



(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)



1-0038787

(51)⁷ A61K 9/00

(13) B

(21) 1-2019-00819

(22) 10/09/2010

(62) 1-2015-00352

(86) PCT/EP2010/063271 10/09/2010

(87) WO2011/029892 17/03/2011

(30) 09170110.2 11/09/2009 EP

(45) 26/02/2024 431

(43) 25/04/2019 373A

(73) F. Hoffmann-La Roche AG (CH)

Grenzacherstrasse 124 CH-4070 Basel, Switzerland

(72) ADLER, Michael (DE); MAHLER, Hanns-Christian (DE); STAUCH, Oliver Boris (DE).

(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) DUỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG CD20 NỒNG ĐỘ CAO

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao, ổn định được dùng, như Rituximab, Ocrelizumab hoặc HuMab<CD20>, hoặc hỗn hợp của các phân tử kháng thể này để tiêm dưới da. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các dược phẩm, ngoài một lượng thích hợp của kháng thể kháng CD20, còn chứa một lượng hữu hiệu của ít nhất một enzym hyaluronidaza làm được phẩm kết hợp hoặc để dùng dưới dạng đồng dược phẩm. Các dược phẩm này còn chứa ít nhất một chất đệm, ví dụ chất đệm histidin, chất làm ổn định hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất làm ổn định (ví dụ, sacarit, như α,α -trehaloza dihydrat hoặc sucroza, và tùy ý metionin làm chất làm ổn định thứ hai), chất hoạt động bề mặt không ion và một lượng hữu hiệu của ít nhất một enzym hyaluronidaza. Các phương pháp bào chế dược phẩm này cũng được đề xuất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các dược phẩm ổn định, chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao được dụng hoặc hỗn hợp của các phân tử kháng thể này để tiêm dưới da. Các dược phẩm này, ngoài lượng lớn của kháng thể kháng CD20 hoặc hỗn hợp của chúng, còn chứa chất đệm, chất làm ổn định hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất làm ổn định, chất hoạt động bề mặt không ion và một lượng hữu hiệu của ít nhất một enzym hyaluronidaza. Sáng chế còn đề cập tới quy trình bào chế dược phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc sử dụng các kháng thể để làm thuốc ngày càng gia tăng trong nhiều năm qua. Trong nhiều trường hợp các kháng thể này được tiêm hoặc truyền qua đường tĩnh mạch (IV). Điều đáng tiếc là lượng kháng thể mà có thể được sử dụng qua đường tĩnh mạch bị hạn chế bởi các đặc tính hóa lý của kháng thể, đặc biệt bởi tính hòa tan và tính ổn định của nó trong dược phẩm dạng lỏng thích hợp và bởi thể tích của dung dịch truyền. Các đường dùng thuốc khác là tiêm dưới da hoặc trong cơ. Các đường dùng này cần đến nồng độ protein cao trong dung dịch cuối cùng để tiêm [Shire, S.J., Shahrokh, Z. et al., “Challenges in the development of high protein concentration formulations”, J. Pharm. Sci. 2004; 93(6): 1390-1402; Roskos, L.K., Davis C.G. et al., “The clinical pharmacology of therapeutic antibodies”, Drug Development Research 2004; 61(3): 108-120]. Để làm tăng thể tích, và nhờ đó liều chữa bệnh, mà có thể được sử dụng một cách an toàn và thuận tiện dưới da, đã có đề xuất sử dụng (các) enzym glycosaminoglycanaza nhằm làm tăng khe hở, mà dược phẩm chứa kháng thể có thể được tiêm vào đó (WO2006/091871).

Ví dụ về các dược phẩm ổn định chứa các kháng thể được dùng dùng để chữa bệnh hiện có bán trên thị trường là như sau:

RITUXAN®/MABTHERA® (Rituximab) là kháng thể khảm gắn kết với kháng nguyên CD20 trên tế bào B. Dược phẩm thương mại là sản phẩm cô dạng lỏng không chứa chất bảo quản, không màu, trong, tiệt trùng để dùng qua đường tĩnh mạch (IV). Rituximab được cung cấp với nồng độ 10mg/ml (10ml) trong các lọ dùng riêng biệt 100mg hoặc 500mg (50ml). Sản phẩm ở dạng bào chế trong 9 mg/ml natri clorua, 7,35mg/ml natri xitrat dehydrat, 0,7mg/ml polysorbate 80, và nước dùng để tiêm. Độ pH được điều chỉnh tới 6,5. Dược phẩm dạng lỏng khác của Rituximab thích hợp để dùng qua đường tĩnh mạch được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,991,790.

HERCEPTIN™ (Trastuzumab) là kháng thể đơn dòng kháng lại thụ thể HER2 (kháng HER2) hiện được bán ở châu Âu dưới dạng dược phẩm chứa 150mg bột đông khô nhanh (chứa kháng thể, α,α -trehaloza dihydrat, L-histidin và L-histidin hydroclorua và polysorbate 20) mà sẽ được hoàn nguyên để truyền với nước tiêm nhằm thu được liều lượng dùng để tiêm khoảng 21mg/ml. Ở Mỹ và nhiều nước khác lọ đa liều chứa 440mg Trastuzumab được bán trên thị trường.

AVASTIN™ (Bevacizumab) là kháng thể đơn dòng kháng lại thụ thể yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF) hiện được bán ở châu Âu dưới dạng dược phẩm lỏng trong hai loại lọ: a) 100 mg Bevacizumab trong 4ml và b) 400mg Bevacizumab trong 16ml, tạo ra nồng độ cuối cùng là 25mg/ml trong nước tiêm chứa các tá dược sau: trehaloza dihydrat, natri phosphat và polysorbate 20.

Trong khi các dược phẩm chứa kháng thể nêu trên được thấy là thích hợp để sử dụng qua đường tĩnh mạch thì vẫn có mong muốn tạo ra các dược phẩm ổn định, nồng độ cao chứa các kháng thể được dùng để tiêm dưới da. Lợi ích của

việc tiêm dưới da là cho phép thầy thuốc thực hiện trên bệnh nhân với sự can thiệp khá nhanh. Ngoài ra, bệnh nhân có thể được tập luyện để tự tiêm dưới da. Thông thường việc tiêm dưới da được giới hạn ở khoảng 2ml. Đối với các bệnh nhân cần nhiều liều, một vài dược phẩm liều đơn vị có thể được tiêm tại nhiều vị trí trên bề mặt cơ thể.

Hai sản phẩm chứa kháng thể sau để sử dụng dưới da hiện đang có bán trên thị trường.

HUMIRA™ (Adalimumab) là kháng thể đơn dòng kháng yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) hiện được bán ở châu Âu dưới dạng liều chứa 40mg trong thể tích thuốc tiêm 0,8ml để sử dụng dưới da (nồng độ: 50mg kháng thể/ml thể tích thuốc tiêm).

XOLAIR™ (Omalizumab) là kháng thể đơn dòng kháng globulin miễn dịch E (kháng IgE) hiện được bán trên thị trường dưới dạng liều chứa 150mg bột đông khô nhanh (chứa kháng thể, sucroza, histidin và histidin hydroclorua monohydrat và polysorbate 20) mà sẽ được hoàn nguyên với nước dùng để tiêm dưới da nhằm thu được liều thuốc tiêm là 125mg/ml.

Không có dược phẩm ổn định, chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao nào thích hợp để sử dụng dưới da hiện đang có bán trên thị trường. Vì vậy mong muốn tạo ra các dược phẩm ổn định, nồng độ cao chứa các kháng thể được dùng để tiêm dưới da.

Việc tiêm các dược chất ngoài đường tiêu hóa vào lớp dưới da thường bị giới hạn ở các dung tích nhỏ hơn 2ml do độ bền nhót đàn hồi với độ dẫn nước trong mô dưới da (SC) và do áp lực ngược sinh ra khi tiêm (Aukland K. and Reed R., “Interstitial-Lymphatic Mechanisms in the control of Extracellular Fluid Volume”, Physiology Reviews”, 1993; 73:1-78), cũng như do các cảm nhận đau.

Việc bào chế các dược phẩm chứa protein nồng độ cao là vấn đề thực sự thử thách và cần phải điều chỉnh từng dược phẩm theo các protein cụ thể được sử dụng do mỗi protein có đặc tính kết tụ khác nhau. Các thể kết tụ được cho là gây ra tính tạo miễn dịch của các protein chữa bệnh trong ít nhất một số trường hợp. Phản ứng gây miễn dịch chống lại các thể kết tụ protein hoặc kháng thể có thể dẫn đến làm trung hòa các kháng thể mà có thể khiến protein hoặc kháng thể chữa bệnh không có hiệu quả. Dường như là tính gây miễn dịch của thể kết tụ protein là rất khó giải quyết khi tiêm dưới da, do đó việc sử dụng lặp lại làm tăng nguy cơ đáp ứng miễn dịch.

Trong khi các kháng thể có cấu trúc chung rất giống nhau thì các kháng thể này lại khác nhau trong dược phẩm axit amin (cụ thể là trong các vùng CDR chịu trách nhiệm về sự gắn kết với kháng nguyên) và dạng glycosyl hóa. Ngoài ra, có thể còn có các sửa đổi sau phiên mã như các thể biến dị tích điện và glycosyl hóa.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất dược phẩm ổn định, nồng độ cao chứa kháng thể kháng CD20 được dụng hoặc hỗn hợp của các phân tử kháng thể này, tốt hơn là để tiêm dưới da.

Cụ thể hơn, dược phẩm ổn định, nồng độ cao của chế phẩm kháng thể kháng CD20 được dụng theo sáng chế chứa:

- khoảng từ 20 đến 350 mg/ml kháng thể kháng CD20;
- khoảng từ 1 đến 100 mM chất đệm tạo ra độ pH = $5,5 \pm 2,0$;
- khoảng từ 1 đến 500 mM chất làm ổn định hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất làm ổn định, trong đó metionin tùy ý được sử dụng làm chất làm ổn định thứ hai, tốt hơn là với nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 25mM;

- 0,01 đến 0,1% chất hoạt động bề mặt không ion; và
- tốt hơn là một lượng hữu hiệu của ít nhất một enzym hyaluronidaza.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ "kháng thể" được sử dụng ở đây theo nghĩa rộng nhất và đặc biệt chứa các kháng thể có chiều dài đầy đủ, các kháng thể được tạo ra bằng cách di truyền như các kháng thể đơn dòng, các kháng thể tái tổ hợp, các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép) được tạo ra từ ít nhất hai kháng thể có chiều dài đầy đủ, kháng thể khảm, kháng thể được làm giống như kháng thể của người, các kháng thể hoàn toàn của người và cũng như các mảnhkháng thể này với điều kiện chúng có hoạt tính sinh học mong muốn.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng ở đây chỉ kháng thể thu được từ quần thể các kháng thể hầu như đồng nhất, tức là các kháng thể riêng biệt chứa quần thể đồng nhất và/hoặc gắn kết với cùng epitop, trừ các thể biến dị có thể mà có thể xuất hiện trong quá trình tạo ra kháng thể đơn dòng, các thể biến dị này thường có mặt với các lượng rất nhỏ. Ngược lại với các dược phẩm chứa kháng thể đa dòng mà thường chứa các kháng thể khác nhau kháng các yếu tố di truyền khác nhau (các epitop), mỗi kháng thể đơn dòng kháng một yếu tố di truyền trên kháng nguyên. Ngoài tính đặc hiệu của chúng, các kháng thể đơn dòng có lợi vì chúng không bị nhiễm các globulin miễn dịch khác. Gen sửa đổi "đơn dòng" biểu thị đặc tính của kháng thể khi thu được từ quần thể kháng thể hầu như đồng nhất, và không được hiểu là cần tạo ra kháng thể theo một phương pháp bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng dùng theo sáng chế có thể được tạo ra trước tiên bằng phương pháp lai được mô tả bởi Köhler et al, Nature, 256:495 (1975), hoặc có thể được tạo ra bằng các phương pháp tái tổ hợp ADN (xem, ví dụ, U.S Patent No. 4,816,567). "Các kháng thể đơn dòng"

còn có thể được phân lập từ các thư viện kháng thể thực khuẩn thể bằng các kỹ thuật được mô tả trong Clarkson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) và Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991). Các thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "được phẩm chứa kháng thể đơn dòng" như được sử dụng ở đây chỉ được phẩm chứa các phân tử kháng thể của chế phẩm axit amin đơn. Vì vậy, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng của người" được dùng để chỉ các kháng thể thể hiện tính đặc hiệu gắn kết đơn mà có các vùng biến đổi và ổn định có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch dòng phôi của người. Theo một phương án, các kháng thể đơn dòng của người được tạo ra bằng khối tế bào lai kể cả tế bào B thu được từ động vật chuyển gen không phải người, ví dụ, chuột chuyển gen, có hệ gen chứa gen chuyển chuỗi nặng của người và gen chuyển chuỗi nhẹ của người dung hợp với tế bào bất tử. Thuật ngữ "các kháng thể đơn dòng" ở đây đặc biệt chứa các kháng thể khảm trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là đồng nhất với hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ các loài đặc biệt hoặc thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể đặc biệt, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi là đồng nhất với hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ các loài khác thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể khác, cũng như các mảnh kháng thể này, với điều kiện chúng có hoạt tính sinh học mong muốn (U.S. Patent No. 4,816,567; và Morrison et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Các kháng thể khảm được quan tâm ở đây chứa các kháng thể "được làm giống như kháng thể của động vật linh trưởng" chứa các trình tự gắn kết kháng nguyên của miền biến đổi thu được từ động vật linh trưởng không phải người (ví dụ Old World Monkey, Ape...) và các trình tự vùng ổn định của người.

