	37,9
12		150 mM arginin	-	-	35,5	156,6	26,1	57,7
13		200 mM arginin	-	-	20,2	167,2	38,3	22,3
14		225 mM arginin	-	-	16,4	161,9	31,6	22,0
15		150 mM arginin	CaCl ₂ 50 mM	-	15,9	164,9	35,2	19,1
16A	20 mM ở độ pH	125 mM sorbitol	CaCl ₂ 50 mM	-	19,5	172,7	46,7	17,7

16B	bằng 4,0	125 mM sorbitol	CaCl ₂ 50 mM	0,05%	18,1	168,7	40,4	19,0
17		250 mM sorbitol	CaCl ₂ 50 mM	-	15,5	157,2	26,8	24,6
18		250 mM sorbitol		-	16,8	161,3	31,0	23,0

^aĐộ nhớt lý thuyết được tính toán bằng cách sử dụng sự hồi quy đến đường cong độ nhớt ở hàm lượng xitrat/arginin ở độ pH bằng 6,0 được đo ($y=0,0917e^{0,0361x}$)

^bĐộ nhớt lý thuyết của 170 mg/mL xitrat/arginin ở độ pH bằng 6,0 (42,4 cP)* (Độ nhớt đo được/Độ nhớt lý thuyết)

Fig.6 minh họa dưới dạng biểu đồ số liệu độ nhớt được bình thường hóa nồng độ để nghiên cứu độ nhớt với các chế phẩm OMS646 đề xuất khác nhau dựa vào số liệu từ bảng 4. Như được thể hiện trên Fig.6 và bảng 4, đối với chế phẩm xitrat và histidin, việc xem xét bộ số liệu được bình thường hóa rõ ràng cho thấy rằng tính ưu trương dẫn đến độ nhớt của mẫu giảm, trong đó phần lớn tác động được quan sát chỉ tăng vừa phải trong nồng độ arginin. Ví dụ, độ nhớt được bình thường hóa của chế phẩm 12 (20 mM histidin với 150 mM arginin) bằng 57,7 cP, so với độ nhớt bằng 22,3 và 22,0 cP đối với chế phẩm histidin lần lượt chứa 200 và 225 mM arginin. Xu hướng tương tự được quan sát đối với chế phẩm xitrat/arginin. Không có lợi ích rõ ràng của việc chứa CaCl₂. Thay vào đó, ngạc nhiên phát hiện ra rằng khi không có mặt CaCl₂, thì đạt được độ nhớt thấp (ví dụ, nhỏ hơn 25 cP) bởi xitrat/arginin và chế phẩm histidin/arginin có nồng độ arginin cao hơn hoặc bằng 200 mM. Việc chứa PS-80 0,05% dẫn đến sự giảm độ nhớt đáng kể ở hai trong số ba chế phẩm được đánh giá ở độ pH $\geq 5,0$. Cuối cùng, độ nhớt ở độ pH bằng 5,0 xuất hiện ở đâu đó thấp hơn độ nhớt đối với chế phẩm so sánh ở độ pH bằng 6,0.

Xem xét các kết quả thu được từ các nghiên cứu độ nhớt, arginin ưu trương, sự có mặt hoặc không có mặt của cation hóa trị hai và chế phẩm suxinat/sorbitol ở độ pH bằng 4,0 được thực hiện hướng đến các nghiên cứu sàng lọc chất hoạt động bề mặt để đánh giá thêm tác động đối với độ ổn định về mặt vật lý, hình dạng và hóa học của OMS646.

4. Sàng lọc chất hoạt động bề mặt

Tác động của chất hoạt động bề mặt đối với độ ổn định OMS646 được đánh

giá bằng cách sử dụng các chế phẩm đề xuất được xác định trong các nghiên cứu trước được mô tả trong bản mô tả này. Đối với các nghiên cứu sàng lọc chất hoạt động bề mặt, sáu chế phẩm được phân tích như sau:

- 20 mM xitrat, 200 mM arginin ở độ pH bằng 5,0
- 20 mM xitrat, 200 mM arginin ở độ pH bằng 6,0;
- 20 mM suxinat, 250 mM sorbitol ở độ pH bằng 4,0;
- 20 mM histidin, 200 mM arginin ở độ pH bằng 6,0;
- 20 mM histidin, 75 mM arginin/50 mM CaCl_2 ở độ pH bằng 6,0;
- 20 mM histidin, 75 mM arginin/50 mM MgCl_2 ở độ pH bằng 6,0

Từng chế phẩm trong sáu chế phẩm thể hiện ở trên được đánh giá mà không có chất hoạt động bề mặt hoặc khi có mặt PS-80 0,01% đối với tổng số mười hai điều kiện chế phẩm riêng biệt. Đối với từng chế phẩm, OMS646 được trao đổi thành dung dịch trao đổi đệm (không PS-80), được cô, hàm lượng được đo và mẫu được bình thường hóa đến 175 mg/mL protein. Mỗi chế phẩm sau đó được tách và PS-80 được bổ sung vào các mẫu thích hợp đến nồng độ cuối cùng bằng 0,01% (khối lượng/thể tích).

Các mẫu đã bào chế từng mẫu được trải qua kích thích cơ học bằng cách khuấy, và chu trình làm đông/rã đông. Đối với cả hai loại kích thích, 0,5 mL mẫu được chuyển vào bốn lọ nhỏ thủy tinh bosilicat loại 1 (2,0 mL) và được đậy kín bằng cách sử dụng nút FluroTec®. Để kích thích bằng cách khuấy, các mẫu được đặt trong máy lắc vi tâm ở 600 vòng/phút trong ~60 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Mẫu đối chứng khuấy được giữ bên cạnh máy lắc trong thời gian kích thích khuấy. Đối với chu trình làm đông/rã đông, các mẫu được đóng băng ở nhiệt độ -80°C trong ≥ 60 phút và sau đó cho tan băng ở nhiệt độ trong phòng, trong tổng cộng 5 chu trình đóng băng-tan băng. Sau khi kích thích, các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ $2-8^\circ\text{C}$ cho đến khi phân tích. Mẫu còn lại được duy trì ở nhiệt độ $2-8^\circ\text{C}$ là đối chứng không được kích thích. Về bên ngoài, phép đo A280, DLS và SEC được thực hiện để đánh giá tác động của chất hoạt động bề mặt đối với sự kết tụ và độ ổn định OMS646.

Kết quả:

Sau khi kích thích sáu chế phẩm OMS646, không mẫu nào thể hiện rõ ràng vật liệu dạng hạt liên quan đến sản phẩm. Hàm lượng protein về cơ bản là không đổi đối

với tất cả các mẫu của chế phẩm nhất định. Sự phân tích số liệu DLS đối với mẫu làm đông/rã đông và mẫu khuấy chỉ bộc lộ sự sai khác khó thấy giữa các chế phẩm và các loại kích thích, không có xu hướng tổng thể rõ ràng được quan sát liên quan đến việc chứa PS-80. Một ngoại lệ là chế phẩm suxinat/sorbitol ở độ pH bằng 4,0 trong đó việc chứa PS-80 dẫn đến sự đa phân tán tổng thể cao (tức là, đa chế độ) để làm đông/rã đông và mẫu đối chứng ở nhiệt độ 5°C. Chế phẩm axit này cũng thể hiện rõ ràng sự kết tụ/sự tự liên kết bởi DLS khi không có mặt PS-80 khi khuấy.

Việc phân tích số liệu SEC được thực hiện để đánh giá các sản phẩm kết tụ và/hoặc các sản phẩm phân hủy bất kỳ phát sinh trong khi kích thích mẫu. Các kết quả được tổng kết trong các bảng 5A-5D.

Bảng 5A: Tổng kết số liệu SEC đối với chế phẩm OMS646 sàng lọc chất hoạt động bề mặt (2-8°C)

Chế phẩm	Đệm	Tá được	Chất phụ gia	Độ pH	PS-80 (%)	Tổng HMW trung bình (%)	Monome trung bình (%)	Tổng LMW trung bình (%)
Mẫu tham chiếu chưa xử lý trung bình						3,7	96,3	-
1	20 mM xitrat	200 mM arginin	-	5,0	-	3,0	96,3	-
2					0,01	3,1	96,9	-
3	20 mM xitrat	200 mM arginin	-	6,0	-	3,2	96,8	-
4					0,01	3,3	96,7	-
5	20 mM histidin	200 mM arginin	-	6,0	-	3,3	96,7	-
6					0,01	3,4	96,6	-
7	20 mM suxinat	250 mM sorbitol	-	4,0	-	3,2	96,6	0,2
8					0,01	3,2	96,5	0,2
9	20 mM histidin	75 mM arginin	50 mM CaCl ₂	6,0	-	3,3	96,7	-
10					0,01	3,4	96,6	-
11	20 mM histidin	75 mM arginin	50 mM MgCl ₂	6,0	-	3,4	96,6	-
12					0,01	3,5	96,5	-

Bảng 5B: Tổng kết số liệu SEC đối với chế phẩm OMS646 sàng lọc chất hoạt động bề mặt (Làm đông/rã đông)

Chế phẩm	Đệm	Tá dược	Chất phụ gia	Độ pH	PS-80 (%)	Tổng HMW trung bình (%)	Monome trung bình (%)	Tổng LMW trung bình (%)
Mẫu tham chiếu chưa xử lý trung bình						3,7	96,3	-
1	20 mM	200 mM	-	5,0	-	3,1	96,9	-
2	xitrat	arginin	-		0,01	3,2	96,8	-
3	20 mM	200 mM	-	6,0	-	3,3	96,7	-
4	xitrat	arginin	-		0,01	3,3	96,7	-
5	20 mM	200 mM	-	6,0	-	3,3	96,7	-
6	histidin	arginin	-		0,01	3,4	96,6	-
7	20 mM	250 mM	-	4,0	-	3,2	96,6	0,2
8	suxinat	sorbitol	-		0,01	3,2	96,6	0,2
9	20 mM	75 mM	50 mM	6,0	-	3,4	96,6	-
10	histidin	arginin	CaCl ₂		0,01	3,4	96,6	-
11	20 mM	75 mM	50 mM	6,0	-	3,5	96,6	-
12	histidin	arginin	MgCl ₂		0,01	3,5	96,6	-

Bảng 5C: Tổng kết số liệu SEC đối với chế phẩm OMS646 sàng lọc chất hoạt động bề mặt (25°C)

Chế phẩm	Đệm	Tá dược	Chất phụ gia	Độ pH	PS-80 (%)	Tổng HMW trung bình (%)	Monome trung bình (%)	Tổng LMW trung bình (%)
Mẫu tham chiếu chưa xử lý trung bình						3,7	96,3	-
1	20 mM	200 mM	-	5,0	-	3,1	96,9	-
2	xitrat	arginin	-		0,01	3,2	96,8	-
3	20 mM	200 mM	-	6,0	-	3,3	96,7	-
4	xitrat	arginin	-		0,01	3,4	96,6	-
5	20 mM	200 mM	-	6,0	-	3,3	96,7	-
6	histidin	arginin	-		0,01	3,4	96,6	-
7	20 mM	250 mM	-	4,0	-	3,3	96,5	0,2
8	suxinat	sorbitol	-		0,01	3,3	96,5	0,2
9	20 mM	75 mM	50 mM	6,0	-	3,4	96,6	-
10	histidin	arginin	CaCl ₂		0,01	3,5	96,5	-
11	20 mM	75 mM	50 mM	6,0	-	3,5	96,5	-
12	histidin	arginin	MgCl ₂		0,01	3,5	96,5	-

Bảng 5D: Tổng kết số liệu SEC đối với chế phẩm OMS646 sàng lọc chất hoạt động bề mặt (Khuấy)

Chế phẩm	Đệm	Tá dược	Chất phụ gia	pH	PS-80	Tổng HMW	Monome trung bình	Tổng LMW
----------	-----	---------	--------------	----	-------	----------	-------------------	----------

					(%)	trung bình (%)	(%)	trung bình (%)
Mẫu tham chiếu chưa xử lý trung bình						3,7	96,3	-
1	20 mM	200 mM	-	5,0	-	3,0	97,0	-
2	xitrat	arginin			0,01	3,2	96,8	-
3	20 mM	200 mM	-	6,0	-	3,3	96,7	-
4	xitrat	arginin			0,01	3,4	96,6	-
5	20 mM	200 mM	-	6,0	-	3,3	96,7	-
6	histidin	Arginin			0,01	3,4	96,6	-
7	20 mM	250 mM	-	4,0	-	2,8	97,0	0,2
8	suxinat	sorbitol			0,01	3,3	96,5	0,2
9	20 mM	75 mM	50 mM	6,0	-	3,4	96,3	0,3
10	histidin	arginin	CaCl ₂		0,01	3,5	96,5	-
11	20 mM	75 mM	50 mM	6,0	-	3,4	96,6	-
12	histidin	arginin	MgCl ₂		0,01	3,6	96,5	-

Tổng thể, như được thể hiện ở trong các bảng 5A-5D, số liệu SEC chỉ ra rằng phân tử OMS646 thường không nhạy đối với việc chứa PS-80 và cả kích thích làm đông/rã đông (bảng 5B) và kích thích khuấy (bảng 5D), bất kể chất hoạt động bề mặt. Quan sát thấy rằng các chế phẩm OMS646 hoạt động kém nhất là các chế phẩm chứa chất phụ gia cation hóa trị hai (CaCl₂ và MgCl₂) trong đó nguyên liệu có khối lượng phân tử cao (high molecular weight - HMW) đối với các mẫu này được tăng rõ ràng so với các mẫu khác và mức monome thấp nhất được quan sát.