"Các mảnh kháng thể" chứa một phần của kháng thể có chiều dài đầy đủ, thường ít nhất là phần gắn kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của chúng. Ví dụ về các mảnh kháng thể chứa các đoạn Fab, Fab', F(ab')₂, và các mảnh Fv; các thể dia-; các phân tử kháng thể chuỗi đơn; các độc tố miễn dịch, và các kháng

thể đa đặc hiệu được tạo ra từ (các) mảnh kháng thể. Ngoài ra, các mảnh kháng thể chứa các polypeptit chuỗi đơn có các đặc tính của chuỗi VH, đó có thể là tập hợp cùng với chuỗi VL gắn kết với kháng nguyên CD20. "Các mảnh kháng thể" còn chứa các mảnh mà chính nó không thể tạo ra các chức năng tác động (ADCC/CDC) nhưng tạo ra chức năng này theo cách theo sáng chế sau khi được kết hợp với (các) miền ổn định cả kháng thể thích hợp.

"Kháng thể có chiều dài đầy đủ" là một kháng thể chứa vùng biến đổi gắn kết với kháng nguyên cũng như miền ổn định chuỗi nhẹ (CL) và các miền ổn định chuỗi nặng, CH1, CH2 và CH3. Các miền ổn định có thể là các miền ổn định trình tự nguyên thể (ví dụ, các miền ổn định trình tự nguyên thể của người) hoặc các thể biến dị trình tự axit amin của chúng. Cụ thể là, kháng thể có chiều dài đầy đủ có một hoặc nhiều chức năng tác động.

Kháng thể "thể biến dị của trình tự axit amin" ở đây là kháng thể với trình tự axit amin khác với kháng thể dạng chính. Nói chung, các thể biến dị của trình tự axit amin sẽ có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 70% với kháng thể dạng chính, và tốt hơn là chúng có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 80%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 90% với kháng thể dạng chính. Các thể biến dị của trình tự axit amin có các sự thay thế, khuyết đoạn, và/hoặc xen đoạn tính một số vị trí bên trong hoặc gần kề với trình tự axit amin của kháng thể dạng chính. Ví dụ về các thể biến dị của trình tự axit amin ở đây chứa thể biến dị axit (ví dụ, thể biến dị khử amit hóa), thể biến dị bazơ, kháng thể với phần kéo dài chuỗi chính đầu tận cùng amino (ví dụ, VHS-) trên một hoặc hai chuỗi nhẹ của chúng, kháng thể với gốc lysin đầu tận cùng C trên một hoặc hai chuỗi nặng của chúng, v.v. và chứa tổ hợp của các biến đổi đối với các trình tự axit amin của các chuỗi nặng và/hoặc các chuỗi nhẹ. Thể biến dị kháng thể được đặc biệt quan tâm ở đây là kháng thể chứa phần mở rộng chính đầu tận cùng amino trên một hoặc hai chuỗi

nhẹ của chúng, tùy ý còn chứa trình tự axit amin khác và/hoặc các khác biệt glycosyl hóa so với kháng thể dạng chính.

Kháng thể "thể biến dị glycosyl hóa" ở đây là kháng thể với một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon gắn với chúng mà khác với một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon gắn với kháng thể dạng chính. Ví dụ về các thể biến dị glycosyl hóa ở đây chứa kháng thể với cấu trúc oligosacarit G1 hoặc G2, thay cho cấu trúc oligosacarit G0, gắn với vùng Fc của nó, kháng thể với một hoặc hai gốc hydrat cacbon gắn với một hoặc hai chuỗi nhẹ của chúng, kháng thể không có hydrat cacbon gắn với một hoặc hai chuỗi nặng của kháng thể, v.v., và các tổ hợp của các biến đổi glycosyl hóa. Ngoài ra, thuật ngữ "thể biến dị glycosyl hóa" chứa các kháng thể được tạo ra bằng cách di truyền bằng glycogen như được mô tả trong công bố đơn quốc tế WO 1331266 và US 7,517,670.

"Các chức năng tác động" của kháng thể được dùng để chỉ các hoạt tính sinh học được cho là do vùng Fc (vùng trình tự Fc nguyên thể hoặc vùng trình tự axit amin Fc biến thể) của kháng thể tạo ra. Ví dụ về các chức năng tác động của kháng thể chứa gắn kết C1q; độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC); gắn kết thụ thể Fc; độc tính tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể tạo ra (ADCC); sự thực bào; quá trình điều hòa giảm của các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B; BCR), v.v..

Tùy thuộc vào trình tự axit amin thuộc vùng ổn định của các chuỗi nặng của chúng, các kháng thể có chiều dài đầy đủ được chia thành "các loại" khác nhau. Có năm loại chính của các kháng thể có chiều dài đầy đủ IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, và một vài loại trong số đó có thể còn được chia thành các phân lớp (các isotyp), ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, IgA và IgA2. Các miền ổn định chuỗi nặng tương ứng với các loại khác nhau của các kháng thể lần lượt được gọi là α [alpha], δ [delta], ϵ [epsilon], γ [gamma], và μ [mu]. Các cấu trúc dưới

đơn vị và các cấu hình ba chiều của các loại khác nhau của các globulin miễn dịch là đã biết rõ.

Ở đây, "hoạt tính sinh học" của kháng thể đơn dòng được dùng để chỉ khả năng của kháng thể gắn kết với kháng nguyên và tạo ra đáp ứng sinh học có thể đo được mà có thể được xác định in vitro hoặc in vivo. Hoạt tính này có thể là đối kháng (ví dụ, trong đó kháng thể là kháng thể CD20) hoặc chủ vận.

Thuật ngữ "kháng thể được làm giống như kháng thể của người" được dùng để chỉ các kháng thể, trong đó vùng khung hoặc "các vùng xác định bổ trợ" (CDR) được cải biến để chứa CDR của globulin miễn dịch có tính đặc hiệu khác so với tính đặc hiệu của globulin miễn dịch gốc. Theo một phương án được ưu tiên, CDR của chuột được ghép vào vùng khung của kháng thể của người để tạo ra "kháng thể được nhân tính hóa." Các CDR được đặc biệt ưu tiên tương ứng với các CDR thể hiện các trình tự nhận dạng các kháng nguyên nêu dưới đây đối với các kháng thể khảm và chức năng kép. Phần lớn, các kháng thể được làm nhân tính hóa là các globulin miễn dịch người (kháng thể nhận) trong đó các gốc từ vùng siêu biến của thể nhận được thay thế bằng các gốc từ vùng siêu biến của loài không phải người ((kháng thể cho) như chuột nhắt, chuột, thỏ hoặc động vật linh trưởng không phải người có tính đặc hiệu, ái lực, và khả năng mong muốn. Trong một số trường hợp, các gốc vùng khung (FR) của globulin miễn dịch của người được thay thế bằng các gốc không phải của người tương ứng. Hơn thế, các kháng thể được nhân tính hóa có thể chứa các gốc mà không được thấy ở kháng thể nhận hoặc ở kháng thể cho. Các cải biến đó được tạo ra để sàng lọc hơn nữa tính năng của kháng thể. Nói chung, kháng thể được nhân tính hóa hầu như sẽ chứa toàn bộ ít nhất một, và thường là hai miền biến đổi, trong đó toàn bộ hoặc hầu như là toàn bộ các vòng siêu biến tương ứng với các vòng siêu biến của globulin miễn dịch không phải của người và toàn bộ hoặc hầu như là toàn bộ các FR là các FR của trình tự globulin miễn dịch của người.

Kháng thể được nhân tính hóa tùy ý cũng sẽ chứa ít nhất một phần của vùng ổn định globulin miễn dịch (Fc), thường là của globulin miễn dịch của người. (xem, ví dụ, các bài báo Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; và Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270).

Thuật ngữ "kháng thể khảm" được dùng để chỉ kháng thể đơn dòng chứa vùng biến đổi, tức là vùng gắn kết, từ nguồn hoặc loài và ít nhất một phần của vùng ổn định thu được từ một nguồn hoặc loài khác nhau, thường được tạo ra bằng các kỹ thuật tái tổ hợp ADN. Các kháng thể khảm chứa vùng biến đổi của chuột và vùng ổn định của người là được đặc biệt ưu tiên. Các kháng thể khảm của chuột/người này là sản phẩm của các gen globulin miễn dịch biểu hiện chứa các đoạn ADN mã hóa các vùng biến đổi globulin miễn dịch của chuột và các đoạn ADN mã hóa các vùng ổn định globulin miễn dịch của người. Các dạng khác của "các kháng thể khảm" nằm trong phạm vi sáng chế là các dạng trong đó lớp hoặc phân lớp được cải biến hoặc thay đổi từ lớp hoặc phân lớp của kháng thể gốc. Các kháng thể "khảm" này cũng được gọi là "các kháng thể chuyển loại". Các phương pháp tạo ra các kháng thể khảm bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp ADN và chuyển nhiễm gen thông thường hiện đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem ví dụ, bài báo Morrison, S.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238 và US 5,204,244).

Thuật ngữ "kháng thể người", như được sử dụng ở đây, dự tính chứa các kháng thể có các vùng biến đổi và ổn định thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng phôi của người. Các kháng thể của người là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374). Dựa vào kỹ thuật này, các kháng thể của người chống lại rất nhiều đích khác nhau có thể được tạo ra. Ví dụ về các kháng thể của người được mô tả trong bài báo Kellermann, S. A., et al., *Curr Opin Biotechnol.* 13 (2002) 593-597 chẳng hạn.

Thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp của người", như được sử dụng ở đây, sẽ bao gồm tất cả các kháng thể của người được chuẩn bị, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng cách tái tổ hợp, như các kháng thể phân lập được từ tế bào chủ như tế bào NS0 hoặc CHO hoặc từ động vật (ví dụ, chuột nhắt) được chuyển gen cho các gen globulin miễn dịch của người hoặc các kháng thể biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào tế bào chủ. Các kháng thể tái tổ hợp của người này có các vùng biến đổi và ổn định thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng phôi của người dưới dạng sắp xếp lại. Các kháng thể tái tổ hợp của người theo sáng chế được đưa vào quá trình siêu đột biến soma in vivo. Vì vậy, các trình tự axit amin của các vùng VH và VL của các kháng thể tái tổ hợp là trình tự mà, trong khi thu được từ và liên quan đến các trình tự dòng phôi của người VH và VL, có thể không tồn tại trong tự nhiên trong kho vốn dòng phôi kháng thể của người in vivo.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" hoặc "gắn kết một cách đặc hiệu với" chỉ sự gắn kết của kháng thể với epitop của kháng nguyên CD20. Tốt hơn là, ái lực gắn kết là trị số K_d bằng 10^{-10} mol/l hoặc thấp hơn (ví dụ 10^{-12} mol/l). Ái lực gắn kết được xác định bằng thử nghiệm gắn kết chuẩn, như kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (BIAcore®).

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic", như được sử dụng ở đây, chỉ các phân tử ADN và các phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể là ADN sợi đơn hoặc sợi kép, nhưng tốt hơn là ADN sợi kép.

Thuật ngữ "các miền ổn định" không trực tiếp tham gia vào gắn kết của kháng thể với kháng nguyên nhưng liên quan đến các chức năng tác động (ADCC, gắn kết bổ trợ, và CDC).

Thuật ngữ "vùng biến đổi" (vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL), vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH)) như được sử dụng ở đây chỉ từng cặp chuỗi nặng và

nhẹ trực tiếp tham gia vào sự gắn kết của kháng thể với kháng nguyên. Các miền của các chuỗi nặng và nhẹ biến đổi của người có cấu trúc chung tương tự và mỗi miền chứa bốn vùng khung (FR) có các trình tự được bảo toàn rộng rãi, liên kết bởi ba “vùng siêu biến” (hoặc các vùng xác định tính bổ trợ, các CDR). Các vùng khung chấp nhận cấu hình tấm β và các CDR có thể tạo ra các vòng nối với cấu trúc tấm β . Các CDR trong mỗi chuỗi được giữ trong cấu trúc ba chiều của chúng bằng các vùng khung và cùng với các CDR của chuỗi khác tạo ra điểm gắn kết kháng nguyên. Các vùng chuỗi nặng và nhẹ CDR3 của kháng thể đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong tính đặc hiệu/ái lực gắn kết của các kháng thể theo sáng chế và vì vậy tạo ra mục đích khác nữa của sáng chế.

Các thuật ngữ "vùng siêu biến" hoặc "phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể" khi được sử dụng ở đây chỉ các gốc axit amin của kháng thể mà chịu trách nhiệm về sự tạo ra với gắn kết kháng nguyên. Vùng siêu biến chứa các gốc axit amin từ "các vùng xác định tính bổ trợ" hoặc "các CDR". Các vùng "khung" hoặc "FR" là các vùng miền biến đổi khác với các gốc của vùng siêu biến như được xác định ở đây. Vì vậy, các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể chứa các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4 có các đầu tận cùng N đến C. Cụ thể, CDR3 của chuỗi nặng là vùng góp phần nhiều nhất vào sự gắn kết với kháng nguyên. Các vùng CDR và FR được xác định theo cách xác định chuẩn của Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) và/hoặc các gốc từ “vùng siêu biến”.

Các thuật ngữ "CD20" và "kháng nguyên CD20" được sử dụng có thể thay thế cho nhau ở đây, và chứa các thể biến dị, các dạng đồng chức năng và các thể tương đồng loài của CD20 người được biểu hiện trong tự nhiên bằng các tế bào hoặc các biểu hiện trên các tế bào chuyển nhiễm với gen CD20. Sự gắn kết của kháng thể theo sáng chế với kháng nguyên CD20 gây chết các tế bào

biểu hiện CD20 (ví dụ, tế bào u) bằng cách làm bất hoạt CD20. Sự giết các tế bào biểu hiện CD20 có thể xuất hiện theo một hoặc nhiều cơ chế sau: độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), gây ra sự chết tế bào và/hoặc chết tế bào theo chương trình, tập hợp đồng kiểu, v.v..

Các từ đồng nghĩa của CD20, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, chứa kháng nguyên của tế bào lympho B, kháng nguyên bề mặt của tế bào lympho B B1, Leu-16 và Bp35.

Thuật ngữ “kháng thể kháng CD20” theo sáng chế là kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên CD20. Tùy thuộc vào các đặc tính gắn kết và các hoạt tính sinh học của các kháng thể kháng CD20 với kháng nguyên CD20, hai loại kháng thể kháng CD20 (các kháng thể kháng CD20 typ I và typ II) có thể được phân biệt theo Cragg, M.S., et al, Blood 103 (2004) 2738-2743; và Cragg, M.S., et al Blood 101 (2003) 1045-1051, xem Bảng 1.

Bảng 1: Các đặc tính của các kháng thể kháng CD20 Typ I và Typ II

Các kháng thể kháng CD20 Typ I	Các kháng thể kháng CD20 Typ II
Epitop CD20 typ I	Epitop CD20 typ II
Định vị CD20 với các khối lipid	Không định vị CD20 với các khối lipid
CDC tăng (nếu là isotyp IgG1)	CDC giảm (nếu là isotyp IgG1)
Hoạt tính ADCC (nếu là isotyp IgG1)	Hoạt tính ADCC (nếu là isotyp IgG1)
Khả năng gắn kết hoàn toàn	Khả năng gắn kết giảm
Tập hợp đồng kiểu	Tập hợp đồng kiểu mạnh hơn

Gây ra sự chết tế bào theo chương trình khi liên kết chéo	Gây ra sự chết tế bào mạnh khi không có liên kết chéo
---	---

Một đặc tính cơ bản của kháng thể kháng CD20 Typ I và Typ II là kiểu gắn kết của chúng. Vì vậy, kháng thể kháng CD20 Typ I và Typ II có thể được phân loại bằng tỷ lệ khả năng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86) của kháng thể kháng CD20 so với rituximab.

Như được sử dụng ở đây, “kháng thể kháng CD20” có thể hoặc là kháng thể Typ I hoặc Typ II. Tốt hơn, nếu nó là kháng thể Typ I, được ưu tiên nhất là rituximab.

Các kháng thể kháng CD20 Typ I có tỷ lệ khả năng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC No. CCL-86) của kháng thể kháng CD20 này so với rituximab nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,2, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,1. Ví dụ về các kháng thể kháng CD20 Typ I chứa Rituximab chẳng hạn, trong EP2000149B1 (Anderson et al., xem các hình 4 và 5 chẳng hạn), 1F5 IgG2a (ECACC, khối tế bào lai; Press et al., Blood 69/2:584-591 (1987)), HI47 IgG3 (ECACC, khối tế bào lai), 2C6 IgG1 (như được nêu trong WO2005/103081), 2F2 IgG1 hoặc ofatumumab (như được nêu trong WO 2004/035607 và WO2005/103081) và 2H7 IgG1 (như được nêu trong WO 2004/056312) và WO 2006/084264 (ví dụ các thể biến dị đề cập trong các bảng 1 và 2). Tốt hơn, nếu kháng thể kháng CD20 Typ I này là kháng thể đơn dòng mà gắn kết với cùng một epitop như rituximab.

Các kháng thể kháng CD20 Typ II có tỷ lệ khả năng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC No. CCL-86) của kháng thể kháng CD20 này so với rituximab nằm trong khoảng từ 0,3 đến 0,6, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,35 đến 0,55, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,4 đến 0,5. Ví dụ về các kháng thể kháng CD20 Typ II này chứa tositumomab chẳng hạn (B1 IgG2a), kháng thể

B-Ly1 được nhân tính hóa IgG1 (kháng thể được nhân tính hóa thể khảm IgG1 như được nêu trong WO2005/044859), 11B8 IgG1 (như được nêu trong WO 2004/035607), và AT80 IgG1. Tốt hơn, nếu kháng thể kháng CD20 Typ II này là kháng thể đơn dòng mà gắn kết với cùng một epitop như kháng thể được nhân tính hóa B-Ly1 (như được nêu trong WO2005/044859).

“Tỷ lệ khả năng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86) của các kháng thể kháng CD20 so với rituximab” được xác định theo phương pháp đo huỳnh quang miễn dịch trực tiếp (cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) được đo) bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD20 đã nêu tiếp hợp với Cy5 và rituximab tiếp hợp với Cy5 trong FACSArray (Becton Dickinson) với các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86), và được tính như sau:

Tỷ lệ khả năng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86) =

$$\frac{\text{MFI}(\text{Cy5-kháng thể kháng CD20})}{\text{MFI}(\text{Cy5-rituximab})} \times \frac{\text{Cy5-tỷ lệ đánh dấu}(\text{Cy5-rituximab})}{\text{Cy5-tỷ lệ đánh dấu}(\text{Cy5-kháng thể kháng CD20})}$$

MFI là cường độ huỳnh quang trung bình. “Cy5-tỷ lệ đánh dấu” như được sử dụng ở đây có nghĩa là số lượng phân tử đánh dấu Cy5 trên một phân tử kháng thể.

Thông thường, kháng thể kháng CD20 Typ I này có tỷ lệ khả năng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86) của kháng thể kháng CD20 thứ nhất đã nêu so với rituximab nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,2, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,1.

Thông thường, kháng thể kháng CD20 Typ II này có tỷ lệ khả năng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86) của kháng thể kháng CD20 thứ hai đã nêu so với rituximab nằm trong khoảng từ 0,3 đến 0,6, tốt hơn

là nằm trong khoảng từ 0,35 đến 0,55, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,4 đến 0,5.

Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể kháng CD20 Typ II này, tốt hơn là kháng thể được nhân tính hóa B-Ly1, có độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC).

Thuật ngữ “kháng thể có độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC)” có nghĩa là kháng thể, khi thuật ngữ này được xác định ở đây, có ADCC tăng như được xác định bằng phương pháp thích hợp bất kỳ mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Phương pháp được chấp nhận thử nghiệm ADCC in vitro như sau:

1) thử nghiệm sử dụng các tế bào đích được biết để biểu hiện kháng nguyên đích được nhận dạng bởi vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể;

2) thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (PBMCs), phân lập được từ máu của người cho máu khỏe mạnh được chọn ngẫu nhiên, làm tế bào tác động;

3) thử nghiệm được tiến hành theo phương pháp sau:

i) các PBMC được phân lập bằng cách sử dụng các quy trình ly tâm tỷ trọng chuẩn và được tạo huyền phù với 5×10^6 tế bào/ml trong môi trường nuôi cấy tế bào RPMI;

ii) các tế bào đích được nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy mô chuẩn, thu hoạch từ pha sinh trưởng theo hàm số mũ với khả năng sống được cao hơn 90%, rửa bằng môi trường nuôi cấy tế bào RPMI, đánh dấu bằng 100 micro-Curi ^{51}Cr , rửa hai lần bằng môi trường nuôi cấy tế bào, và tạo huyền phù lại trong môi trường nuôi cấy tế bào với mật độ 10^5 tế bào/ml;

iii) 100 microlit huyền phù tế bào đích cuối cùng nêu trên được chuyển vào mỗi giếng của đĩa vi chuẩn 96 giếng;

iv) kháng thể được pha loãng theo bậc từ 4000ng/ml đến 0,04ng/ml trong môi trường nuôi cấy tế bào và 50 microlit dung dịch kháng thể thu được này được thêm vào các tế bào đích trong đĩa vi chuẩn 96 giếng, thử nghiệm bằng ba nồng độ kháng thể khác nhau bao hàm toàn bộ giới hạn nồng độ ở trên;

v) đối với các mẫu đối chứng giải phóng tối đa (MR), 3 giếng khác trong đĩa chứa các tế bào đích đã được đánh dấu, nhận 50 microlit dung dịch nước (VN) 2% (thể tích/thể tích) chứa chất tẩy rửa không ion (Nonidet, Sigma, St. Louis), thay cho dung dịch kháng thể (mục iv ở trên);

vi) đối với các mẫu đối chứng giải phóng tự phát (SR), 3 giếng khác trong đĩa chứa các tế bào đích đã được đánh dấu, nhận 50 microlit môi trường nuôi cấy tế bào RPMI thay cho dung dịch kháng thể (mục iv ở trên);

vii) sau đó đĩa vi chuẩn 96 giếng được ly tâm mức làm sạch 50 x g trong 1 phút và ủ trong 1 giờ ở 4°C;

viii) 50 microlit huyền phù PBMC (mục i ở trên) được thêm vào mỗi giếng để thu được tỷ lệ tế bào tác động: đích là 25:1 và các đĩa này được đặt vào trong lồng ấp chứa khí 5% CO₂ ở 37°C trong 4 giờ;

ix) dịch nổi không chứa tế bào từ mỗi giếng được thu hoạch và độ phóng xạ giải phóng qua thử nghiệm (ER) được định lượng bằng cách sử dụng ống đếm gamma;

x) tỷ lệ phần trăm của mức, mức phân giải đặc hiệu được tính đối với từng nồng độ kháng thể theo công thức $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, trong đó ER là mức độ phóng xạ trung bình đã được định lượng (xem mục ix ở trên) đối với nồng độ kháng thể đó, MR là độ phóng xạ trung bình đã được định lượng (xem

mục ix ở trên) cho các đối chứng MR (xem mục v ở trên), và SR là mức độ phóng xạ trung bình đã được định lượng (xem mục ix ở trên) đối với các đối chứng SR (xem mục vi ở trên);

4) "*ADCC tăng*" được xác định là hoặc tăng tỷ lệ phần trăm tối đa của mức, mức phân giải đặc hiệu quan sát được trong giới hạn nồng độ kháng thể được thử nghiệm ở trên, và/hoặc giảm nồng độ của kháng thể cần thiết để đạt được một nửa tỷ lệ phần trăm tối đa của phân giải đặc hiệu quan sát được trong giới hạn nồng độ kháng thể được thử nghiệm ở trên. Mức gia tăng ADCC tỷ lệ với ADCC, xác định được bằng thử nghiệm ở trên, được tạo ra bởi cùng một kháng thể, được tạo ra bởi cùng một loại tế bào chủ, bằng cách sử dụng cùng một phương pháp tạo ra, làm sạch, bào chế và bảo quản chuẩn, các phương pháp đó là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, nhưng nó không được tạo ra bằng các tế bào chủ đã được tạo ra bằng cách di truyền để biểu hiện quá mức GnTIII.

"ADCC tăng" này có thể có được bằng kỹ thuật gắn phân tử đường vào các kháng thể đã nêu, có nghĩa là tăng các chức năng tác động tự nhiên, do tế bào tạo ra của các kháng thể đơn dòng bằng kỹ thuật gắn thành phần oligosacarit của chúng như được mô tả trong bài báo Umana, P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999) và U.S. Pat. No. 6,602,684.

Thuật ngữ "độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC)" được dùng để chỉ sự phân giải các tế bào đích của u người bằng kháng thể theo sáng chế với sự có mặt của bổ thể. Tốt hơn là, CDC được xác định bằng cách xử lý được phẩm chứa các tế bào biểu hiện CD20 bằng kháng thể kháng CD20 theo sáng chế với sự có mặt của bổ thể. CDC được tìm thấy nếu kháng thể gây ra, ở nồng độ 100nM sự phân giải (chết tế bào) bằng 20% hoặc nhiều hơn các tế bào u sau 4 giờ. Tốt hơn là, thử nghiệm này được tiến hành với các tế bào đánh dấu ^{51}Cr

hoặc Eu và đo ^{51}Cr hoặc Eu giải phóng. Các đối chứng bao gồm các tế bào đích của u được ủ với bổ thể mà không có kháng thể.