5. Phân tích độ ổn định dưới điều kiện được kích thích và không được kích thích trong 28 ngày

Sau khi hạn chế tổ hợp đệm, tá dược và chất hoạt động bề mặt tiềm năng thông qua nghiên cứu tiền chế phẩm được mô tả ở trên, đệm xitrat và đệm histidin được bào chế bằng cách sử dụng 200 mM arginin trên khoảng pH 5,5 – 6,5 ở nồng độ cao bằng 175 mg/mL và 200 mg/mL OMS646 để xác định chế phẩm thích hợp nhất ở cả điều kiện được kích thích (40°C) và không được kích thích (5°C). Arginin được chứa ở mức ưu trương (200 mM) do đặc tính giảm độ nhớt ở nồng độ tăng cao. Dựa vào sự tối ưu hóa số liệu thống kê của số liệu tiền chế phẩm, chế phẩm OMS646 thích hợp nhất được xác định là 20 mM xitrat và 200 mM arginin. Các panen mẫu cũng được điều chế để đánh giá tác động của PS-80 0,01% đối với chế phẩm xitrat và histidin.

Sự trao đổi đệm được thực hiện như được mô tả ở trên, các mẫu được cô và

được pha loãng để đạt được nồng độ đích bằng 175 hoặc 200 mg/mL OMS646. Trong suốt quá trình tối ưu hóa cuối cùng, PS-80 được bổ sung thành 0,01% đối với các chế phẩm thích hợp. Các chế phẩm này được lọc vô trùng bằng cách sử dụng Millipore Ultrafree-CL GV 0,22 μ M máy cô vô trùng. Một lọ nhỏ của từng chế phẩm được đặt ở nhiệt độ 5°C và một lọ nhỏ khác ở nhiệt độ 40°C trong thời gian ủ 28 ngày. Các mẫu được phân tích ở thời điểm To và 28 ngày liên quan đến nồng độ, vẻ bên ngoài, độ đục, nồng độ molal đồng thẩm thấu, độ pH, DLS, DSC và độ nhớt. Việc ủ 28 ngày sau đó, quan sát thấy rằng cả hai chế phẩm 175 và 200 mg/mL OMS646 suxinat/sorbitol được bảo quản ở nhiệt độ 40°C hiện độ đặc dạng gel, và do đó không được phân tích.

Kết quả:

Liên quan đến sự phân tích độ ổn định, giá trị pH duy trì ổn định trong thời gian nghiên cứu, bất kể chế phẩm và điều kiện bảo quản. Sau 28 ngày, cả hai phân tích SEC và SDS-CE chỉ ra sự tăng đáng kể trong hàm lượng LMW đối với chế phẩm có độ pH bằng 5,0 và độ pH bằng 4,0 có tính axit, loại trừ các chế phẩm này khỏi việc xem xét thêm. Đối với xitrat/arginin và histidin/arginin có độ pH bằng 6,0 được bảo chế với PS-80 0,01%, hầu hết đáp ứng gần như không thể phân biệt được với mẫu không chứa chất hoạt động bề mặt có liên quan. Tuy nhiên, SEC thể hiện sự giảm hàm lượng HMW từ 0,2% đến 0,6% so với chế phẩm đối chiếu không chứa chất hoạt động bề mặt. Liên quan đến đặc tính giảm độ nhớt rõ ràng của chất hoạt động bề mặt, polysorbat-80 (PS-80) được chọn để được bao gồm trong các nghiên cứu chế phẩm thêm.

Nồng độ và độ nhớt của tổng số 10 chế phẩm được kiểm tra sau 28 ngày ở nhiệt độ 5°C. Các kết quả tiêu biểu được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6. Độ nhớt của các chế phẩm sau 28 ngày ở nhiệt độ 5°C.

Mẫu	Chế phẩm	Nồng độ 28 ngày ở nhiệt độ 5°C (mg/mL)	Độ nhớt (cP)
1	20 mM xitrat, 200 mM arginin, pH 6,0, 175 mg/mL OMS646	153,4	10,6
2	20 mM histidin, 200 mM arginin, pH 6,0, 175 mg/mL OMS646	151,3	12,7
3	20 mM xitrat, 200 mM arginin, pH 6,0, 200 mg/mL OMS646	170,5	27,4
4	20 mM histidin, 200 mM arginin, pH 6,0, 200 mg/mL OMS646	184,2	18,1

5	20 mM xitrat, 200 mM arginin, PS-80 0,01%, pH 6,0, 175 mg/mL OMS646	159,2	9,0
6	20 mM histidin, 200 mM arginin, PS-80 0,01%, pH 6,0, 175 mg/mL OMS646	156,0	7,8
7	20 mM xitrat, 200 mM arginin, pH 5,0, 175 mg/mL OMS646	143,2	9,8
8	20 mM histidin, 200 mM arginin, pH 5,0, 200 mg/mL OMS646	182,4	15,9
9	20 mM suxinat, 250 mM sorbitol, pH 4,0, 175 mg/mL OMS646	150,6	14,5
10	20 mM suxinat, 250 mM sorbitol, pH 4,0, 200 mg/mL	184,3	18,0

Như được thể hiện ở trên trong bảng 6, chế phẩm có nồng độ cao hơn thể hiện độ nhớt cao hơn. Điều quan tâm đáng chú ý là quan sát thấy rằng việc chứa PS-80 dẫn đến sự giảm độ nhớt đối với cả chế phẩm xitrat (10,6 so với 9,0 cP) và histidin (12,7 so với 7,8 cP), trong khi cũng bảo toàn sự thu hồi protein. Sự giảm độ nhớt khi chứa PS-80 là có lợi, cho phép nồng độ cao hơn của OMS646 trong khi duy trì độ nhớt thấp mà được xem là có thể dùng ống tiêm trong thiết đặt lâm sàng và cũng thích hợp để sử dụng trong bộ tiêm tự động và các thiết bị tiêm khác.

Tổng kết các kết quả

Mục đích chính của các nghiên cứu này là để xác định thành phần chế phẩm mà sẽ dẫn đến độ ổn định hóa học, vật lý, và cấu trúc tối ưu của kháng thể OMS646 có nồng độ cao trong chế phẩm lỏng. Ngoài ra, các nghiên cứu cụ thể về độ nhớt được thực hiện với mục đích thu được chế phẩm cuối cùng có nồng độ kháng thể OMS646 tối đa mà có thể được phân phối khả thi bằng cách dùng dưới da.

Nhiều loại đệm, điều kiện pH, tá dược, và nồng độ chất hoạt động bề mặt được đánh giá theo kiểu lặp lại qua thời gian nghiên cứu hướng đến đánh giá hệ đệm, tá dược, độ hòa tan, độ nhớt, và các nghiên cứu sàng lọc chất hoạt động bề mặt. Nghiên cứu đánh giá đệm trên đường cơ sở ban đầu kiểm tra năm loại đệm khác nhau (axetat, xitrat, suxinat, histidin, và phosphat) trên khoảng pH 4,0 – 8,0. Sự phân tích bởi hệ biến tính hóa học DSC, DLS, và AVIA chỉ ra rằng các điều kiện có tính axit và bazơ hơn ít nhất thích hợp đối với độ ổn định kháng thể OMS646. Dựa trên các kết quả, hệ đệm axetat, xitrat, và histidin được chọn để đánh giá thêm.

Việc sàng lọc tá dược đánh giá tác động của NaCl, L-arginin, L-glutamat, L-prolin, sucroza, và sorbitol đối với độ ổn định kháng thể OMS646 trong từng hệ đệm trong số ba hệ đệm được chọn. Xitrat (pH bằng 6,0) được thực hiện một mình hướng đến các nghiên cứu thêm để tối đa hóa không gian thiết kế để đánh giá thêm tá dược. Chỉ sucroza được loại trừ là tá dược tiềm năng do số liệu tán xạ ánh sáng kém. Việc sàng lọc độ hòa tan đánh giá khả năng của chế phẩm xitrat (pH bằng 5,0 và pH bằng 6,0) chứa tổ hợp đẳng trương của NaCl, sorbitol, arginin, glutamat, và prolin để hỗ trợ nồng độ dung dịch cao của kháng thể OMS646. Tất cả chế phẩm được cô vượt quá 150 mg/mL OMS646 mà không có bằng chứng kết tụ. Tuy nhiên, chế phẩm suxinat/arginin và suxinat/glutamat, thể hiện rõ ràng sự kết tụ/kết tụ sau khi bảo quản trong thời gian ngắn và không được đánh giá thêm. Sự phân tích sinh lý của chế phẩm xitrat chỉ thể hiện các sai khác nhỏ giữa tá dược ở độ pH bằng 6,0 và sự giảm hàm lượng HMW vừa phải trong chế phẩm có độ pH bằng 5,0 đối chiếu.

Việc quan tâm đến số liệu từ phép đo độ nhớt của thiết đặt phụ này của mẫu, gợi ý rằng xitrat/glutamat và suxinat/sorbitol tạo ra độ nhớt thấp nhất. Độ ổn định sinh lý tương tự nhất định được quan sát giữa các tá dược và sự quan trọng của việc thu chế phẩm có hàm lượng OMS646 tối ưu, nghiên cứu độ nhớt bổ sung được thực hiện. Các nghiên cứu độ nhớt này xác định cation hóa trị hai và/hoặc tính ưu trương vừa phải là yếu tố đáng kể trong việc làm giảm độ nhớt chế phẩm chứa kháng thể OMS646 ở độ pH trung tính hơn. Cả xitrat (pH 5,0 và 6,0) và histidin (pH 6,0) được đánh giá khi có mặt 200 mM arginin. Histidin pH 6,0 cũng được đánh giá khi có mặt 75 mM arginin và 50 mM CaCl_2 hoặc 50 mM MgCl_2 . Cuối cùng, suxinat/sorbitol pH 4,0 được kiểm tra. Tất cả tổ hợp đệm/tá dược được kiểm tra trong sự không có mặt hoặc có mặt của PS-80 0,01% để xác định nếu chất hoạt động bề mặt thúc đẩy độ ổn định kháng thể OMS646 ở điều kiện khuấy và kích thích làm đông/rã đông. Tất cả chế phẩm xuất hiện ổn định chống lại kích thích môi trường được sử dụng, bất kể chất hoạt động bề mặt. Một sự quan sát nổi bật là sự tăng hàm lượng OMS646 HMW được quan sát bởi SEC đối với các chế phẩm chứa cation hóa trị hai. Do đó, loại bỏ CaCl_2 và MgCl_2 làm tá dược tạo ra sự xem xét thêm. Suxinat/sorbitol cũng thể hiện độ tinh khiết của kháng thể OMS646 giảm, chủ yếu là do sự tăng rõ ràng của tạp chất LMW. Trong khi sự sai khác giữa chế phẩm chứa và thiếu PS-80 0,01% là nhỏ, các mẫu chứa chất hoạt động bề mặt xuất hiện để thể hiện hàm lượng HMW tăng vừa phải (~0,1%)

so với đối chứng không chứa chất hoạt động bề mặt của chúng.

Ví dụ 3

Ví dụ này mô tả nghiên cứu trong đó ba chế phẩm OMS646 đề xuất độ nhớt thấp, rất cô đặc được xác định dựa trên nghiên cứu tiền chế phẩm được mô tả trong ví dụ 2, được so sánh về khả năng bơm tiêm.

Tình trạng kỹ thuật/Cơ sở kỹ thuật:

Thời gian và lực được yêu cầu để tiêm bằng tay (hoặc thời gian được yêu cầu để tiêm sử dụng dụng cụ tiêm tự động) là quan trọng và có thể ảnh hưởng đến việc người dùng cuối cùng dễ dàng sử dụng sản phẩm và do đó tuân thủ việc dùng. Lực được yêu cầu để tiêm dung dịch ở tốc độ tiêm nhất định thông qua kim có số đo và chiều dài định trước được gọi là 'khả năng bơm tiêm' (xem ví dụ, *Burckbuchler, V.; et al., Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76 (3), 351-356, 2010). Liên quan đến khả năng bơm tiêm để dùng cho đối tượng là người, con người thường không muốn vượt quá lực 25N (mặc dù có các chế phẩm trên thị trường có độ nhớt cao hơn). Kim 27GA hoặc kim thành mỏng 27GA thông thường được xem là kim chuẩn để tiêm dưới da chứa kháng thể đơn dòng. Kim thành mỏng 27GA có ID xấp xỉ bằng kim 25GA (số G càng nhỏ thì đường kính càng lớn).

Nghiên cứu dưới đây được thực hiện để xác định khả năng bơm tiêm của ba chế phẩm OMS646 đề xuất có độ nhớt thấp, nồng độ cao.

Phương pháp:

Dựa trên nghiên cứu tiền chế phẩm được mô tả trong ví dụ 2, ba chế phẩm OMS646 đề xuất có nồng độ cao dưới đây được chọn và được nghiên cứu thêm, như được thể hiện trong bảng 7. Trong ví dụ này, các chế phẩm được điều chế bằng cách sử dụng arginin hydroclorua, polysorbat 80 nếu được chỉ định, và trinitrat hoặc histidin, có độ pH được điều chỉnh đến nằm trong khoảng từ khoảng 5,8 đến 6,0 bằng cách sử dụng axit clohydric.

Bảng 7: Chế phẩm OMS646 đề xuất có nồng độ cao

Chế phẩm	Đệm/Tá được/Chất hoạt động bề mặt/độ pH	Nồng độ của OMS646	Hàm lượng protein
1	20 mM xitrat, 200 mM arginin, PS-80 0,01%, pH 5,8	185 mg/mL	187,1

2	20 mM histidin, 200 mM arginin, PS-80 0,01%, pH 5,9	185 mg/mL	188,2
3	20 mM xitrat, 200 mM arginin, pH 5,8	185 mg/mL	193,3

1. Nồng độ molal đồng thẩm thấu và độ nhớt của chế phẩm OMS646 đề xuất

Nồng độ molal đồng thẩm thấu và độ nhớt của ba chế phẩm đề xuất được tạo ra như được thể hiện trong bảng 7 được xác định bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong ví dụ 2. Trạng thái chất lưu của chế phẩm được xem là phi Newton nếu %RSD >10 trên tốc độ trượt được kiểm tra. Các kết quả được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8. Nồng độ molal đồng thẩm thấu và độ nhớt

Chế phẩm	Đệm/Tá dược/Chất hoạt động bề mặt/độ pH	Nồng độ	Nồng độ molal đồng thẩm thấu (mOsm/kg)	Độ nhớt (cP)	Trạng thái chất lưu
1	20 mM xitrat, 200 mM arginin, PS-80 0,01%, pH 5,8	185 mg/mL	473	16,1	Newton
2	20 mM histidin, 200 mM arginin, PS-80 0,01%, pH 5,9	185 mg/mL	440	15,9	Newton
3	20 mM xitrat, 200 mM arginin, pH 5,8	185 mg/mL	468	21,3	Newton

2. Khả năng bơm tiêm của chế phẩm OMS646 đề xuất

Phương pháp:

Phân tích khả năng bơm tiêm của ba chế phẩm OMS646 được thực hiện liên quan đến sự tải trung bình và tải tối đa bằng cách sử dụng kim 27 GA (1,25”), 25GA (1”) và kim thành mỏng 25GA (1”). Lặp lại ba lần đối với từng chế phẩm mỗi chế phẩm được tiêm một lần. Kết quả đối với mẫu khả năng bơm tiêm là trung bình của ba lần lặp lại.

Kết quả:

Ba chế phẩm được thể hiện trong bảng 7 (chứa OMS646 ở 185 mg/mL) được đánh giá về khả năng bơm tiêm của chúng bằng cách sử dụng kim 27GA (1,25”), kim thành mỏng 25GA (1”), và 25GA (1”). Kết quả được báo cáo là trung bình của ba lần lặp lại. Các kết quả được thể hiện trong bảng 9 và được minh họa bằng đồ thị trên Fig.7A và Fig.7B. Fig.7A minh họa dưới dạng biểu đồ sự tải trung bình (lbf) của ba

chế phẩm OMS646 đề xuất bằng cách sử dụng kim thành mỏng 27GA, 25GA và 25GA. Fig.7B minh họa dưới dạng biểu đồ sự tải tối đa (lbf) của ba chế phẩm OMS646 đề xuất bằng cách sử dụng 27GA, 25GA và kim thành mỏng 25GA.

Bảng 9. Khả năng bơm tiêm của chế phẩm OMS646 đề xuất có nồng độ cao

Chế phẩm	Điều kiện	Tải trung bình (lbf)	Tải tối đa (lbf)	Tải trung bình (N)	Tải tối đa (N)
1	27 GA	4,72	5,07	20,99	22,55
	25GA	1,88	2,03	8,36	9,03
	25GA (thành mỏng)	1,27	1,36	5,65	6,05
2	27 GA	4,51	4,85	20,06	21,57
	25GA	1,84	1,99	8,18	8,85
	25GA (thành mỏng)	1,26	1,32	5,60	5,80
3	27 GA	5,58	5,83	24,82	25,93
	25GA	2,29	2,51	10,18	11,16
	25GA (thành mỏng)	1,50	1,60	6,67	7,11

Như được mô tả ở trên, liên quan đến khả năng bơm tiêm để dùng cho đối tượng là người, con người thường không muốn lực vượt quá 25N. Như được thể hiện ở trong bảng 9, tất cả ba chế phẩm OMS646 đề xuất có nồng độ cao có khả năng bơm tiêm có thể chấp nhận được (tức là, lực không vượt quá 25N) khi tiêm qua ống tiêm thành mỏng 25GA hoặc 25GA. Chế phẩm #2 cũng có khả năng bơm tiêm có thể chấp nhận được khi tiêm qua kim 27G. Việc bổ sung PS-80 0,01% gây ra sự cải thiện không được mong đợi về khả năng bơm tiêm.

3. Phân tích SEC của chế phẩm OMS646 đề xuất sau khi tiêm

Sắc ký loại trừ kích cỡ (size exclusion chromatography - SEC) được sử dụng để đánh giá số lượng sản phẩm kết tụ và phân hủy có mặt trong ba chế phẩm OMS646 đề xuất sau khi tiêm. Tóm lại, hệ thống Agilent 1100 HPLC được lắp với cột G3000SWxl SEC (Tosoh, 7,8 x 300 mm, kích cỡ hạt 5 µm). Các mẫu OMS646 được pha loãng đến 2,5 mg/mL trong pha động SEC (140 mM kali phosphat, 75 mM kali clorua, pH 7,0) và 20 µL mẫu được tiêm vào cột HPLC. Hệ thống này chạy bằng cách sử dụng lưu lượng bằng 0,4 mL/phút, và protein rửa giải được phát hiện bằng sự hấp thụ ở 280 nm (độ rộng dải 4 nm) không có sự hiệu chỉnh tham chiếu. Để đánh giá sự thích hợp về hệ thống, tất cả các mẫu được xếp bởi mẫu trống ở pha động và tiêm chuẩn lọc gel, và nguyên liệu đối chiếu được tiêm hai lần khi bắt đầu quy trình. Phần

trăm độ phong phú đối với các loại có khối lượng phân tử cao riêng rẽ và khối lượng phân tử cao (HMW) tổng và các loại khối lượng phân tử (LMW) thấp, ngoài phần trăm monome và tổng diện tích đỉnh nguyên vẹn được báo cáo.

Kết quả:

Các kết quả phân tích SEC của chế phẩm OMS646 có nồng độ cao đề xuất sau khi tiêm được thể hiện trong bảng 10.

Bảng 10. Phân tích SEC của chế phẩm OMS646 có nồng độ cao sau khi tiêm

Chế phẩm	Điều kiện	% tinh khiết	% HMW	% LMW
1	Đối chứng	96,5	3,3	0,1
	27 GA	96,4	3,5	0,2
	25 GA	96,4	3,4	0,2
	25GA (thành mỏng)	96,4	3,4	0,2
2	Đối chứng	96,6	3,4	Không phát hiện được
	27 GA	96,5	3,5	Không phát hiện được
	25 GA	96,5	3,5	Không phát hiện được
	25 GA (thành mỏng)	96,5	3,5	Không phát hiện được
3	Đối chứng	96,5	3,4	0,2
	27 GA	96,3	3,5	0,2
	25 GA	96,4	3,5	0,2
	25 GA (thành mỏng)	96,3	3,5	0,2

Các kết quả này thể hiện sự ít thay đổi hoặc không thay đổi độ tinh khiết bởi SEC sau khi đẩy ra qua kim.

Tổng kết kết quả: Các kết quả phân tích khả năng bơm tiêm chứng minh rằng cả ba chế phẩm OMS646 đề xuất có nồng độ cao có khả năng bơm tiêm có thể chấp nhận được khi kiểm tra sử dụng kim thích hợp để dùng dưới da và ít thay đổi hoặc không thay đổi độ tinh khiết của OMS646 sau khi đẩy ra qua kim. Việc bổ sung PS-80 0,01% cung cấp sự cải thiện không mong muốn về khả năng bơm tiêm của chế phẩm chứa xitrat arginin.

Ví dụ 4

Ví dụ này mô tả nghiên cứu mà được thực hiện để đánh giá độ ổn định của chế

phẩm chứa kháng thể OMS646 đề xuất có độ nhớt thấp, nồng độ cao khi bảo quản trong thời gian dài.

Phương pháp:

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá độ ổn định của chế phẩm chứa kháng thể OMS646 có nồng độ cao để tiêm dưới da sau khi bảo quản trong thời gian dài.

Hai chế phẩm đề xuất được đánh giá như dưới đây:

A) 20 mM xitrat, 200 mM arginin, PS-80 0,01%, pH 5,8 (185 mg/mL OMS646)

B) 20 mM histidin, 200 mM arginin, PS-80 0,01%, pH 5,9 (185 mg/mL OMS646)

Các mẫu được nạp vào lọ nhỏ ống thủy tinh Schott loại 1 USP kích cỡ 2mL, 13mm (West Pharmaceuticals), với 1,0mL mẫu nạp, được nắp bằng nút Fluorotec 13mm (West Pharmaceuticals), và được bịt bằng bịt nhôm 13FO có nắp (West Pharmaceuticals hoặc tương đương). Lọ nhỏ chứa mẫu được bảo quản trong buồng được kiểm soát nhiệt độ đạt đến độ ổn định ở nhiệt độ $-75 \pm 10^{\circ}\text{C}$, $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$, $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}/60 \pm 5\% \text{RH}$, và $40 \pm 2^{\circ}\text{C}/75 \pm 5\% \text{RH}$. Đích của ít nhất 40 lọ nhỏ chứa mẫu của mỗi chế phẩm được bảo quản cho nghiên cứu này. Các mẫu được bảo quản dưới dạng chất lỏng được bảo quản theo hướng ngược, trong khi các mẫu đông lạnh được bảo quản thẳng đứng. Số lọ nhỏ được yêu cầu được kéo ở các thời điểm và điều kiện liên quan, và các mẫu được đặc trưng bởi các phương pháp dưới đây: Về bên ngoài kiểm tra bằng mắt, hàm lượng protein bằng A280, nồng độ molal đồng thẩm thấu, SEC-HPLC, pH, và MASP-2 ELISA. Số liệu SEC-HPLC làm ví dụ được tổng kết trong bảng 11 và thể hiện rằng kháng thể OMS646 duy trì tính nguyên vẹn của nó sau khi bảo quản ở nhiệt độ 5°C trong 6, 9 và 12 tháng. Số liệu ELISA xác nhận rằng kháng thể bảo toàn chức năng của nó sau khi bảo quản ở nhiệt độ 5°C trong 6, 9 và 12 tháng.

Kết quả: Các kết quả của nghiên cứu này được tổng kết trong bảng 11 dưới đây.