Thông thường, các kháng thể kháng CD20 Typ I và Typ II thuộc isotyp IgG1 thể hiện các tính chất CDC đặc trưng. Các kháng thể kháng CD20 Typ I có CDC tăng (nếu là isotyp IgG1) và các kháng thể kháng CD20 Typ II có CDC giảm (nếu là isotyp IgG1) so với nhau. Tốt hơn, nếu cả kháng thể kháng CD20 Typ I và Typ II là các kháng thể isotyp IgG1.

Kháng thể “rituximab” là kháng thể khảm đơn dòng gama 1 của người chứa miền ổn định chứa chuột được tạo ra bằng cách di truyền nhằm chống lại kháng nguyên CD20 người. Kháng thể khảm này chứa các miền ổn định gama 1 của người và được nhận biết bằng tên “C2B8” trong EP2000149B1 (Anderson et al., xem các hình vẽ 4 và 5 chẳng hạn). Rituximab được phê chuẩn để điều trị bệnh cho bệnh nhân có u bạch huyết không phải thể Hodgkin tế bào B, dương tính CD20, có nang hoặc dai dẳng khó chữa hoặc tái phát. Cơ chế của các thử nghiệm tác dụng in vitro chứng tỏ rằng rituximab có độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể của người (CDC) (Reff et al, Blood 83(2): 435-445 (1994)). Ngoài ra, nó thể hiện hoạt tính đáng kể trong các thử nghiệm xác định độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

Thuật ngữ “kháng thể B-Ly1 được làm giống như kháng thể của người” được dùng để chỉ kháng thể B-Ly1 được làm giống như kháng thể của người như được bộc lộ trong WO2005/044859, kháng thể này thu được từ kháng thể B-Ly1 kháng CD20 đơn dòng của chuột (vùng biến đổi của chuỗi nặng của chuột (VH): SEQ ID NO: 1; vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của chuột (VL): SEQ ID NO: 2; xem bài báo Poppema, S. and Visser, L., Biotest Bulletin 3: 131-139 (1987)) bằng cách khảm hóa bằng miền ổn định của người từ IgG1 và sau đó làm giống như kháng thể của người (xem WO2005/044859). “Các kháng thể B-Ly1 này được mô tả một cách chi tiết trong WO2005/ 044859.

Tốt hơn là, “kháng thể B-Ly1 được làm giống như kháng thể của người” có vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No: 3 đến SEQ ID No: 20 (B-HH2 đến B-HH9 và B-HL8 đến B-HL17 trong WO2005/044859). Cụ thể được ưu tiên nhất là các trình tự nêu trong Seq. ID No: 3, 4, 7, 9, 11, 13 và 15 (B-HH2, BHH-3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 và B-HL13 trong WO2005/044859). Tốt hơn, nếu VH này là BHH6. Tốt hơn là, “kháng thể B-Ly1 được làm giống như kháng thể của người” có vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) là trình tự nêu trong gồm có SEQ ID No: 20 (B-KV1) trong WO2005/044859. Hơn thế nữa, tốt hơn nếu kháng thể B-Ly1 được nhân tính hóa là kháng thể IgG1. Tốt hơn là, các kháng thể B-Ly1 được làm giống như kháng thể của người được gắn phân tử đường (GE) trong vùng Fc theo các quy trình được mô tả trong WO2005/044859, WO 2004/065540, Umana, P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999) và WO 99/154342. Hầu hết các kháng thể B-Ly1 được nhân tính hóa đã được gắn phân tử đường có dạng glycosyl hóa biến đổi trong vùng Fc, tốt hơn là có số lượng các gốc fucoza giảm. Tốt hơn là, ít nhất 40% hoặc nhiều hơn (theo một phương án khoảng 40% và 60%, theo một phương án khác ít nhất là 50%, và theo một phương án khác nữa ít nhất là 70% hoặc nhiều hơn) các oligosacarit của vùng Fc không được fucosyl hóa. Hơn thế nữa, tốt hơn nếu các oligosacarit của vùng Fc được chia đôi. Tốt nhất là, “kháng thể B-Ly1 được làm giống như kháng thể của người” chứa VH B-HH6 và VL B-KV1 trong WO2005/044859. Như được sử dụng ở đây, kháng thể này còn được gọi là “HuMab<CD20>”. Kháng thể này được ký hiệu là Afutuzumab INN. Theo một phương án thích hợp nhất khác, kháng thể này có số lượng các gốc fucoza giảm như được xác định trên đây và/hoặc tốt nhất là các oligosacarit của vùng Fc được chia đôi. Theo một phương án thích hợp nhất khác nữa, kháng thể này thể hiện ADCC tăng như được xác định ở đây.

Thành phần oligosacarit có thể ảnh hưởng đáng kể đến các tính chất liên quan đến hiệu quả của glycoprotein chữa bệnh, chứa tính ổn định vật lý, khả

năng chống lại sự tấn công của proteaza, các tương tác với hệ miễn dịch, các được động lực, và hoạt tính sinh học đặc hiệu. Các tính chất này có thể phụ thuộc không chỉ vào sự có mặt hoặc không có mặt, mà còn phụ thuộc vào các cấu trúc đặc hiệu của các oligosacarit. Một số khái quát hóa giữa cấu trúc oligosacarit và chức năng của glycoprotein có thể được thực hiện. Ví dụ, các cấu trúc oligosacarit nhất định làm trung gian thanh thải nhanh glycoprotein ra khỏi dòng máu nhờ các tương tác với các protein gắn kết hydrat cacbon đặc hiệu, trong khi các loại khác có thể được gắn kết bởi các kháng thể và kích thích các phản ứng miễn dịch không mong muốn (Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:975-81, 1996).

Các tế bào của động vật có vú là các vật chủ được ưu tiên để tạo ra các glycoprotein chữa bệnh nhờ khả năng của chúng có thể glycosyl hóa các protein ở dạng tương hợp nhất đối với ứng dụng ở người (Cumming *et al.*, *Glycobiology* 1:115-30, 1991; Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:975-981, 1996). Vi khuẩn rất ít khi glycosyl hóa các protein và, tương tự các loại vật chủ thông thường khác, như nấm men, nấm dạng sợi, các tế bào côn trùng và thực vật, tạo ra các dạng glycosyl hóa liên quan đến sự thanh thải nhanh ra khỏi dòng máu, các tương tác miễn dịch không muốn, và trong một số trường hợp đặc biệt, hoạt tính sinh học giảm. Trong số các tế bào của động vật có vú, các tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc (CHO) thường được sử dụng nhất trong hai thập kỷ qua. Ngoài việc, tạo ra các dạng glycosyl hóa thích hợp, các tế bào đó chấp nhận sự hình thành phù hợp của các dòng tế bào vô tính có khả năng sinh sản cao, ổn định về mặt di truyền. Chúng có thể được nuôi cấy với mật độ cao trong các bình phản ứng sinh học đơn giản bằng cách sử dụng môi trường không chứa huyết thanh, và cho phép phát triển các quá trình sinh học sinh sản và an toàn. Các tế bào của động vật thường được sử dụng khác chứa các tế bào thận của chuột đồng con (BHK), các tế bào u tủy của chuột nhắt NS0 và SP2/0. Mới đây,

quá trình sản sinh từ động vật chuyển gen cũng được thử nghiệm (Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:975-81, 1996).

Tất cả các kháng thể chứa các cấu trúc hydrat cacbon ở các vị trí bảo toàn trong các vùng ổn định của chuỗi nặng, với mỗi isotyp có chuỗi riêng biệt gồm các cấu trúc hydrat cacbon liên kết với N, chúng ảnh hưởng khác nhau đến quần thể protein, hoạt động tiết hoặc hoạt động chức năng (Wright A. and Morrison S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32, 1997). Cấu trúc của hydrat cacbon liên kết với N gắn kết thay đổi một cách đáng kể, tùy thuộc vào mức độ xử lý, và có thể bao gồm manosa cao, các oligosacarit phức tạp nhánh cũng như hệ hai râu. Thông thường, có quy trình xử lý không đồng nhất các cấu trúc oligosacarit nhân gắn kết ở điểm glycosyl hóa đặc biệt để ngay cả các kháng thể đơn dòng cũng tồn tại như một tập hợp của nhiều dạng glycogen. Tương tự, đã chứng minh được rằng có các khác biệt chính trong quá trình glycosyl hóa kháng thể xuất hiện giữa các dòng tế bào, và ngay cả các khác biệt thậm chí rất nhỏ được phát triển đối với dòng tế bào nhất định sinh trưởng trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau (Lifely, M. R. *et al.*, *Glycobiology* 5(8):813-22, 1995).

Cách để thu được sự gia tăng lớn về hiệu lực, trong khi vẫn duy trì được quy trình sản xuất đơn giản và tránh được một cách hữu hiệu các tác dụng phụ không mong muốn, đáng kể, là tăng cường các chức năng tác động của các kháng thể đơn dòng do tế bào tạo ra, tự nhiên bằng kỹ thuật gắn thành phần oligosacarit của chúng như được mô tả trong bài báo Umana, P. *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999) và U.S. Pat. No. 6602684. Các kháng thể loại IgG1, các kháng thể thường được sử dụng nhiều nhất trong liệu pháp miễn dịch ung thư, là các glycoprotein mà có vị trí glycosyl hóa liên kết với N bảo toàn ở Asn297 trong mỗi miền CH2. Hai oligosacarit phức tạp hai râu gắn kết với Asn297 bị vùi giữa các miền CH2, tạo ra sự tiếp xúc rộng rãi với khung chính polypeptit, và sự có mặt của chúng là cần thiết đối với kháng thể để tạo ra các

chức năng tác động như độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (Lifely, M. R., *et al.*, *Glycobiology* 5:813-822 (1995); Jefferis, R., *et al.*, *Immunol Rev.* 163:59-76 (1998); Wright, A. and Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15:26-32 (1997)).

Trước đây đã biết rằng việc biểu hiện quá mức $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferaza III ("GnTIII"), glycosyltransferaza xúc tác quá trình tạo ra các oligosacarit chia đôi, trong các tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc (CHO) làm tăng đáng kể hoạt tính ADCC *in vitro* của kháng thể khảm đơn dòng chống u nguyên bào thần kinh (chCE7) được tạo ra bởi các tế bào CHO đã được tạo ra (Xem bài báo Umana, P. *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999); và WO 99/54342, toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Kháng thể chCE7 thuộc nhóm lớn của các kháng thể đơn dòng không tiếp hợp mà có ái lực và tính đặc hiệu cao với khối u, nhưng có hiệu lực quá nhỏ để được sử dụng lâm sàng khi được tạo ra trong các dòng tế bào công nghiệp chuẩn thiếu enzym GnTIII (Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Nghiên cứu này trước tiên chứng tỏ rằng sự gia tăng lớn về hoạt tính ADCC có thể đạt được bằng cách tạo ra các tế bào tạo kháng thể để biểu hiện GnTIII, chúng cũng làm gia tăng tỷ lệ giữa các oligosacarit chia đôi, liên quan đến vùng ổn định (Fc), kể cả các oligosacarit bị chia đôi, không fucosyl hóa, cao hơn các mức phát triển trong các kháng thể có trong tự nhiên.

Thuật ngữ kháng nguyên "biểu hiện CD20" được dự định biểu thị mức biểu hiện đáng kể của kháng nguyên CD20 trong tế bào, tốt hơn là trên bề mặt tế bào của tế bào B, tốt hơn nữa là tế bào B, lần lượt từ khối u hoặc bệnh ung thư, tốt hơn là không phải khối u rắn. Các bệnh nhân có "bệnh ung thư biểu hiện CD20" có thể được xác định bằng các thử nghiệm chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tốt hơn, nếu kháng nguyên "biểu hiện CD20" cũng sẽ biểu thị mức biểu hiện đáng kể của kháng nguyên CD20 trong tế bào, tốt hơn là trên bề mặt tế bào của tế bào B, tốt hơn nữa là tế bào B, ở bệnh tự miễn dịch. Mức độ biểu hiện

kháng nguyên CD20 được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật phát hiện hoá học mô miễn dịch (IHC), FACS hoặc bằng kỹ thuật phát hiện dựa vào PCR của ARN thông tin tương ứng.

“Các bệnh nhân” hoặc “các đối tượng” là động vật có vú bất kỳ mắc các tình trạng hoặc bệnh theo sáng chế, và tốt hơn là người.