Bảng 11. Độ ổn định của chế phẩm như được phân tích bởi SEC

Chế phẩm	Thời điểm	Điều kiện	HMW tổng (oligome) (%)	Đỉnh chính (monome) (%)	LMW tổng (%)
185 mg/mL OMS646 20 mM xitrat 200mM arginin 0,01% polysorbat 80 pH 5,8	T0	NA	3,9	96,1	-
	1 tháng	-20°C	2,5	97,5	-
		5°C	2,6	97,4	-
		25°C/60% RH	2,7	97,3	-
	2 tháng	-20°C	2,9	97,1	-
		5°C	3,1	96,9	-
		25°C/60% RH	3,4	96,6	-
	3 tháng	-20°C	2,8	97,2	-
		5°C	2,9	97,1	-
		25°C/60% RH	3,3	96,0	0,7
	6 tháng	-20°C	1,7	98,3	-
		5°C	1,9	98,1	-
		25°C/60% RH	2,0	98,0	-
	9 tháng	5°C	3,4	96,6	-
		25°C/60% RH	4,0	95,7	0,2
	12 tháng	5°C	3,4	96,6	-
185 mg/mL OMS646 20 mM histidin 200mM arginin 0,01% polysorbat 80 pH 5,9	T0	NA	3,8	96,2	-
	1 tháng	-20°C	2,7	97,3	-
		5°C	2,7	97,3	-
		25°C/60% RH	2,9	97,1	-
	2 tháng	-20°C	2,9	97,1	-
		5°C	3,3	96,7	-
		25°C/60% RH	3,3	96,7	-
	3 tháng	-20°C	2,8	97,1	0,1
		5°C	3,0	96,9	0,1
		25°C/60% RH	3,1	96,1	0,8
	6 tháng	-20°C	1,8	98,2	-
		5°C	1,9	98,1	-
		25°C/60% RH	2,0	98,0	-

Như được thể hiện trong bảng 11, sự ít thay đổi hoặc không thay đổi độ tinh

khiết được quan sát trong các mẫu được bảo quản trong 9 tháng ở nhiệt độ -20°C hoặc được bảo quản ở nhiệt độ 5°C lên đến 12 tháng, nhiệt độ bảo quản dự định. Độ tinh khiết của các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 25°C cũng được duy trì qua 2 tháng, tuy nhiên, sự thay đổi nhẹ về độ tinh khiết ở nhiệt độ 25°C được quan sát qua 9 tháng bảo quản.

Ví dụ 5

Chế phẩm làm ví dụ chứa kháng thể OMS646 ức chế MASP-2 ở độ pH 5,8 được điều chế bằng cách kết hợp OMS646 (185 mg/mL) với xitrat (20 mM), arginin (200 mM) và polysorbat 80 (0,01%). Natri xitrat dihydrat (4,89 mg/mL) và axit xitric monohydrat (0,71 mg/mL) được sử dụng để điều chế đệm xitrat, với axit clohydric và/hoặc natri hydroxit được sử dụng để điều chỉnh độ pH khi cần thiết.

Độ nhớt của chế phẩm này được đo bằng nhớt kế mao dẫn, và các kết quả được thể hiện trong bảng 12. Có sự giảm nhẹ trong độ nhớt ở tốc độ trượt cao hơn, với tất cả giá trị dưới 13 cP.

Bảng 12: Độ nhớt của chế phẩm OMS646 làm ví dụ được đo ở các tốc độ trượt khác nhau

Chế phẩm	Nhiệt độ (°C)	Tốc độ trượt (1/giây)	Độ nhớt (cP)
185 mg/mL OMS646 20 mM xitrat 200mM arginin 0,01% polysorbat 80 pH 5,8	25,0	103000	12,2
	25,0	156000	11,5
	25,0	211000	11,0

Xác định được rằng đối tượng là người dùng liều với 185 mg/mL chế phẩm OMS646 làm ví dụ được mô tả trong ví dụ này (cả dùng bằng cách tiêm dưới da và trong tĩnh mạch sau khi pha loãng) dẫn đến mức độ ức chế con đường lectin cao và bền vững.

Trong khi các phương án được ưu tiên của sáng chế được minh họa và mô tả, được đánh giá cao rằng các sự thay đổi khác nhau đối với các chế phẩm và phương pháp được bộc lộ có thể được thực hiện trong đó mà không xa rời nguyên tắc và phạm vi của sáng chế. Do đó, được dự định là phạm vi của đơn sáng chế nêu trên chỉ bị giới hạn bởi các định nghĩa của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Theo mô tả ở trên, các dấu hiệu của sáng chế như các phương án dưới đây.

1. Dược phẩm ổn định thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa cho đối tượng là động vật có vú, trong đó dược phẩm này chứa:

(a) dung dịch nước chứa hệ đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0; và

(b) kháng thể đơn dòng hoặc mảnh của kháng thể này gắn đặc hiệu với MASP-2 ở người có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 50 mg/mL đến khoảng 250 mg/mL, trong đó kháng thể hoặc mảnh của kháng thể này chứa (i) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 của SEQ ID NO:2 và (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 của SEQ ID NO:3, hoặc biến thể của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có độ đồng nhất ít nhất 95% với SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có độ đồng nhất ít nhất bằng 95% với SEQ ID NO:3;

trong đó chế phẩm có độ nhớt nằm trong khoảng từ 2 đến 50 centipoise (cP), và trong đó dược phẩm này là ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất một tháng.

2. Dược phẩm theo mục 1, trong đó nồng độ của kháng thể trong dược phẩm này nằm trong khoảng từ khoảng 100 mg/mL đến khoảng 225 mg/mL.

3. Dược phẩm theo mục 1, trong đó nồng độ của kháng thể trong dược phẩm này nằm trong khoảng từ khoảng 150 mg/mL đến khoảng 200 mg/mL.

4. Dược phẩm theo mục 1, trong đó nồng độ của kháng thể trong dược phẩm này nằm trong khoảng từ khoảng hoặc khoảng 175 mg/mL đến khoảng 195 mg/mL.

5. Dược phẩm theo mục 1 hoặc mục 2, trong đó độ nhớt của dược phẩm này nằm trong khoảng từ khoảng 2 cP đến khoảng 40 cP.

6. Dược phẩm theo mục 1 hoặc mục 2, trong đó độ nhớt của dược phẩm này nằm trong khoảng từ khoảng 2 cP đến khoảng 30 cP.

7. Dược phẩm theo mục 1 hoặc mục 2, trong đó độ nhớt của dược phẩm này nằm trong khoảng từ khoảng 2 cP đến khoảng 25 cP.

8. Dược phẩm theo mục 1 hoặc mục 2, trong đó độ nhớt của dược phẩm này nằm trong khoảng từ khoảng 2 cP đến khoảng 20 cP.

9. Dược phẩm theo mục 1 hoặc mục 2, trong đó độ nhớt của dược phẩm này nằm

trong khoảng từ khoảng 2 cP đến khoảng 18 cP.

10. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 9, trong đó hệ đệm chứa ít nhất một chất đệm được dụng có hằng số phân ly axit trong 2 đơn vị pH của độ pH của dược phẩm.

11. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 10, trong đó hệ đệm chứa ít nhất một chất đệm được chọn từ nhóm bao gồm suxinat, histidin và xitrat.

12. Dược phẩm theo mục 11, trong đó ít nhất một chất đệm là histidin hoặc xitrat.

13. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 12, trong đó ít nhất một chất đệm là xitrat.

14. Dược phẩm theo mục 13, trong đó ít nhất một chất đệm là natri xitrat.

15. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 12, trong đó ít nhất một chất đệm là histidin.

16. Dược phẩm theo mục 15, trong đó ít nhất một chất đệm là L-histidin.

17. Dược phẩm theo mục 13, trong đó xitrat có mặt trong dung dịch có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 50 mM.

18. Dược phẩm theo mục 15, trong đó histidin có mặt trong dung dịch có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 50 mM.

19. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 18, trong đó dược phẩm còn chứa ít nhất một tá dược được chọn từ nhóm bao gồm protein, axit amin, đường, rượu polyhydric, muối, axit béo và phospholipit.

20. Dược phẩm theo mục 19, trong đó ít nhất một tá dược là chất biến đổi độ trương ở lượng đủ để dược phẩm này là ưu trương.

21. Dược phẩm theo mục 20, trong đó chất biến đổi độ trương được chọn từ nhóm bao gồm axit amin có chuỗi bên tích điện, đường hoặc rượu polyhydric khác và muối.

22. Dược phẩm theo mục 21, trong đó chất biến đổi độ trương là đường hoặc rượu polyhydric khác và được chọn từ nhóm bao gồm sucroza, trehaloza, manitol và sorbitol.

23. Dược phẩm theo mục 21, trong đó chất biến đổi độ trương là muối được chọn từ

nhóm bao gồm NaCl hoặc muối của axit amin.

24. Dược phẩm theo mục 21, trong đó chất biến đổi độ trương là axit amin có chuỗi bên tích điện.
25. Dược phẩm theo mục 24, trong đó axit amin có chuỗi bên tích điện có trong chế phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 150 mM đến khoảng 300 mM.
26. Dược phẩm theo mục 24 hoặc 25, trong đó chất biến đổi độ trương là axit amin có chuỗi bên tích điện âm.
27. Dược phẩm theo mục 24 hoặc 25, trong đó tá dược biến đổi độ trương là axit amin có chuỗi bên tích điện dương.
28. Dược phẩm theo mục 26, trong đó chất biến đổi độ trương là glutamat.
29. Dược phẩm theo mục 27, trong đó chất biến đổi độ trương là arginin.
30. Dược phẩm theo mục 29, trong đó chất biến đổi độ trương là L-arginin HCl.
31. Dược phẩm theo mục 29, trong đó arginin có mặt trong dung dịch ở nồng độ ưu trương nằm trong khoảng từ 200 mM đến 300 mM.
32. Dược phẩm theo mục 17, trong đó dung dịch chứa khoảng 20 mM xitrat và có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,5.
33. Dược phẩm theo mục 32, trong đó dung dịch còn chứa arginin ở nồng độ bằng khoảng 200 mM.
34. Dược phẩm theo mục 18, trong đó dung dịch chứa khoảng 20 mM histidin và có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,5.
35. Dược phẩm theo mục 34, trong đó dung dịch còn chứa arginin ở nồng độ bằng khoảng 200 mM.
36. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 35, trong đó dung dịch còn chứa chất hoạt động bề mặt có nồng độ từ khoảng 0,001% (khối lượng/thể tích) đến khoảng 0,1% (khối lượng/thể tích).
37. Dược phẩm theo mục 36, trong đó chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt không ion.
38. Dược phẩm theo mục 37, trong đó chất hoạt động bề mặt là polysorbat hoặc

poloxame.

39. Dược phẩm theo mục 38, trong đó chất hoạt động bề mặt là polysorbat 80.

40. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 39, trong đó dược phẩm này là ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất 6 tháng.

41. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 39, trong đó dược phẩm này là ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất 12 tháng.

42. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 39, trong đó độ nhớt nhỏ hơn khoảng 25 cP.

43. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 39, trong đó độ nhớt nhỏ hơn khoảng 20 cP.

44. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 39, trong đó độ nhớt nhỏ hơn khoảng 18 cP.

45. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 39, trong đó lực trượt khi tiêm của dược phẩm nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 25 Newton khi được tiêm qua kim 27GA 1,25” ở nhiệt độ trong phòng.

46. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 39, trong đó lực trượt khi tiêm của dược phẩm nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 20 Newton khi được tiêm qua kim 25GA 1” ở nhiệt độ trong phòng.

47. Dược phẩm theo mục 1, trong đó dược phẩm này chứa: khoảng 20 mM natri xitrat, khoảng 200mM L-arginin HCl, trong đó nồng độ của kháng thể trong dược phẩm này nằm trong khoảng từ khoảng 175 mg/mL đến khoảng 195 mg/mL, và trong đó độ nhớt nhỏ hơn khoảng 25cP.

48. Dược phẩm theo mục 47, trong đó dược phẩm này còn chứa polysorbat 80 với lượng nằm trong khoảng từ 0,001% khối lượng/thể tích đến 0,05% khối lượng/thể tích.

49. Dược phẩm theo mục 1, trong đó dược phẩm này chứa: khoảng 20mM L-histidin, khoảng 200mM L-arginin HCl, trong đó nồng độ của kháng thể trong dược phẩm này

nằm trong khoảng từ khoảng 175 mg/mL đến khoảng 195 mg/mL, và trong đó độ nhớt nhỏ hơn khoảng 25cP.

50. Dược phẩm theo mục 49, trong đó dược phẩm này còn chứa polysorbat 80 với lượng nằm trong khoảng từ 0,001% khối lượng/thể tích đến 0,05% khối lượng/thể tích.

51. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 50, trong đó dược phẩm này là vô trùng.

52. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 50, trong đó kháng thể đơn dòng là kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ.

53. Dược phẩm theo mục 52, trong đó kháng thể là kháng thể IgG4 có chiều dài đầy đủ của người.

54. Dược phẩm theo mục 53, trong đó IgG4 chứa đột biến trong vùng bản lề.

55. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 54, trong đó dược phẩm này không chứa sucroza hoặc sorbitol.

56. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 54, trong đó dược phẩm này không chứa CaCl_2 .

57. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 54, trong đó dược phẩm này không chứa MgCl_2 .

58. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 54, trong đó dược phẩm này không chứa CaCl_2 và trong đó dược phẩm này không chứa MgCl_2 .

59. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 54, trong đó dược phẩm này không chứa chất phụ gia cation hóa trị hai.

60. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 59, trong đó nồng độ của kháng thể bằng khoảng 185 mg/mL.

61. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 60, trong đó dược phẩm này còn chứa enzym hyaluronidaza ở lượng hữu hiệu để làm tăng sự phân tán và/hoặc hấp thụ của kháng thể sau khi dùng dưới da.

62. Dược phẩm theo mục 61, trong đó dược phẩm này chứa từ khoảng 100 U/mL đến khoảng 20.000 U/mL enzym hyaluronidaza.

63. Dược phẩm theo mục 1, trong đó dược phẩm này chứa:

- (a) polysorbat 80 có nồng độ từ khoảng 0,01 đến khoảng 0,08% khối lượng/thể tích;
- (b) L-arginin HCl có nồng độ từ khoảng 150 mM đến khoảng 200 mM;
- (c) natri xitrat có nồng độ từ khoảng 10 mM đến khoảng 50 mM; và
- (d) kháng thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 150 mg/mL đến khoảng 200 mg/mL.

64. Dược phẩm theo mục 1, trong đó dược phẩm này chứa:

- (a) polysorbat 80 có nồng độ từ khoảng 0,01 đến khoảng 0,08% khối lượng/thể tích;
- (b) L-arginin HCl có nồng độ từ khoảng 150 mM đến khoảng 200 mM;
- (c) L-histidin có nồng độ từ khoảng 10 mM đến khoảng 50 mM; và
- (d) kháng thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 150 mg/mL đến khoảng 200 mg/mL.

65. Dược phẩm theo mục 1, trong đó dược phẩm này chứa:

- (a) polysorbat 80 có nồng độ bằng khoảng 0,01 khối lượng/thể tích;
- (b) L-arginin HCl có nồng độ bằng khoảng 200 mM;
- (c) natri xitrat có nồng độ bằng khoảng 20 mM; và
- (d) kháng thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 175 mg/mL đến khoảng 195 mg/mL.

66. Dược phẩm theo mục 1, trong đó dược phẩm này chứa:

- (a) polysorbat 80 có nồng độ bằng khoảng 0,01% khối lượng/thể tích;
- (b) L-arginin HCl có nồng độ bằng khoảng 200 mM;
- (c) L-histidin có nồng độ bằng khoảng 20 mM; và
- (d) kháng thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 175 mg/mL đến khoảng 195 mg/mL.

67. Dược phẩm theo mục 1, trong đó dược phẩm này chứa:

- (a) polysorbat 80 có nồng độ bằng khoảng 0,01% khối lượng/thể tích;
- (b) L-arginin HCl có nồng độ bằng khoảng 200 mM;
- (c) natri xitrat có nồng độ bằng khoảng 20 mM; và
- (d) kháng thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 175 mg/mL đến khoảng 195 mg/mL.

68. Dược phẩm theo mục 1, trong đó dược phẩm này chứa:

- (a) polysorbat 80 có nồng độ bằng khoảng 0,01% khối lượng/thể tích;
- (b) L-arginin HCl có nồng độ bằng khoảng 200 mM;
- (c) L-histidin có nồng độ bằng khoảng 20 mM; và
- (d) kháng thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 175 mg/mL đến khoảng 195 mg/mL.

69. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 63 đến 68, trong đó dược phẩm này còn chứa từ khoảng 100 U/mL đến khoảng 20.000 U/mL enzym hyaluronidaza hữu hiệu để làm tăng sự phân tán và/hoặc hấp thụ của kháng thể sau khi dùng dưới da.

70. Dược phẩm chứa nước ổn định thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa cho đối tượng là động vật có vú, trong đó dược phẩm này về cơ bản chứa:

- (a) polysorbat 80 có nồng độ từ khoảng 0,01 đến khoảng 0,08% khối lượng/thể tích;
- (b) L-arginin HCl có nồng độ từ khoảng 150 mM đến khoảng 200 mM;
- (c) natri xitrat có nồng độ từ khoảng 10 mM đến khoảng 50 mM; và
- (d) kháng thể đơn dòng hoặc mảnh của kháng thể này gắn đặc hiệu với MASP-2 ở người ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 150 mg/mL đến khoảng 200 mg/mL, trong đó kháng thể hoặc mảnh của kháng thể này chứa (i) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 của SEQ ID NO:2 và (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 của SEQ ID NO:3, hoặc biến thể của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có độ đồng nhất ít nhất 95% với SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có độ đồng nhất ít nhất bằng 95% với SEQ ID NO:3;

trong đó dược phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng

7,0, độ nhớt nằm trong khoảng từ 2 đến 50 centipoise (cP), và trong đó dược phẩm này là ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất một tháng.

71. Dược phẩm chứa nước ổn định thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa cho đối tượng là động vật có vú, trong đó dược phẩm này về cơ bản chứa:

(a) polysorbate 80 có nồng độ từ khoảng 0,01 đến khoảng 0,08% khối lượng/thể tích;

(b) L-arginin HCl có nồng độ từ khoảng 150 mM đến khoảng 200 mM;

(c) L-histidin có nồng độ từ khoảng 10 mM đến khoảng 50 mM; và

(d) kháng thể đơn dòng hoặc mảnh của kháng thể này gắn đặc hiệu với MASP-2 ở người ở nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 150 mg/mL đến khoảng 200 mg/mL, trong đó kháng thể hoặc mảnh của kháng thể này chứa (i) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 của SEQ ID NO:2 và (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 của SEQ ID NO:3, hoặc biến thể của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có độ đồng nhất ít nhất 95% với SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có độ đồng nhất ít nhất bằng 95% với SEQ ID NO:3;

trong đó dược phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0, độ nhớt nằm trong khoảng từ 2 đến 50 centipoise (cP), và trong đó dược phẩm này là ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất một tháng.

72. Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 71, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:3.

73. Vật chứa kín chứa dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 72.

74. Thiết bị dùng dưới da chứa dược phẩm trong thiết bị này theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 72.

75. Kit chứa vật chứa được nạp sẵn chứa dược phẩm chứa kháng thể MASP-2 theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 72 và hướng dẫn sử dụng dược phẩm.

76. Kit theo mục 75, trong đó vật chứa được nạp sẵn được chọn từ nhóm bao gồm: ống tiêm, dụng cụ tiêm dạng bút, lọ nhỏ kín, dụng cụ tiêm tự động và thiết bị bơm (ví dụ, bơm dán trên cơ thể hoặc bơm khí áp).

77. Kit chứa:

(a) vật chứa thứ nhất được nạp sẵn chứa được phẩm chứa kháng thể MASP-2 theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 60 hoặc các mục từ 63 đến 72;

(b) vật chứa thứ hai được nạp sẵn chứa lượng enzym hyaluronidaza hữu hiệu để làm tăng sự phân tán và/hoặc hấp thụ của kháng thể MASP-2 sau khi dùng dưới da; và

(c) hướng dẫn sử dụng.

78. Kit theo mục 77, trong đó ít nhất một trong số vật chứa thứ nhất hoặc vật chứa thứ hai được nạp sẵn được chọn từ nhóm bao gồm: ống tiêm, dụng cụ tiêm dạng bút, lọ nhỏ kín, dụng cụ tiêm tự động và thiết bị bơm (ví dụ, bơm dán trên cơ thể hoặc bơm khí áp).

79. Dạng liều đơn vị được thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa cho người, chứa được phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 72 trong vật chứa thích hợp.

80. Phương pháp điều trị cho đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn phải điều trị bằng kháng thể ức chế MASP-2 bao gồm bước dùng được phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 72 cho đối tượng cần điều trị.

81. Phương pháp theo mục 80, trong đó được phẩm được dùng dưới da cho đối tượng.

82. Phương pháp theo mục 80, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc dùng cho đối tượng enzym hyaluronidaza ở lượng hữu hiệu để làm tăng sự phân tán và/hoặc hấp thụ của kháng thể.

83. Phương pháp theo mục 82, trong đó enzym hyaluronidaza được dùng đồng thời với được phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2.

84. Phương pháp theo mục 82 hoặc 83, trong đó được phẩm này chứa kháng thể ức chế MASP-2 và enzym hyaluronidaza.

85. Phương pháp theo mục 82, trong đó enzym hyaluronidaza được dùng cho đối tượng trước được phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2.

86. Phương pháp theo mục 82, trong đó enzym hyaluronidaza được dùng cho đối tượng sau được phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2.
87. Phương pháp theo mục 80, trong đó được phẩm được dùng qua ống tiêm được nạp sẵn chứa được phẩm trong ống tiêm này.
88. Phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2 ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể bao gồm bước dùng được phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 72 cho đối tượng cần điều trị.
89. Phương pháp theo mục 88, trong đó được phẩm được dùng dưới da cho đối tượng.
90. Phương pháp theo mục 79, trong đó được phẩm được dùng qua ống tiêm được nạp sẵn chứa được phẩm trong ống tiêm này.
91. Phương pháp theo mục 88, trong đó đối tượng đang mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể được chọn từ nhóm bao gồm bệnh mao mạch huyết khối (thrombotic microangiopathy - TMA), tình trạng bệnh lý ở thận, phản ứng viêm kết quả từ sự cấy ghép mô hoặc cơ quan, tổn thương tái tưới máu do thiếu máu cục bộ, biến chứng liên quan đến đái tháo đường, bệnh hoặc rối loạn tim mạch, rối loạn dạ dày-ruột non do viêm, rối loạn ở phổi, bệnh hoặc rối loạn về mắt và bệnh đông máu trong mạch máu rải rác.
92. Phương pháp theo mục 91, trong đó bệnh mao mạch huyết khối là hội chứng tan máu không điển hình (atypical hemolytic syndrome - aHUS).
93. Phương pháp theo mục 91, trong đó bệnh mao mạch huyết khối liên quan đến mảnh ghép tế bào gốc tạo máu.
94. Phương pháp theo mục 91, trong đó tình trạng bệnh lý ở thận là bệnh thận IgA.
95. Phương pháp theo mục 91, trong đó tình trạng bệnh lý ở thận là luput viêm thận.
96. Phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc MASP-2 ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể bao gồm bước pha loãng được phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 72 thành chất pha loãng được dụng và bước dùng được phẩm đã pha loãng toàn thân cho đối tượng cần điều trị.
97. Phương pháp theo mục 96, trong đó được phẩm đã pha loãng được dùng trong tĩnh mạch cho đối tượng.

98. Phương pháp theo mục 96, trong đó đối tượng đang mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể được chọn từ nhóm bao gồm bệnh mao mạch huyết khối (thrombotic microangiopathy - TMA), tình trạng bệnh lý ở thận, phản ứng viêm kết quả từ sự cấy ghép mô hoặc cơ quan, tổn thương tái tưới máu do thiếu máu cục bộ, biến chứng liên quan đến đái tháo đường, bệnh hoặc rối loạn tim mạch, rối loạn dạ dày-ruột non do viêm, rối loạn ở phổi, bệnh hoặc rối loạn về mắt, và bệnh đông máu trong mạch máu rải rác.

99. Phương pháp theo mục 98, trong đó bệnh mao mạch huyết khối là hội chứng tan máu không điển hình (atypical hemolytic syndrome - aHUS).

100. Phương pháp theo mục 98, trong đó bệnh mao mạch huyết khối liên quan đến mảnh ghép tế bào gốc tạo máu.

101. Phương pháp theo mục 98, trong đó tình trạng bệnh lý ở thận là bệnh thận IgA.

102. Phương pháp theo mục 98, trong đó tình trạng bệnh lý ở thận là luput viêm thận.

103. Chế phẩm dược để sử dụng trong điều trị cho bệnh nhân đang mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể phụ thuộc MASP-2, trong đó chế phẩm này là vô trùng, dạng liều dùng một lần chứa kháng thể ức chế MASP-2 với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 350mg đến khoảng 400mg, trong đó chế phẩm này chứa từ khoảng 1,8mL đến khoảng 2,2 mL của 185mg/mL dược phẩm chứa kháng thể, trong đó kháng thể chứa (i) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 và (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:3, và trong đó chế phẩm này là ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất sáu tháng.