Thuật ngữ "bệnh ung thư biểu hiện CD20" như được sử dụng ở đây tốt hơn là chỉ u bạch huyết (tốt hơn là u bạch huyết không phải thể Hodgkin tế bào B (NHL)) và bệnh bạch cầu bạch huyết. Các u bạch huyết và bệnh bạch cầu bạch huyết này bao gồm, ví dụ, a) u bạch huyết có nang, b) U bạch huyết tế bào nhỏ không phân cắt/u bạch huyết Burkitt (kể cả u bạch huyết Burkitt đặc hữu, u bạch huyết Burkitt phân tán và u bạch huyết không phải thể Burkitt) c) u bạch huyết vùng rìa hạch (kể cả u bạch huyết tế bào B ngoài vùng rìa hạch (u bạch huyết mô liên quan đến niêm mạc, MALT), u bạch huyết tế bào B vùng rìa hạch và u bạch huyết vùng rìa lách), d) u bạch huyết tế bào lớp bọc (MCL), e) u bạch huyết tế bào lớn (bao gồm u bạch huyết tế bào lớn lan toả tế bào B (DLCL), u bạch huyết tế bào hỗn hợp lan toả, u bạch huyết nguyên bào miễn dịch, u bạch huyết tế bào B trung thất sơ cấp, u mạch bạch huyết chính-u bạch huyết tế bào B phổi), f) bệnh bạch cầu tế bào tóc, g) u bạch huyết tế bào bạch huyết, macroglobulin huyết Waldenstrom), h) bệnh bạch cầu lympho cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu lympho mãn tính (CLL)/u bạch huyết lympho nhỏ (SLL), bệnh bạch cầu tiền lympho tế bào B, i) các u bạch cầu, u tuỷ bạch cầu, đa u tuỷ, u tương bào, j) bệnh Hodgkin.

Tốt hơn, nếu bệnh ung thư biểu hiện CD20 là u bạch huyết không phải thể Hodgkin tế bào B (NHL). Các ví dụ khác về các bệnh ung thư biểu hiện CD20 chứa: u bạch huyết tế bào vỏ (MCL), bệnh bạch cầu lympho cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu lympho mãn tính (CLL), u bạch huyết tế bào lớn lan toả tế bào B (DLCL), u bạch huyết Burkitt, bệnh bạch cầu tế bào tóc, u bạch huyết có nang,

đa u tuỷ, u bạch huyết vùng rìa hạch, rối loạn tăng sinh lympho bào sau cấy ghép (PTLD), u bạch huyết liên quan đến HIV, macroglobulin huyết Waldenstrom, hoặc u bạch huyết CNS sơ cấp.

Như được sử dụng ở đây, "bệnh tự miễn dịch" chỉ bệnh hoặc rối loạn sinh ra bởi và trực tiếp chống lại các mô của chính cá thể. Các ví dụ về các bệnh hoặc các rối loạn tự miễn dịch bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh viêm khớp (bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp dạng thấp trẻ em, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm khớp vảy nến), bệnh vảy nến, bệnh viêm da, bệnh viêm đa cơ/viêm da-cơ, hoại tử da do nhiễm độc, xơ cứng toàn thân và xơ cứng, các đáp ứng liên quan đến bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, viêm ruột kết mạn loét, hội bệnh suy hô hấp, hội bệnh suy hô hấp người trưởng thành (ARDS), viêm màng não, viêm não, viêm màng mạch nhỏ, viêm ruột kết, viêm tiểu cầu thận, các bệnh dị ứng, eczema, bệnh hen, các bệnh bao gồm sự thâm nhiễm của các tế bào T và các đáp ứng viêm mãn tính, bệnh xơ vữa động mạch, viêm cơ tim tự miễn dịch, thiếu hụt dính bám bạch cầu, luput ban đỏ toàn thân (SLE), bệnh tiểu đường cấp ở thiếu niên, xơ cứng rải rác, bệnh viêm não và dây cột sống do dị ứng, các đáp ứng miễn dịch liên quan đến tính tăng nhạy cảm chậm hoặc cấp tính do các xytokin và các lympho bào T gây ra, bệnh lao, bệnh sarcoid, bệnh u hạt bao gồm bệnh u hạt Wegener, mất bạch cầu hạt, viêm mạch (bao gồm ANCA), bệnh thiếu máu không tái tạo, bệnh thiếu máu Diamond Blackfan, bệnh thiếu máu tan huyết miễn dịch bao gồm bệnh thiếu máu tan huyết miễn dịch tự miễn (AIHA), bệnh thiếu máu ác tính, bất sản tế bào đỏ tình khiết (PRCA), thiếu hụt nhân tố VIII, bệnh ưa chảy máu A, giảm bạch cầu trung tính tự miễn dịch, giảm toàn thể huyết cầu, giảm bạch cầu, các bệnh liên quan đến xuyên mạch của bạch cầu, các rối loạn viêm hệ thần kinh trung ương (CNS), hội bệnh tổn thương ở nhiều bộ phận, bệnh thần kinh cơ tự miễn dịch, các bệnh do phức hệ kháng nguyên-kháng thể gây ra, bệnh kháng màng nền cuộn mạch, hội bệnh kháng kháng thể phospholipid, viêm dây thần kinh dị ứng, bệnh Bechet, hội bệnh Castleman, hội bệnh Goodpasture, hội bệnh nhược cơ Lambert-Eaton, hội bệnh

Reynaud, hội bệnh Sjorgen, hội bệnh Stevens Johnson, bong nước pemphigut, pemphigut, bệnh đa nội tiết tự miễn dịch, viêm thận phù, các bệnh đa thần kinh IgM, hoặc bệnh đa thần kinh do IgM gây ra, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP), ban xuất huyết giảm tiểu cầu nghẽn mạch (TTP), giảm lượng tiểu cầu tự miễn dịch, bệnh tự miễn dịch của tinh hoàn và buồng trứng bao gồm viêm tinh hoàn tự miễn dịch và viêm buồng trứng, giảm năng tuyến giáp nguyên phát; các bệnh nội tiết tự miễn dịch bao gồm viêm tuyến giáp tự miễn dịch, viêm tuyến giáp mãn tính (viêm tuyến giáp Hashimoto), viêm tuyến giáp bán cấp, giảm năng tuyến giáp tự phát, bệnh Addison, bệnh Grave, các hội bệnh nhiều tuyến tự miễn dịch (hoặc các hội chứng bệnh nội tiết nhiều tuyến I), các bệnh tiểu đường Typ I cũng đề cập đến như các đái tháo đường phụ thuộc insulin (IDDM) và hội bệnh Sheehan; viêm gan tự miễn dịch, viêm phổi khu trú gian mòm ức dạng bạch huyết (HIV), tắc nghẽn do viêm tiểu phế quản (không cấy ghép) chống lại NSIP, hội bệnh Guillain-Barre, viêm mạch lớn (bao gồm đau nhiều cơ thấp khớp và viêm động mạch tế bào khổng lồ (Takayasu's)), viêm mạch trung bình (bao gồm bệnh Kawasaki và nút viêm đa động mạch), viêm đốt sống dạng thấp, bệnh Berger (bệnh thận IgA), viêm thận-tiểu cầu tiến triển nhanh, xơ gan mật nguyên phát, bệnh spru bụng (bệnh ruột non gluten), bệnh crioglobulin-huyết, xơ cứng cột bên teo cơ (ALS), bệnh động mạch vành, v.v...

Thuật ngữ “tác nhân ức chế sự sinh trưởng” khi được sử dụng ở đây chỉ hợp chất hoặc được phẩm mà có thể ức chế sự sinh trưởng của tế bào, đặc biệt là tế bào ung thư biểu hiện CD20 hoặc in vitro hoặc in vivo. Vì vậy, tác nhân ức chế sự sinh trưởng có thể là một tác nhân làm giảm đáng kể tỷ lệ phần trăm của các tế bào biểu hiện CD20 trong giai đoạn S. Ví dụ về tác nhân ức chế sự sinh trưởng chứa các tác nhân phong bế sự phát triển của chu trình tế bào (ở vị trí khác với giai đoạn S), như các tác nhân mà kích thích sự ngừng G1 và ngừng giai đoạn M. Các chất phong bế giai đoạn M kinh điển chứa các vinca (vincristin và vinblastin), các taxan, và các chất ức chế topo II như doxorubicin, epirubicin,

daunorubixin, etoposít, và bleomycin. Các tác nhân này ngoài tác dụng làm ngừng G1 còn có tác dụng làm ngừng cả giai đoạn S, ví dụ, các tác nhân alkyl hóa ADN như tamoxifen, prednison, dacarbazin, meclotamin, cisplatin, metotrexat, 5-flouraxil, và ara-C. Thông tin thêm nữa có thể được tìm thấy trong "The Molecular Basis of Cancer", Mendelsohn and Israel, eds., Chương 1, với tiêu đề "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" bởi Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), cụ thể là trang 13.

"Điều trị" được dùng để chỉ cả phương pháp chữa bệnh và phòng bệnh hoặc biện pháp ngăn ngừa. Đối tượng cần điều trị bao gồm đối tượng đã bị bệnh cũng như đối tượng trong đó bệnh cần được ngăn chặn. Do đó, bệnh nhân cần điều trị ở đây có thể đã được chẩn đoán là có bệnh hoặc có thể mắc hoặc dễ mắc bệnh.

Thuật ngữ "chất gây độc tế bào" như được sử dụng ở đây chỉ chất ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng của các tế bào và/hoặc làm cho các tế bào bị phá hủy. Thuật ngữ này bao gồm các chất đồng vị phóng xạ (ví dụ, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² và các chất đồng vị phóng xạ của Lu), các tác nhân hóa liệu pháp, và các độc tố như các độc tố phân tử nhỏ hoặc các độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, kể cả các mảnh và/hoặc các thể biến dị của chúng.

"Tác nhân hóa liệu pháp" là hợp chất hóa học nói chung để điều trị bệnh ung thư. Ví dụ về các tác nhân hóa liệu pháp chứa các chất alkyl hóa như thiotepa và xyclophosphamit (CYTOXANTM); các alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; các aziridin như benzodopa, carboquon, meturedopa, và uredopa; các etylenimin và các metylamelamin chứa altretamin, trietylenmelamin, trietylenphosphoramit, triethylenethiophosphoramit và trimetylolomelarnin; các axetogenin (đặc biệt là bulataxin và bulataxinon); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARENOLTM); beta-lapachon;

lapachol; các colchixin; axit betulinic; camptothecin (chứa chất tương tự topotecan (HYCAMTIN™), CPT-11 (irinotecan, C AMPTOSAR™), axetylcamptothecin, scoplectin, và 9-aminocamptothecin); bryostatin; calystatin; CC-1065 (chứa các chất tương tự adozelesin, carzelesin và bizelesin tổng hợp của nó); podophylotoxin; axit podophylinic; teniposit; các cryptophlyxin (đặc biệt là cryptophyxin 1 và cryptophycin 8); dolastatin; duocarmyxin (chứa các chất tương tự tổng hợp, KW-2189 và CBI-TMI); eleutherobin; pancratistatin; sarcodictyin; spongistatin; các hơi cay nitơ như clorambuxil, clonaphazin, cholophosphamit, estramustin, ifosfamid, meclotamin, meclotamin oxit hydroclorua, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamid, hơi cay uraxil; các nitrosure như carmustin, clozotoxin, fotemustin, lomustin, nimustin, và ranirnnustin; các thuốc kháng sinh như các thuốc kháng sinh enediyn (ví dụ calicheamicin, đặc biệt là calicheamicin gama 11 và calicheamicin omega 11 (xem, ví dụ, bài báo Angew, Chemie Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dynemixin, chứa dynemixin A; esperamixin; cũng như các nhóm mang màu neocarzinostatin và các nhóm mang màu kháng sinh protein màu enediyn), các aclacinomysin, actinomycin, autramycin, azaserin, các bleomycin, cactinomycin, carabixin, carminomycin, carzinophilin, các myxini màu, dactinomycin, daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, doxorubixin (chứa ADRIAMYCIN™, morpholino-doxorubixin, xyanomorpholino-doxorubixin, 2-pyrolino-doxorubixin, thuốc tiêm doxorubixin HCl liposom (DOXIL™), doxorubixin liposom TLC D-99 (MYOCET™), doxorubixin liposom peglyl hóa (CAELYX™), và deoxydoxorubixin), epirubixin, esorubixin, idarubixin, marxenomyxin, các mitomycin như mitomycin C, axit mycophenolic, nogalamycin, các olivomycin, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubixin, streptonigrin, streptozoxin, tuberxidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; các chất chống chuyển hóa như metotrexat, gemxitabin (GEMZAR™), tegafur (UFTORAL™),