104. Chế phẩm dược theo mục 103, trong đó chế phẩm này chứa hệ đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0.

105. Chế phẩm dược theo mục 104, trong đó hệ đệm chứa ít nhất một chất đệm được dụng được chọn từ nhóm bao gồm suxinat, histidin và xitrat.

106. Chế phẩm dược theo mục 103, trong đó chế phẩm này chứa từ 1,8mL đến 2,2 mL của dược phẩm chứa kháng thể 185 mg/mL ức chế MASP-2 theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 72.

107. Chế phẩm dược theo mục bất kỳ trong số các mục 103 đến 107, trong đó bệnh

hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể phụ thuộc MASP-2 là aHUS.

108. Chế phẩm được theo mục bất kỳ trong số các mục 103 đến 107, trong đó bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể phụ thuộc MASP-2 là HSCT-TMA.

109. Chế phẩm được theo mục bất kỳ trong số các mục 103 đến 107, trong đó bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể phụ thuộc MASP-2 là IgAN.

110. Chế phẩm được theo mục bất kỳ trong số các mục 103 đến 107, trong đó bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể phụ thuộc MASP-2 là luput viêm thận (lupus nephritis - LN).

Trong khi phương án được ưu tiên của sáng chế được minh họa và mô tả, được đánh giá là các thay đổi khác nhau có thể được thực hiện trong đó mà không vượt ra khỏi nguyên tắc và phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm ổn định thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa cho đối tượng là động vật có vú, trong đó dược phẩm này chứa:

(a) dung dịch nước chứa hệ đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0, trong đó hệ đệm này chứa ít nhất một chất đệm được chọn từ nhóm bao gồm xitrat ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 50 mM hoặc histidin ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 50 mM;

(b) kháng thể đơn dòng gắn đặc hiệu với MASP-2 ở người và chứa (i) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 và (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:3; và trong đó kháng thể này ở nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 250 mg/mL;

(c) arginin ở nồng độ nằm trong khoảng từ 200 mM đến 300 mM; và

(d) chất hoạt động bề mặt không ion được chọn từ polysorbat hoặc poloxame ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01% (khối lượng/ thể tích) đến 0,1% (khối lượng/ thể tích);

trong đó dược phẩm này có độ nhớt nằm trong khoảng từ 2 đến 50 milipascal-giây (mPa.s) khi được đo ở nhiệt độ 25°C với tốc độ trượt nằm trong khoảng từ 100.000 đến 250.000 1/giây, và trong đó dược phẩm này là ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất sáu tháng.

2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa ít nhất một hoặc nhiều dấu hiệu dưới đây:

(a) trong đó nồng độ của kháng thể trong dược phẩm này nằm trong khoảng từ khoảng 100 mg/mL đến khoảng 225 mg/mL, hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 150 mg/mL đến khoảng 200 mg/mL hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 175 mg/mL đến khoảng 195 mg/mL;

(b) trong đó độ nhớt của dược phẩm này nằm trong khoảng từ khoảng 2 mPa.s đến khoảng 40 mPa.s, hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 2 mPa.s đến khoảng 30 mPa.s, hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 2 mPa.s đến khoảng 25 mPa.s, hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 2 mPa.s đến khoảng 20 mPa.s hoặc nằm trong khoảng từ

khoảng 2 mPa.s đến khoảng 18 mPa.s;

(c) trong đó độ nhớt này nhỏ hơn khoảng 25 mPa.s, hoặc nhỏ hơn khoảng 20 mPa.s hoặc nhỏ hơn khoảng 18 mPa.s;

(d) trong đó nồng độ của kháng thể bằng khoảng 185 mg/mL;

(e) trong đó dược phẩm này là ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất 12 tháng;

(f) trong đó lực trượt khi tiêm của dược phẩm nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 25 Newton khi được tiêm qua kim 27GA 1,25” ở nhiệt độ trong phòng; và/hoặc

(g) trong đó lực trượt khi tiêm của dược phẩm nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 20 Newton khi được tiêm qua kim 25GA 1” ở nhiệt độ trong phòng.

3. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó ít nhất một chất đệm là xitrat.

4. Dược phẩm theo điểm 3, trong đó dung dịch chứa khoảng 20 mM xitrat và có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,5, và trong đó dung dịch này còn chứa arginin ở nồng độ bằng khoảng 200 mM.

5. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó chất hoạt động bề mặt không ion là polysorbat 80.

6. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa khoảng 20 mM natri xitrat, khoảng 200 mM L-arginin HCl, trong đó nồng độ của kháng thể trong dược phẩm này nằm trong khoảng từ khoảng 175 mg/mL đến khoảng 195 mg/mL, và trong đó độ nhớt nhỏ hơn khoảng 25mPa.s, và trong đó dược phẩm này chứa polysorbat 80 với lượng nằm trong khoảng từ 0,001% khối lượng/thể tích đến 0,05% khối lượng/thể tích.

7. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này là vô trùng.

8. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể IgG4 có chiều dài đầy đủ của người, như kháng thể IgG4 ở người chứa đột biến trong vùng bản lề.

9. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa một hoặc nhiều dấu hiệu dưới đây:

(a) trong đó dược phẩm này không chứa sucroza hoặc sorbitol;

(b) trong đó dược phẩm này không chứa CaCl_2 ;

(c) trong đó dược phẩm này không chứa MgCl_2 ;

(d) trong đó dược phẩm này không chứa CaCl_2 và trong đó dược phẩm này không chứa MgCl_2 ; và/hoặc

(e) trong đó dược phẩm này không chứa chất phụ gia cation hóa trị hai.

10. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) dược phẩm chứa:

(a) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 đến khoảng 0,08% khối lượng/thể tích;

(b) L-arginin HCl có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 150 mM đến khoảng 200 mM;

(c) natri xitrat có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 mM đến khoảng 50 mM; và

(d) kháng thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 150 mg/mL đến khoảng 200 mg/mL; và

(ii) dược phẩm chứa:

(a) polysorbat 80 có nồng độ bằng khoảng 0,01 khối lượng/thể tích;

(b) L-arginin HCl có nồng độ bằng khoảng 200 mM;

(c) natri xitrat có nồng độ bằng khoảng 20 mM; và

(d) kháng thể có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 175 mg/mL đến khoảng 195 mg/mL.

11. Dược phẩm chứa nước ổn định thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa cho đối tượng là động vật có vú, trong đó dược phẩm này về cơ bản chứa:

(a) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 đến khoảng 0,08% khối lượng/thể tích;

(b) L-arginin HCl có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 150 mM đến khoảng 200 mM;

(c) natri xitrat có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 mM đến khoảng 50 mM; và

(d) kháng thể đơn dòng gắn đặc hiệu với MASP-2 ở người và chứa (i) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 và (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:3, và trong đó kháng thể này ở nồng độ nằm trong khoảng từ 150 mg/mL đến 200 mg/mL;

trong đó dược phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0, độ nhớt nằm trong khoảng từ 2 đến 50 milipascal-giây (mPa.s) khi được đo ở nhiệt độ 25°C với tốc độ trượt nằm trong khoảng từ 100.000 đến 250.000 1/giây, và trong đó dược phẩm này là ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất sáu tháng.

12. Vật chứa kín chứa dược phẩm theo điểm 1 hoặc điểm 11.

13. Thiết bị dùng dưới da chứa dược phẩm theo điểm 1 hoặc điểm 11 trong thiết bị này.

14. Kit chứa vật chứa được nạp sẵn chứa dược phẩm chứa kháng thể MASP-2 theo điểm 1 hoặc điểm 11 và hướng dẫn sử dụng dược phẩm này, trong đó vật chứa được nạp sẵn này được chọn từ nhóm bao gồm: xi lanh, dụng cụ tiêm dạng bút, lọ nhỏ kín, dụng cụ tiêm tự động và thiết bị bơm, tùy ý trong đó kit này còn chứa ít nhất một thiết bị tiêm thích hợp để dùng dược phẩm trong lọ nhỏ kín cho đối tượng là người.

15. Thuốc thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa cho người, trong đó thuốc này chứa dạng liều đơn vị của dược phẩm theo điểm 1 hoặc điểm 11 trong vật chứa thích hợp.

16. Chế phẩm được để sử dụng trong điều trị cho bệnh nhân đang mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc rối loạn liên quan đến bổ thể phụ thuộc MASP-2, trong đó chế phẩm dược này là vô trùng, dạng liều dùng một lần chứa kháng thể ức chế MASP-2 với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 350mg đến khoảng 400mg, trong đó chế phẩm dược này chứa từ khoảng 1,8mL đến khoảng 2,2 mL dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 1 hoặc điểm 11.

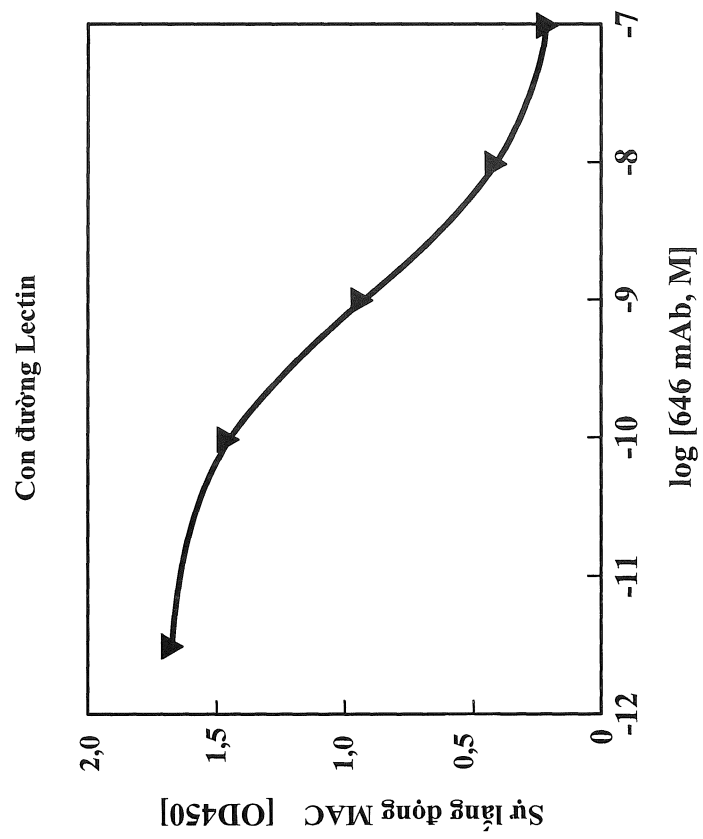


Fig.1A

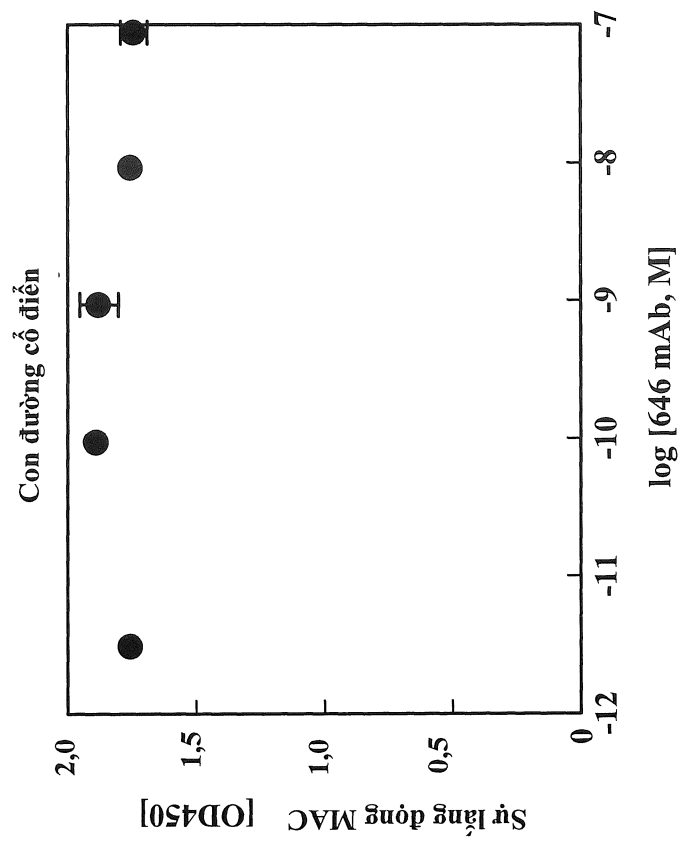


Fig.1B

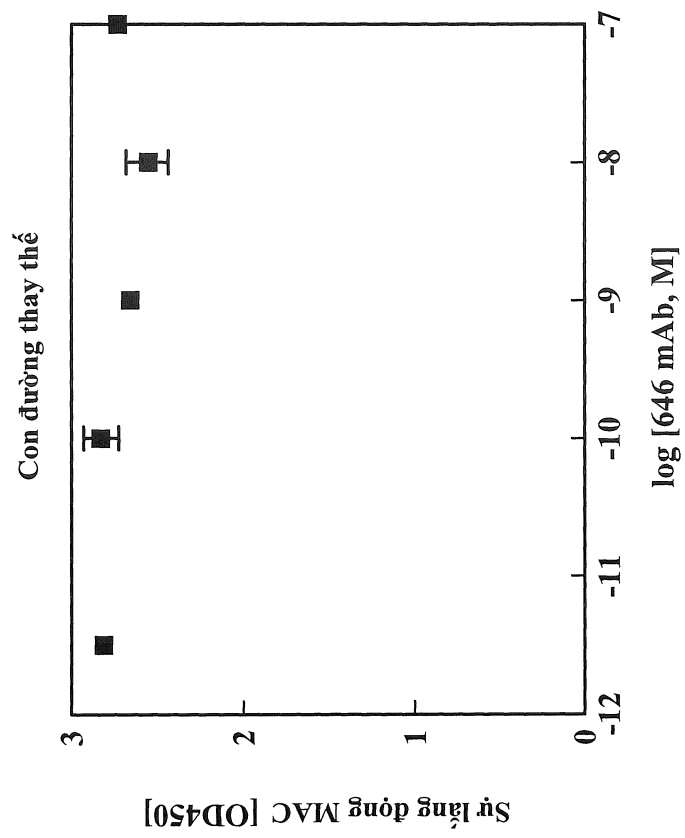


Fig.1C

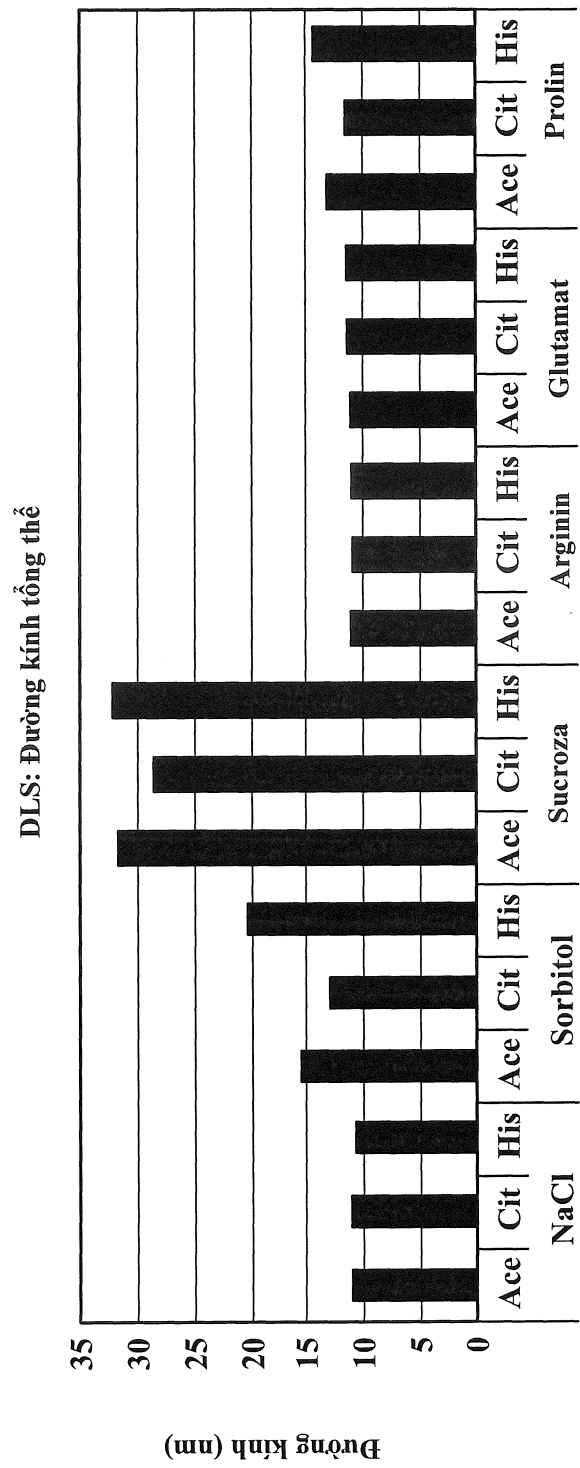
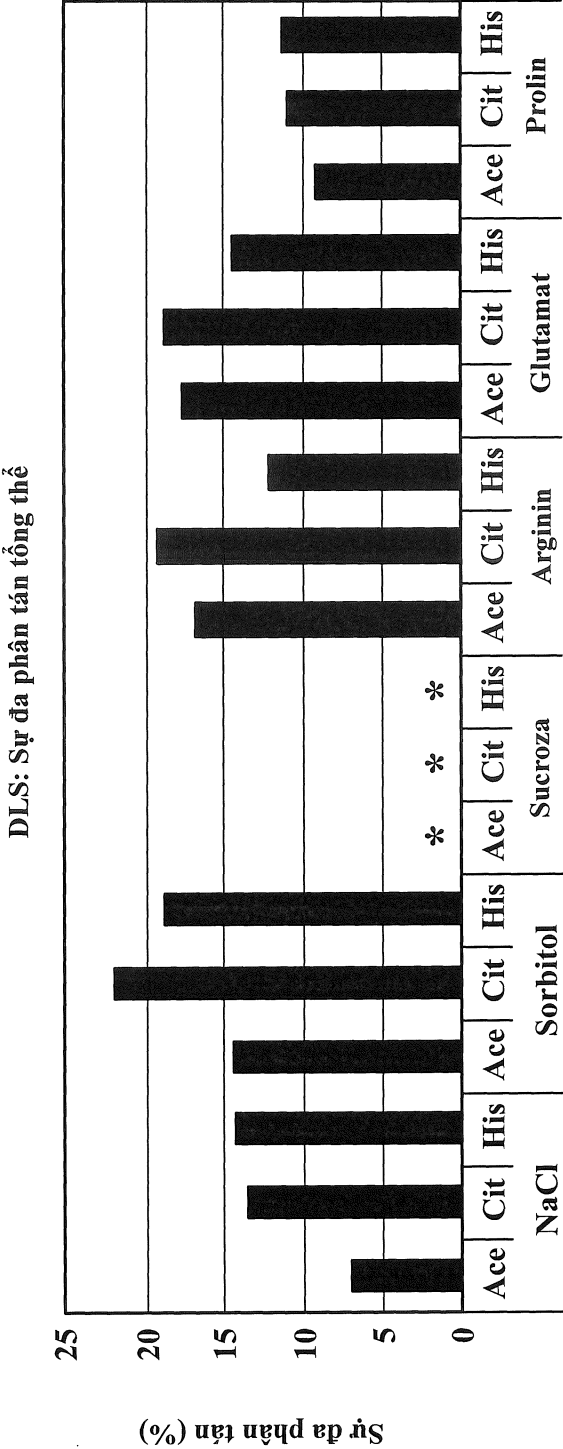