capexitabin (XELODA™), epothilon, và 5-flouraxil (5-FU); các chất tương tự axit folic như denopterin, metotrexat, pteropterin, trimetrexat; các chất tương tự purin như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; các chất tương tự pyrimidin như anxitabin, azacitidin, 6-azauridin, carmofur, cytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enocitabin, floxuridin; các chất kháng thương thận như aminoglutethimit, mitotan, trilostan; các chất độn axit folic như axit frolinic; axeglaton; aldophosphamit glycosit; axit aminolevulinic; eniluraxil; amsacrin; bestrabuxil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolxin; diaziquon; elfornithin; eliptini axetat; etoglucit; gali nitrat; hydroxyure; lentinan; lonidainin; các maytansinoit như maytansin và các ansamitocin; mitoguazon; mitoxantron; mopidanmol; nitraerin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; losoxantron; 2-etylhydrazit; procarbazin; phức chất PSKL™ polysacarit (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxan; rhizoxin; sizofiran; spirogermarai; axit tenuazonic; triaziquon; 2,2',2"-trichlotrietylamin; các trichothecen (đặc biệt là độc tố T-2, veracurin A, roridin A và anguidin); uretan; dacarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gaxytosin; arabinosit ("Ara-C"); thiotepa; taxoit, ví dụ paclitaxel (TAXOL™), chế phẩm paclitaxel dạng hạt nano được gắn phân tử albumin (ABRAXANE™), và docetaxel (TAXOTERE™); cloranbuxil; 6-thioguanin; mercaptopurin; metliotrexat; các chất platin như cisplatin, oxaliplatin, và carboplatin; các vinca, chúng ngăn chặn quá trình polyme hóa tubulin khởi hình thành các vi cấu trúc hình ống, chứa vinblastin (VELBAN™), vincristin (ONCOVIN™), vindesin (ELDISINE™), FILDESIN™, và vinorelbin (NAVELBINE™)); etoposit (VP-16); ifosfamid; mitoxantron; leucovovin; novantron; edatrexat; daunomyxin; aminopterin; ibandronat; chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; diflometylornithin (DMFO); các retinoit như axit retinoic, chứa bexaroten (TARGRETIN™); các bisphosphonat như clodronat (ví dụ BONEFOS™ hoặc OSTAC™), etidronat (DIDROCAL™), NE-58095, axit zoledronic/zoledronat (ZOMETA™),

alendronat (FOSAMAJX™), pamidronat (AREDIA™), tiludronat (SKELID™), hoặc risedronat (ACTONEL™); troxacitabin (chất tương tự 1,3-dioxolan nucleosit xytosin); các oligonucleotit đối nghĩa, đặc biệt là các chất ức chế biểu hiện của các gen theo các đường truyền tín hiệu liên quan đến quá trình tăng sinh tế bào khác thường như PKC-alpha, Raf, H-Ras chẳng hạn, và thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF-R); các vacxin như vacxin THERATOPE™ và các vacxin dùng cho liệu pháp gen như vacxin ALLOVECTIN™, vacxin LEUVECTIN™, vacxin VAXID™ chẳng hạn; chất ức chế topoisomeraza 1 (ví dụ LURTOTECAN™); rmRH (ví dụ ABARELIX™); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosin, chất ức chế COX-2 (ví dụ celecoxib hoặc etoricoxib), chất ức chế proteosome (ví dụ PS341); bortezomib (VELCADE™); CCI-779; tipifarnib (RI 1577); orafenib, ABT510; chất ức chế Bcl-2 như oblimersen natri (GENASENSE™); pixantron; các chất ức chế EGFR (xem định nghĩa dưới đây); các chất ức chế tyrosin kinaza (xem định nghĩa dưới đây); và các muối, các axit hoặc các dẫn xuất được dùng của loại bất kỳ nêu trên; cũng như tổ hợp của hai hoặc nhiều loại nêu trên như CHOP, sự rút ngắn cho liệu pháp kết hợp của xyclophosphamit, doxorubicin, vincristin, và prednisolon (tùy ý còn chứa interferon- γ (CHVP/interferon- γ), và FOLFOX, sự rút ngắn cho chế độ điều trị bằng oxaliplatin (ELOXATIN™) kết hợp với 5-FU và leucovovin, CVP (xyclophosphamit, vincristin, và prednisolon), MCP (mitozantron, clorambuxil và prednisolon), FC (fludarabin và xyclophosphamit), ICE (ifosfamid, carboplatin, và etoposit), và dexamethason, xytarabin, và cisplatin (DHAP), dexamethason, doxorubixin liposomal, và vincristin (DVD), v.v..

“Các chất chống tạo mạch” được dùng để chỉ hợp chất phong bế, hoặc cản trở tới một mức độ nhất định, sự phát triển của các mạch máu. Yếu tố chống tạo mạch có thể là phân tử nhỏ hoặc kháng thể chẳng hạn gắn kết với yếu tố sinh trưởng hoặc thụ thể yếu tố sinh trưởng liên quan đến sự kích thích quá trình hình

thành mạch. Yếu tố chống tạo mạch được ưu tiên ở đây là kháng thể gắn kết với yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF), như Bevacizumab (AVASTIN™).

Thuật ngữ "xytokin" là thuật ngữ chung đối với các protein được giải phóng bởi một quần thể tế bào tác động đến tế bào khác như các môi chất gian bào. Ví dụ về các xytokin này là các lymphokin, các monokin, và các hormon polypeptit truyền thống. Nằm trong số các xytokin này là hormon sinh trưởng như hormon sinh trưởng người, hormon sinh trưởng người N-methionyl, và hormon sinh trưởng bò, hormon tuyến cận giáp, thyroxin, insulin, proinsulin, relaxin; các hormon prorelaxin, glycoprotein như hormon được tổng hợp và giải phóng từ tuyến yên trước (FSH), hormon kích thích tuyến giáp (TSH), và hormon tạo hoàng thể (LH), yếu tố sinh trưởng gan; yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi, prolactin, lactogen nhau, yếu tố hoại tử khối u α và β , chất ức chế Muller, peptit liên quan đến gonadotropin chuột, inhibin; activin, yếu tố sinh trưởng nội mô mạch integrin, thrombopoietin (TPO), các yếu tố sinh trưởng thần kinh như NGF- β , yếu tố sinh trưởng tiểu cầu; các yếu tố sinh trưởng biến đổi (TGFs) như TGF- α và TGF- β , yếu tố sinh trưởng tương tự insulin I và -II, hormon do tế bào thận tiết ra (EPO), các yếu tố kích thích tạo xương; các interferon như interferon α , β , và γ , các yếu tố kích thích khuẩn lạc (CSFs) như đại thực bào-CSF (M-CSF), bạch cầu hạt-đại thực bào-CSF (GM-CSF), và bạch cầu hạt-CSF (G-CSF), các intolokin (ILs) như IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, yếu tố hoại tử khối u như TNF- α và TNF- β , và các yếu tố polypeptit khác chứa LIF và kit phối tử (KL). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ xytokin chứa các protein có nguồn gốc tự nhiên hoặc từ dịch nuôi cấy tế bào tái tổ hợp và các loại tương đương có hoạt tính sinh học của các xytokin trình tự tự nhiên.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" được dùng để chỉ lượng tạo ra hiệu quả mong muốn. Đối với trường hợp là thành phần được phẩm như enzym hyaluronidaza

theo sáng chế thì lượng hữu hiệu là lượng cần thiết để làm tăng mức độ phân tán và hấp thu của kháng thể kháng CD20 cùng sử dụng theo cách để kháng thể kháng CD20 có thể hoạt động theo cách chữa bệnh hữu hiệu như nêu trên. Đối với trường hợp là dược chất thì nó là lượng hoạt chất hữu hiệu để điều trị bệnh ở bệnh nhân. Nếu bệnh là bệnh ung thư, lượng hữu hiệu của dược chất có thể làm giảm số lượng các tế bào ung thư; giảm kích thước của khối u; ức chế (tức là làm chậm một mức độ nhất định và tốt hơn là làm ngừng lại) sự thâm nhập tế bào ung thư vào các cơ quan ngoại biên; ức chế (tức là làm chậm tới một mức độ nhất định và tốt hơn là làm ngừng lại) sự di căn khối u; ức chế, tới một mức độ nhất định, sự sinh trưởng khối u; và/hoặc làm giảm bớt tới một mức độ nhất định một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh ung thư. Trong một chừng mực, dược chất có thể ngăn ngừa sự sinh trưởng và/hoặc giết chết các tế bào ung thư đang tồn tại, nó có thể kìm hãm tế bào và/hoặc gây độc tế bào. Lượng hữu hiệu có thể kéo dài sự sống mà bệnh không tiến triển, tạo ra sự đáp ứng mục đích (bao gồm đáp ứng một phần, PR, hoặc đáp ứng hoàn toàn, CR), tăng tổng thời gian sống sót, và/hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh ung thư.

Thuật ngữ "dược phẩm" được dùng để chỉ dược phẩm dưới dạng mà cho phép hoạt tính sinh học của hoạt chất có hiệu quả, và chúng không chứa các thành phần khác mà gây độc không thể chấp nhận được cho đối tượng sử dụng dược phẩm đó. Các dược phẩm này là tiệt trùng.

Dược phẩm "tiệt trùng" là vô trùng hoặc không có tất cả các vi sinh vật sống và các bào tử của chúng.

Dược phẩm "ổn định" là dược phẩm, trong đó tất cả protein có trong đó về cơ bản vẫn giữ được độ ổn định vật lý và/hoặc độ ổn định hóa học và/hoặc hoạt tính sinh học của chúng khi bảo quản ở nhiệt độ bảo quản dự tính, ví dụ, 2 – 8°C. Tốt hơn là, dược phẩm về cơ bản vẫn giữ được độ ổn định vật lý và hóa

học, cũng như hoạt tính sinh học của nó khi bảo quản. Thời gian bảo quản nói chung được chọn dựa vào thời hạn sử dụng dự tính của dược phẩm này. Tốt hơn là, dược phẩm ổn định sau khi làm đông lạnh (tối, ví dụ, -20°C) và làm tan băng dược phẩm này, ví dụ, sau một hoặc nhiều chu trình làm đông lạnh và làm tan băng. Các kỹ thuật phân tích khác để xác định độ ổn định protein là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được đề cập trong ấn phẩm *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) và Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993) chẳng hạn. Độ ổn định có thể được xác định ở nhiệt độ được chọn trong khoảng thời gian đã chọn. Độ ổn định có thể được đánh giá về chất lượng và/hoặc định lượng theo nhiều cách khác nhau, bao gồm việc đánh giá sự hình thành khối kết tụ (ví dụ, nhờ sử dụng phép sắc ký loại trừ theo kích thước, bằng cách đo độ đục, và/hoặc bằng mắt); bằng cách đánh giá tính không đồng nhất điện tích nhờ sử dụng phép sắc ký trao đổi cation hoặc điện di vùng mao mạch; phân tích SDS-PAGE để so sánh kháng thể giảm và còn nguyên vẹn; đánh giá hoạt tính sinh học hoặc chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể; ,v.v.. Độ không ổn định có thể liên quan đến một hoặc nhiều vấn đề bất kỳ: kết tụ, khử amit hóa (ví dụ, khử amit hóa Asn), oxy hóa (ví dụ oxy hóa Met), đồng phân hóa (ví dụ, đồng phân hóa Asp), cắt xén/thủy phân/phân mảnh (ví dụ, phân mảnh vùng bản lề), hình thành succinimit, (các) xystein không ghép cặp,v.v..

Dược phẩm chứa các kháng thể dùng theo sáng chế được bào chế để bảo quản bằng cách trộn kháng thể có mức độ tinh khiết mong muốn với các chất mang, các tá dược, hoặc các chất làm ổn định dược dụng tùy ý (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), dưới dạng các dược phẩm đông khô nhanh hoặc các dung dịch nước. Các chất mang, các tá dược, hoặc các chất làm ổn định thích hợp là không độc đối với người nhận với liều lượng và nồng độ sử dụng.

Thuật ngữ “chất hoạt động bề mặt” như được sử dụng ở đây chỉ chất có hoạt tính bề mặt được dùng. Trong dược phẩm theo sáng chế, lượng chất hoạt động bề mặt được mô tả là tỷ lệ phần trăm được biểu thị theo khối lượng/thể tích. Đơn vị khối lượng/thể tích thường được sử dụng nhất là mg/mL. Ví dụ thích hợp về các chất hoạt động bề mặt được dùng chứa các este của axit béo polyoxyetylen-sorbitan (Tween), các polyetylen-polypropylen glycol, các polyoxyetylen-stearat, các polyoxyetylen alkyl ete, ví dụ polyoxyetylen monolauryl ete, các alkylphenylpolyoxy-etylen ete (Triton-X), polyoxyetylen-polyoxypropylen copolyme (Poloxamer, Pluronic), và natri dodexyl sulphat (SDS). Các este của axit béo polyoxyetylensorbitan thích hợp nhất là polysorbate 20 (được bán dưới nhãn hiệu thương mại Tween 20™) và polysorbate 80 (được bán dưới nhãn hiệu Tween 80™). Các polyetylen-polypropylen copolyme thích hợp nhất là các loại được bán dưới nhãn hiệu Pluronic® F68 hoặc Poloxamer 188™. Các polyoxyetylen-stearat được ưu tiên là các loại được bán dưới nhãn hiệu Myrij™. Các polyoxy-etylen alkyl ete thích hợp nhất là các loại được bán dưới nhãn hiệu Brij™. Các alkylphenolpolyoxyetylen ete thích hợp nhất là được bán dưới tên thương mại Triton-X.

Thuật ngữ “chất đệm” như được sử dụng ở đây chỉ chất đệm được dùng. Như được sử dụng ở đây thuật ngữ “chất đệm tạo ra độ pH bằng $5,5 \pm 2,0$ ” chỉ chế phẩm tạo ra dung dịch chứa nó chịu được các thay đổi về độ pH bởi tác động của các thành phần kết hợp axit/bazơ của nó. Chất đệm được dùng thích hợp theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong các chất đệm histidin, các chất đệm xitrat, các chất đệm gluconat, các chất đệm succinat, các chất đệm axetat, các chất đệm glyxylglyxin và axit hữu cơ khác, và các chất đệm phosphat. Các chất đệm được ưu tiên là L-histidin hoặc các hỗn hợp của L-histidin với L-histidin hydroclorua với các tác nhân có tính đẳng trương và điều chỉnh độ pH hiệu nghiệm bằng axit hoặc bazơ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Được ưu tiên nhất là L-histidin.

"Chất đệm histidin" là chất đệm chứa axit histidin amin. Ví dụ về các chất đệm histidin chứa histidin clorua, histidin axetat, histidin phosphat, histidin sulfat. Chất đệm histidin được ưu tiên được chỉ ra trong các ví dụ ở đây được phát hiện là histidin clorua. Theo một phương án được ưu tiên, chất đệm histidin clorua được điều chế bằng cách chuẩn độ L-histidin (bazơ tự cho, chất rắn) với axit clohydric loãng hoặc bằng cách hòa tan L-histidin và L-histidin hydroclorua (ví dụ, monohydrat) với lượng và tỷ lệ xác định.

Sáng chế "đẳng trương" có nghĩa là dược phẩm về cơ bản có áp suất thẩm thấu tương tự như máu người. Các dược phẩm đẳng trương nói chung sẽ có nồng độ molal đồng thẩm áp ~ 300 mOsm/kg. Tính đẳng trương có thể được xác định nhờ thẩm thấu kế loại áp suất hơi hoặc hạ bằng điểm.

Thuật ngữ "các tác nhân có tính đẳng trương" như được sử dụng ở đây chỉ các tác nhân có tính đẳng trương dược dụng. Các tác nhân có tính đẳng trương được sử dụng để tạo ra dược phẩm đẳng trương. Dược phẩm đẳng trương là chất lỏng hoặc chất lỏng được hoàn nguyên từ dạng rắn, ví dụ, dạng đông khô nhanh và chỉ dung dịch có cùng trương lực tương tự như một số dung dịch khác mà nó được so sánh với, như dung dịch muối sinh lý và huyết thanh. Các tác nhân có tính đẳng trương thích hợp chứa nhưng không chỉ giới hạn trong các muối, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong natri clorua (NaCl) hoặc kali clorua, các đường và các rượu đường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở glucoza, sucroza, trehaloza hoặc glyxerol và thành phần bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin, các đường, các muối và các hỗn hợp của chúng. Các tác nhân có tính đẳng trương nói chung được sử dụng với tổng lượng nằm trong khoảng từ 5mM đến 350mM.

Thuật ngữ "chất lỏng" như được sử dụng ở đây liên quan đến dược phẩm theo sáng chế chỉ dược phẩm là chất lỏng ở nhiệt độ ít nhất nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C.

Thuật ngữ “đông khô nhanh” như được sử dụng ở đây liên quan đến được phẩm theo sáng chế chỉ được phẩm mà được làm khô bằng cách làm đông lạnh được phẩm này và sau đó làm thăng hoa hỗn đá ra khỏi lượng đóng băng bằng các phương pháp đông khô đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, các thiết bị làm đông khô có bán trên thị trường.

Thuật ngữ “các muối” như được sử dụng ở đây chỉ muối với lượng nằm trong khoảng từ 1mM đến 500mM. Ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về muối bao gồm các muối của hỗn hợp bất kỳ của các cation natri kali, canxi hoặc magie với các anion clorua, phosphat, xitrat, succinat, sulphat hoặc hỗn hợp của chúng.

Thuật ngữ “axit amin” như được sử dụng ở đây chỉ axit amin với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, arginin, glyxin, ornithin, glutamin, asparagin, lysin, histidin, axit glutamic, axit asparagic, isoleuxin, leuxin, alanin, phenylalanin, tyrosin, tryptophan, metionin, serin và prolin.

Thuật ngữ "sacarit" ở đây có nói chung $(CH_2O)_n$ và các dẫn xuất của chúng, bao gồm các monosacarit, disacarit, trisacarit, polysacarit, các rượu đường, các đường khử, các đường không khử, v.v.. Ví dụ về các sacarit ở đây chứa glucoza, sucroza, trehaloza, lactoza, fructoza, maltoza, dextran, glyxerin, dextran, erythritol, glyxerol, arabitol, sylitol, sorbitol, manitol, melibioza, melezitoza, rafinoza, manotrioza, stachyoza, maltoza, lactuloza, maltuloza, gluxitol, maltitol, lactitol, iso-maltuloza, v.v.. Cũng nằm trong định nghĩa theo sáng chế là glucosamin, N-Metylglucosamin (được gọi là “Meglumín”), galactosamin và axit neuraminic và các hỗn hợp của các sacarit theo sáng chế. Sacarit được ưu tiên là disacarit không khử, như trehaloza hoặc sucroza. Sacarit được ưu tiên nhất theo sáng chế là trehaloza.

Thuật ngữ “chất làm ổn định” được dùng để chỉ các chất làm ổn định được dùng, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn trong các axit amin và đường như được mô tả trong các phần nêu trên cũng như các dextran có bán trên thị trường thuộc loại bất kỳ và khối lượng phân tử bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ “chất chống oxy hóa” được dùng để chỉ chất chống oxy hóa được dùng. Thuật ngữ này có thể chứa các tá dược như metionin, rượu benzyl hoặc tá dược bất kỳ dùng để giảm đến mức tối thiểu sự oxy hóa.

Thuật ngữ "phương pháp điều trị bệnh" hoặc phương pháp tương đương của nó, khi được áp dụng, ví dụ, bệnh ung thư chỉ quy trình hoặc tiến trình tác động được chỉ định để làm giảm hoặc loại trừ số lượng các tế bào ung thư ở bệnh nhân, hoặc để làm giảm bớt các triệu chứng của bệnh ung thư. "Phương pháp điều trị bệnh" bệnh ung thư hoặc rối loạn tăng sinh khác không nhất thiết có nghĩa là các tế bào ung thư hoặc rối loạn khác trên thực tế sẽ được làm giảm, mà số lượng các tế bào hoặc các rối loạn trên thực tế sẽ được làm giảm, hoặc các triệu chứng của bệnh ung thư hoặc các rối loạn khác trên thực tế sẽ được giảm bớt. Thông thường, phương pháp để điều trị bệnh ung thư sẽ được thực hiện ngay cả khi khả năng thành công thấp, nhưng nó, đã tạo ra một lịch sử bệnh lý và triển vọng sống sót của bệnh nhân được ước lượng, tuy thế được đánh giá là đem lại quá trình tác động có lợi về mặt tổng thể.

Vì vậy vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế là đề xuất các dược phẩm ổn định, nồng độ cao mới chứa kháng thể kháng CD20 được dùng hoặc hỗn hợp của các phân tử kháng thể này để tiêm dưới da. Các dược phẩm này chứa, ngoài các lượng lớn kháng thể kháng CD20 hoặc hỗn hợp của chúng, còn có chất đệm, chất làm ổn định hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất làm ổn định, chất hoạt động bề mặt không ion và tốt hơn là một lượng hữu hiệu của ít nhất một enzym hyaluronidaza. Việc bào chế các dược phẩm kháng thể nồng độ cao là thử thách

do sự gia tăng mạnh về độ nhớt ở nồng độ protein cao hơn và sự gia tăng mạnh về độ kết tụ protein, hiện tượng đó là sự tự phụ thuộc nồng độ. Độ nhớt cao tác động không tốt tới khả năng xử lý (ví dụ các bước bơm và lọc) của các dược phẩm kháng thể và đường dùng thuốc (khả năng tiêm). Bằng cách bổ sung các tá dược có thể làm giảm độ nhớt cao trong một số trường hợp. Việc kiểm soát và phân tích thể kết tụ protein là một thử thách tăng dần. Thể kết tụ là vấn đề thường gặp phải trong nhiều bước của quá trình xử lý, nó chứa quá trình lên men, tinh chế, bào chế và quá trình bảo quản. Các yếu tố khác, như nhiệt độ, nồng độ protein, áp lực khuấy trộn, các tác động của việc làm đông lạnh và làm tan băng, dung môi và chất hoạt động bề mặt, và các quá trình cải biến hóa học, có thể ảnh hưởng tới trạng thái kết tụ của protein chữa bệnh. Trong quá trình phát triển dược phẩm chứa kháng thể nồng độ cao thì xu hướng kết tụ của protein phải được kiểm soát và điều chỉnh bằng cách bổ sung các tá dược và các chất hoạt động bề mặt khác nhau [Kiese S. et al., J. Pharm. Sci., 2008; 97(10); 4347-4366].

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất dược phẩm ổn định, chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao có hoạt tính dược hoặc hỗn hợp của các phân tử kháng thể này để sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Tốt hơn nếu đường dùng là dùng trong tĩnh mạch như tiêm ngay lập tức một lượng thuốc lớn hoặc bằng cách truyền liên tục trong một khoảng thời gian, bằng cách tiêm trong cơ, trong màng bụng, trong não tủy, dưới da, trong khớp, trong hoạt dịch, trong vó. Ưu tiên là sử dụng trong tĩnh mạch hoặc dưới da các kháng thể, ưu tiên nhất là tiêm dưới da. Như đã nêu ở trên, nó vượt quá tầm thông thường để tạo ra một dược phẩm, ổn định chứa kháng thể CD20 nồng độ cao mà hầu như không chứa các hạt. Nếu dược phẩm này được dự tính để sử dụng dưới da, thì theo một phương án ưu tiên dược phẩm này được kết hợp với một enzym hyaluronidaza.

Đặc biệt hơn, dược phẩm, ổn định chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao có hoạt tính dược theo sáng chế bao gồm:

- khoảng 20 đến 350mg/ml kháng thể kháng CD20;
- khoảng 1 đến 100mM chất đệm tạo ra độ pH bằng $5,5 \pm 2,0$;
- khoảng 1 đến 500mM chất làm ổn định hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất làm ổn định, trong đó, tùy ý, metionin được sử dụng như chất làm ổn định thứ hai, tốt hơn là với nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 25mM;
- 0,01 đến 0,1% chất hoạt động bề mặt không ion; và
- tốt hơn là một lượng hữu hiệu của ít nhất một enzym hyaluronidaza.

Dược phẩm, ổn định chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao được dùng theo sáng chế có thể được đề xuất dưới dạng lỏng hoặc có thể được đề xuất dưới dạng làm đông khô nhanh. Nồng độ kháng thể trong dược phẩm hoàn nguyên có thể được gia tăng bằng cách hoàn nguyên dược phẩm đông khô nhanh để tạo ra nồng độ protein trong dược phẩm hoàn nguyên lớn gấp 2-40 lần nồng độ protein trong hỗn hợp trước khi làm đông khô nhanh.

Nồng độ kháng thể kháng CD20 được ưu tiên là từ 50 đến 150mg/ml, tốt hơn là từ 75 đến 150mg/ml, thậm chí tốt hơn là từ 120 ± 20 mg/ml, tốt nhất là khoảng 120mg/ml.

Nồng độ của chất đệm được ưu tiên là nằm trong khoảng từ 1 đến 50mM, tốt hơn nữa là từ 10 đến 30mM; nồng độ được ưu tiên nhất là khoảng 20mM. Các chất đệm khác nhau là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này như thể hiện dưới đây. Chất đệm được ưu tiên được chọn từ nhóm bao gồm chất đệm histidin, chất đệm axit axetic, chất đệm axit xitric, tốt nhất là chất đệm L-histidin/HCl. Chất đệm histidin theo sáng chế được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 1mM đến 50mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10mM đến khoảng 30mM và tốt hơn nữa là vào khoảng 20mM. Tốt hơn nếu chất đệm axit axetic theo sáng chế là nằm trong khoảng từ 10mM đến 30mM và tốt nhất là

khoảng 20mM. Tốt hơn nếu chất đệm axit xitric theo sáng chế là nằm trong khoảng từ 10mM đến 30mM và tốt nhất là khoảng 20mM.

Không phụ thuộc vào chất đệm được sử dụng, độ pH sẽ được điều chỉnh ở trị số nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,0 và tốt hơn là từ 5,5 đến 6,5, còn tốt hơn nữa là được chọn từ nhóm bao gồm có 5,5, 6,0, 6,1 và 6,5. Độ pH này có thể đạt được bằng cách điều chỉnh bằng axit hoặc bazơ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc bằng cách sử dụng các hỗn hợp thích hợp của các thành phần chất đệm hoặc cả hai.