Fig.2A



* Đa chế độ

Fig.2B

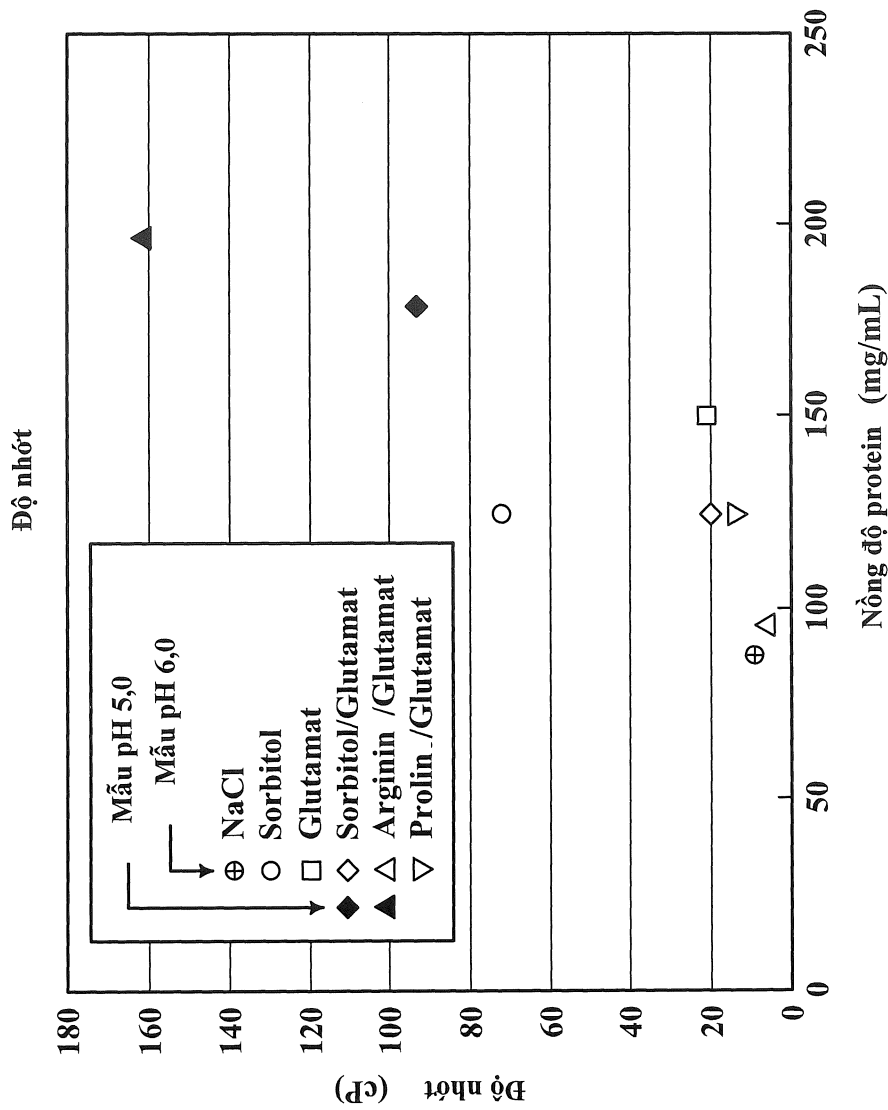


Fig.3

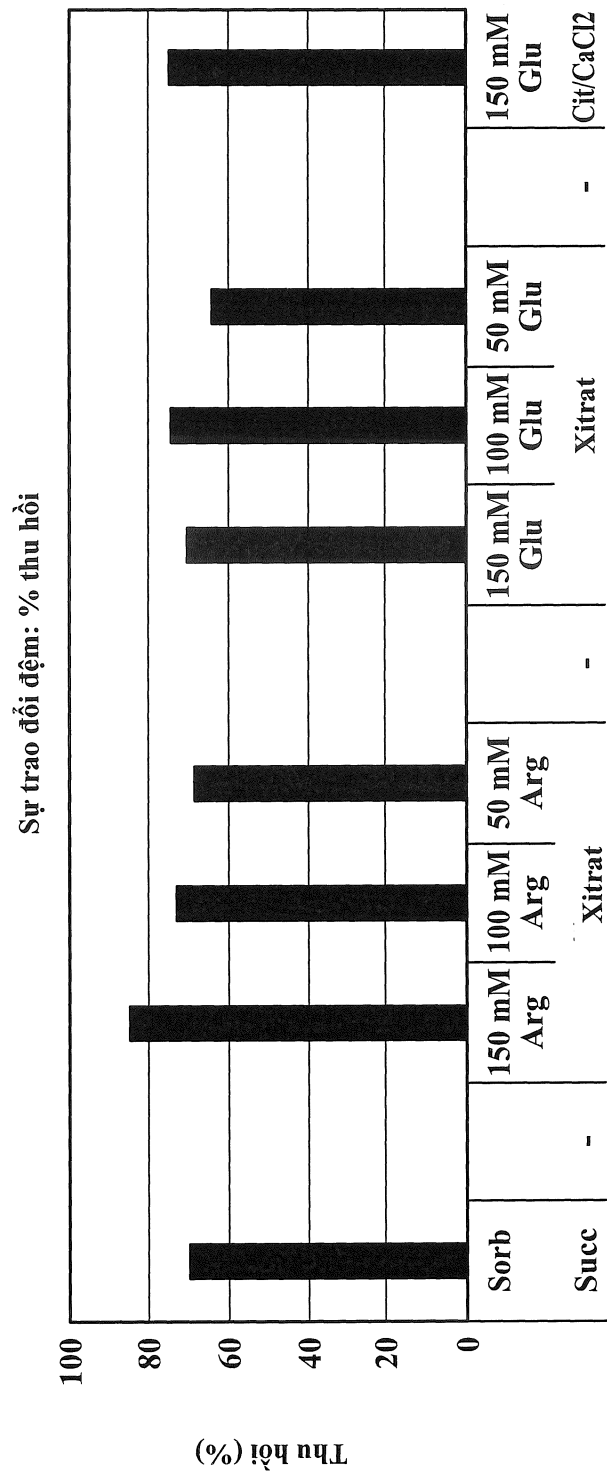


Fig.4

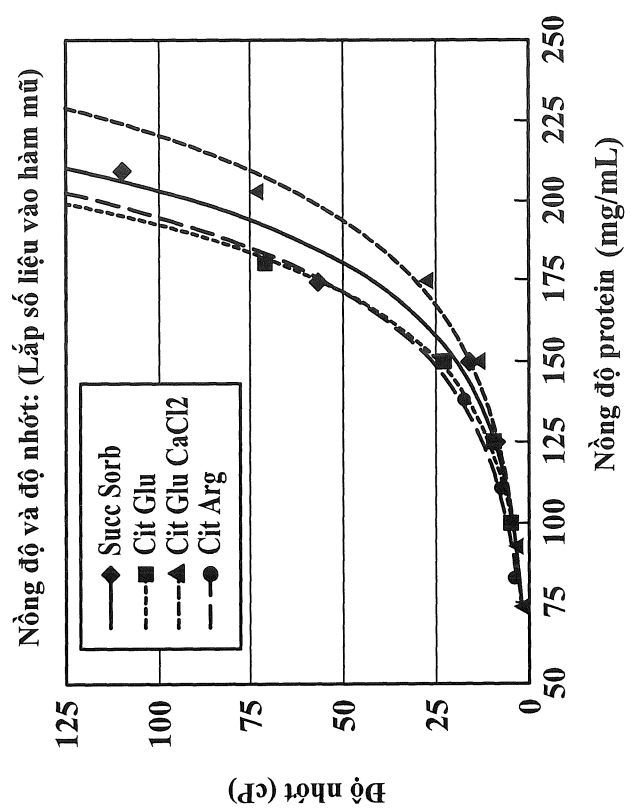


Fig.5

Khả năng dùng bơm tiêm: Tải trung bình

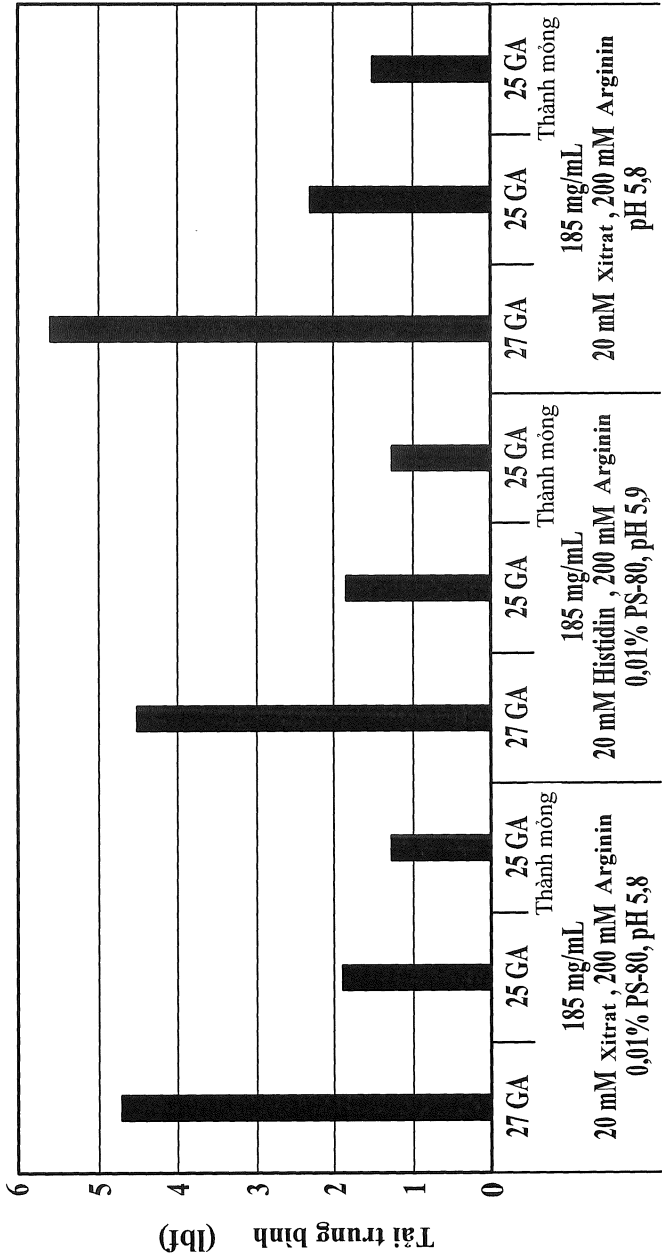


Fig.7A

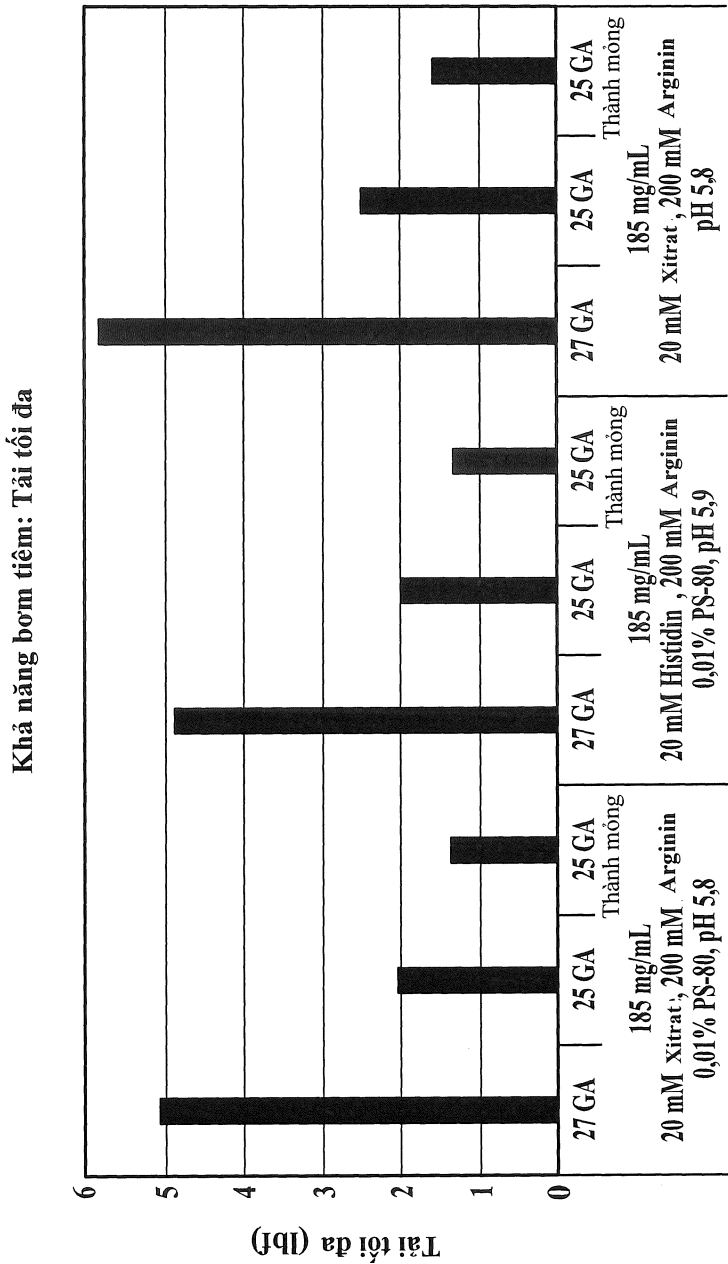


Fig.7B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Omeros Corporation
 Gregory A. Demopoulos
 Kenneth M. Ferguson
 William Joseph Lambert
 John Steven Whitaker

<120> Chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-2 có độ nhớt thấp rất cô đặc,
 kit và phương pháp

<130> MP.1.0261.PCT

<150> US 62/382,156

<151> 2016-08-31

<160> 7

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 671

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala
 1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp
 20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
 35 40 45

Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
 50 55 60

Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
 65 70 75 80

Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser
 85 90 95

Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe

100	105	110
Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln 115 120 125		
Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His 130 135 140		
Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg 145 150 155 160		
Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln 165 170 175		
Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys 180 185 190		
Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val 195 200 205		
Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr 210 215 220		
Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His 225 230 235 240		
Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser 245 250 255		
Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr 260 265 270		
Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Tyr Pro 275 280 285		
Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile 290 295 300		
Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu 305 310 315 320		

Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp
 325 330 335

Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly
 340 345 350

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro
 355 360 365

Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr
 370 375 380

Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp
 385 390 395 400

Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu
 405 410 415

Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly
 420 425 430

Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu
 435 440 445

Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu
 450 455 460

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu
 465 470 475 480

Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln
 485 490 495

Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala
 500 505 510

Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val
 515 520 525

Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu
530 535 540

Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu
545 550 555 560

Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro
565 570 575

Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr
580 585 590

Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser
595 600 605

Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe
610 615 620

Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp
625 630 635 640

Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys
645 650 655

Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe
660 665 670

<210> 2
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 2

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Gly
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 103
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 3

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

65

70

75

80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100

<210> 4

<211> 445

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 4

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Gly
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Thr Ser
 50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

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

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340

345

350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 5

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr
 35 40 45

Gln Asp Lys Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
115 120 125

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

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
145 150 155 160

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
180 185 190

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

Thr Glu Cys Ser
210

<210> 6
<211> 1395
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 6
atgatgtcct ttgtctctct gctcctgggt ggcatactat tccatgccac ccaggcccag
60

gtcaccttga aggagtcttg tcctgtgctg gtgaaacca cagagaccct cacgctgacc
120

tgcaccgtct ctgggttctc actcagcagg ggtaaaatgg gtgtgagctg gatccgtcag
180

ccccagga aggccctgga gtggcttgca cacatTTTTT cgagtgcga aaaatcctac
240

aggacatgc tgaagagcag gtcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccagggtggtc
300

cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc acggatacga
360

cgtggaggaa ttgactactg gggccaggga accctgggtca ctgtctctc agcctccacc
420

aaggggccat cegtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc
480

gccttgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca
540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac
600

tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc
660

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt
720

ccccatgcc caccatgccc agcacctgag ttcttggggg gaccatcagt ctctctgttc
780

ccccaaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtgggtg
840

gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag
900

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtgggtc
960

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc
1020

tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc
1080

cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc
1140

agcctgacct gcttgggtcaa aggtcttctac cccagcgcaca tcgccgtgga gtgggagagc
1200

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc
1260

ttcttctctt acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc
1320

tcatgtctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg
1380

tctctcggga aatga
1395

<210> 7
<211> 696
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<220>
<221> misc_đặc tính
<222> (303)..(303)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 7
atgatgtcct ttgtctctct gctcctgggt ggcatactat tccatgccac ccaggcccag
60

ccagtgtgta ctacagcccc ctactgttcc gtgtccccag gacagacagc cagcatcacc
120

tgctctggag agaaattggg ggataaatat gcttactggg atcagcagaa gccaggccag
180

tcccctgtgt tggatcatgta tcaagataaa cagcggccct cagggatccc tgagcgattc
240

tctggctcca actctgggaa cacagccact ctgaccatca gcgggaccca ggctatggat
300

gangctgact attactgtca ggcgtgggac agcagcactg cggtatcggc cggagggacc
360

aagctgaccg tcctaggcca gcctaaggcg gcgccctcgg tcaccctgtt cccgccctcc
420

tctgaggagc ttcaagccaa caaggccaca ctggtgtgtc tcataagtga cttctaccgc
480

ggagccgtga cagtggcctg gaaggcagat agcagccccg tcaaggcggg agtggagacc
540

accacaccct ccaaacaaag caacaacaag tacgcggcca gcagctatct ggcctgacg
600

cctgagcagt ggaagtccca cagaagctac agctgccagg tcacgcatga agggagcacc
660

gtggagaaga cagtggcccc tacagaatgt tcatag
696