Tốt hơn là (các) chất làm ổn định (sử dụng đồng nghĩa với thuật ngữ “tác nhân làm ổn định” trong phần mô tả sáng chế) được chọn từ nhóm bao gồm muối, hydrat cacbon, sacarit và (các) axit amin, tốt hơn nữa là hydrat cacbon hoặc sacarit, tốt hơn nữa là đường được chấp nhận bởi cơ quan có thẩm quyền để làm chất phụ gia hoặc tá dược thích hợp trong các dược phẩm, tốt nhất là được chọn từ nhóm bao gồm α,α -trehaloza dihydrat, NaCl và metionin. Nồng độ ưu tiên của chất làm ổn định là từ 15 đến 250mM, hoặc tốt hơn nữa là từ 150 đến 250mM. Ưu tiên nhất là nồng độ vào khoảng 210mM. Dược phẩm có thể chứa chất làm ổn định thứ hai, theo đó chất làm ổn định thứ hai này tốt hơn là metionin, tốt hơn là với nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 25mM, tốt hơn nữa là với nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 15mM. Nồng độ metionin được ưu tiên nhất là vào khoảng 10mM.

Tốt hơn nếu chất hoạt động bề mặt không ion là polysorbate, tốt hơn nữa là được chọn từ nhóm bao gồm polysorbate 20, polysorbate 80 và polyetylen-polypropylen copolyme. Nồng độ của chất hoạt động bề mặt không ion là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,1% (khối lượng/thể tích), hoặc từ 0,02 đến 0,08% (khối lượng/thể tích) và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,02 đến 0,06% (khối lượng/thể tích), tốt nhất là vào khoảng 0,06 % (khối lượng/thể tích).

Thuật ngữ “đường” như được sử dụng ở đây đề cập đến đường được dùng với lượng nằm trong khoảng từ 25mM đến 500mM. Tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100 đến 300mM. Tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 180 đến 240mM. Tốt nhất là 210mM.

Nồng độ của enzym hyaluronidaza phụ thuộc vào enzym hyaluronidaza thực tế sử dụng trong quá trình bào chế dược phẩm theo sáng chế. Lượng hữu hiệu của enzym hyaluronidaza có thể dễ dàng được xác định bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này dựa vào phần mô tả cụ thể dưới đây. Nó sẽ được cung cấp với lượng đủ sao cho có thể làm tăng độ phân tán và hấp thụ của kháng thể kháng CD20 cùng sử dụng. Tốt hơn nếu lượng hữu hiệu của enzym hyaluronidaza là nằm trong khoảng từ 1.000 đến 16.000U/ml, trong đó lượng này tương ứng với nằm trong khoảng từ 0,01mg đến 0,15mg protein dựa vào hoạt tính riêng giả định của 100.000U/mg. Nồng độ ưu tiên của enzym hyaluronidaza là nằm trong khoảng từ 1.500 đến 12.000U/ml. Tốt nhất là nồng độ vào khoảng 2.000U/ml hoặc vào khoảng 12.000U/ml. Các lượng chỉ định trên đây tương ứng với lượng enzym hyaluronidaza ban đầu được thêm vào chế phẩm. Enzym hyaluronidaza có mặt hoặc dưới dạng dược phẩm hỗn hợp cuối cùng hoặc để sử dụng đồng thời, ví dụ dưới dạng đồng dược phẩm như được mô tả thêm dưới đây. Vấn đề quan trọng đối với dược phẩm theo sáng chế là ở thời gian nó sẵn sàng để sử dụng và/hoặc được tiêm nó có thành phần như được yêu cầu bảo hộ.

Enzym hyaluronidaza có thể thu được từ động vật, các mẫu của người hoặc được tạo ra dựa vào kỹ thuật tái tổ hợp ADN như được mô tả thêm dưới đây.

Đặc biệt hơn, các dược phẩm ổn định, nồng độ cao theo sáng chế có một trong các thành phần ưu tiên dưới đây:

a) 100 đến 150mg/ml kháng thể kháng CD20, tốt hơn là kháng thể này được chọn từ nhóm gồm có Rituximab, Ocrelizumab hoặc HuMab<CD20>; 1 đến 50mM chất đệm histidin, tốt hơn là L-histidin/HCl với độ pH khoảng 5,5; 15 đến 250mM chất làm ổn định, tốt hơn là α,α -trehaloza dihydrat, và tùy ý metionin làm chất làm ổn định thứ hai với nồng độ từ 5 đến 25mM; chất hoạt động bề mặt không ion được chọn từ nhóm gồm có polysorbate 20 và polysorbate 80, tốt hơn là khoảng 0,02 đến 0,06% (khối lượng/thể tích), và tùy ý từ 1.000 đến 16.000U/ml enzym hyaluronidaza, tốt hơn là rHuPH20, tốt nhất nếu với nồng độ là 2.000U/ml hoặc 12.000U/ml.

b) 120 ± 20 mg/ml kháng thể kháng CD20, trong đó tốt hơn nếu kháng thể này là Rituximab, Ocrelizumab hoặc HuMab<CD20>; 10 đến 30mM, tốt hơn là 20mM chất đệm histidin, tốt hơn là L-histidin/HCl với độ pH khoảng 5,5; 150 đến 250mM, tốt hơn là 210mM chất làm ổn định, tốt hơn là α,α -trehaloza dihydrat, và tùy ý metionin làm chất làm ổn định thứ hai với nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 25mM, hoặc nằm trong khoảng từ 5 đến 15mM, tốt nhất là 10mM; chất hoạt động bề mặt không ion được chọn từ nhóm bao gồm polysorbate 20 và polysorbate 80, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,02 đến 0,06% (khối lượng/thể tích), và tùy ý nằm trong khoảng từ 1.000 đến 16.000U/ml, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1.500 đến 12.000U/ml, tốt nhất là 2.000 U/ml hoặc 12.000 U/ml enzym hyaluronidaza, tốt hơn là rHuPH20.

c) 120mg/ml kháng thể kháng CD20, trong đó tốt hơn nếu kháng thể này là Rituximab, Ocrelizumab hoặc HuMab<CD20>; 10 đến 30mM, tốt hơn là 20mM chất đệm histidin, tốt hơn là L-histidin/HCl với độ pH khoảng 5,5; 150 đến 250mM, tốt hơn là 210mM chất làm ổn định, tốt hơn là α,α -trehaloza dihydrat, và tùy ý metionin làm chất làm ổn định thứ hai với nồng độ từ 5 đến 25mM, tốt hơn là từ 5 đến 15mM, tốt nhất là 0 mM; chất hoạt động bề mặt không ion được chọn từ nhóm bao gồm có polysorbate 20 và polysorbate 80, tốt

hơn là 0,02 đến 0,06% (khối lượng/thể tích), và tùy ý từ 1.000 đến 16.000U/ml, tốt hơn là 1.500 đến 12.000U/ml, tốt nhất là 2.000 U/ml hoặc 12.000U/ml enzym hyaluronidaza, tốt hơn là rHuPH20.

d) 120mg/ml kháng thể kháng CD20, tốt hơn là Rituximab; tốt hơn là 20mM chất đệm histidin, tốt hơn là L-histidin/HCl với độ pH khoảng 5,5; 210mM α,α -trehaloza dihydrat, và tùy ý 10mM metionin làm chất làm ổn định thứ hai; chất hoạt động bề mặt không ion được chọn từ nhóm gồm có polysorbate 20 và polysorbate 80, tốt hơn là 0,02 đến 0,06% (khối lượng/thể tích), và tùy ý 2.000U/ml hoặc 12.000U/ml enzym hyaluronidaza, tốt hơn là rHuPH20.

e) Dược phẩm đông khô nhanh chứa 120mg/ml kháng thể kháng CD20, tốt hơn là Rituximab; 20mM chất đệm histidin, tốt hơn là L-histidin/HCl với độ pH khoảng 5,5; 210mM α,α -trehaloza dihydrat, và tùy ý 10mM metionin như chất làm ổn định thứ hai; chất hoạt động bề mặt không ion được chọn từ nhóm gồm có polysorbate 20 và polysorbate 80, tốt hơn là 0,02 đến 0,06% (khối lượng/thể tích), và tùy ý 2.000U/ml hoặc 12.000U/ml enzym hyaluronidaza, tốt hơn là rHuPH20.

Dược phẩm ổn định chứa kháng thể kháng CD20 được dụng được đề xuất chứa khoảng 30mg/ml đến 350mg/ml, ví dụ khoảng 30 mg/ml đến 100mg/ml (chứa khoảng 30mg/ml, khoảng 50mg/ml hoặc khoảng 100mg/ml) Ocrelizumab (ví dụ 2H7.v16 được nhân tính hóa); khoảng 1 đến 100 mM chất đệm (ví dụ natri axetat) tạo ra độ pH bằng $5,5 \pm 2,0$ (ví dụ pH= 5,3); khoảng 15 đến 250mM chất làm ổn định hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất làm ổn định (chứa trehaloza, ví dụ khoảng 8% trehaloza dihydrat); khoảng 0,01 đến 0,1% (khối lượng/thể tích) chất hoạt động bề mặt không ion; và tùy ý một lượng hữu hiệu của ít nhất một enzym hyaluronidaza (ví dụ rHuPH20), tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 1.500U/ml đến 12.000U/ml.

Các dược phẩm khác chứa các thành phần được ưu tiên được nêu trong các ví dụ.

Đã được đề xuất để tạo thuận tiện cho việc tiêm dưới da các protein và kháng thể chữa bệnh bằng cách sử dụng lượng nhỏ glycoprotein hyaluronidaza hòa tan (sHASEGPs); xem WO2006/091871. Đã được chứng minh rằng việc bổ sung các glycoprotein hyaluronidaza hòa tan này (hoặc dưới dạng dược phẩm hỗn hợp hoặc bằng cách đồng sử dụng) tạo thuận tiện cho quá trình đưa dược chất chữa bệnh vào lớp dưới da. Bằng cách nhanh chóng khử polyme hóa hyaluronan HA trong khoảng ngoại bào sHASEGP làm giảm độ nhớt của khoảng kẽ, nhờ đó làm tăng độ dẫn thủy lực và cho phép các thể tích lớn hơn được đưa vào mô dưới da một cách an toàn và tiện lợi. Độ dẫn thủy lực cao được tạo ra bởi sHASEGP thông qua độ nhớt giảm tạo ra độ phân tán lớn hơn nhiều, có khả năng làm tăng tính sinh khả dụng nội hấp của dược chất chữa bệnh sử dụng SC.

Các dược phẩm ổn định, nồng độ cao theo sáng chế chứa glycoprotein hyaluronidaza hòa tan nên đặc biệt thích hợp để tiêm dưới da. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ rằng dược phẩm đó chứa kháng thể kháng CD20 và glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể được cung cấp để sử dụng dưới dạng một dược phẩm hỗn hợp đơn hoặc theo cách khác dưới dạng hai dược phẩm riêng biệt mà có thể được trộn ngay trước khi tiêm dưới da. Theo cách khác kháng thể kháng CD20 và glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể được sử dụng dưới dạng các lần tiêm riêng biệt tại các điểm khác nhau của cơ thể, tốt hơn là tại các điểm liên sát nhau. Cũng có thể tiêm các tác nhân chữa bệnh có mặt trong dược phẩm theo sáng chế bằng các lần tiêm liên tiếp, ví dụ trước tiên tiêm glycoprotein hyaluronidaza hòa tan tiếp theo là tiêm dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20. Các lần tiêm đó cũng có thể được tiến hành theo thứ tự đảo ngược, nghĩa là trước tiên tiêm dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 tiếp

theo là tiêm glycoprotein hyaluronidaza hòa tan. Trong trường hợp kháng thể kháng CD20 và glycoprotein hyaluronidaza hòa tan được sử dụng bằng cách tiêm riêng rẽ, một hoặc cả hai protein phải được cung cấp với chất đệm, (các) chất làm ổn định và chất hoạt động bề mặt không ion với các nồng độ như nêu trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo nhưng ngoại trừ enzym hyaluronidaza. Sau đó enzym hyaluronidaza có thể được cung cấp, ví dụ trong chất đệm L-histidin/HCl với độ pH khoảng 6,5, 100 đến 150mM NaCl và 0,01 đến 0,1% (khối lượng/thể tích) polysorbate 20 hoặc polysorbate 80. Theo một phương án ưu tiên, kháng thể kháng CD20 được cung cấp với chất đệm, (các) chất làm ổn định và chất hoạt động bề mặt không ion với các nồng độ như nêu trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Như nêu trên, glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể được coi như là một tá dược khác trong dược phẩm kháng CD20. Glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể được thêm vào dược phẩm kháng CD20 vào thời điểm bào chế dược phẩm kháng CD20 hoặc có thể được thêm ngay trước khi tiêm. Theo cách khác, glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể được cung cấp dưới dạng dược phẩm tiêm riêng biệt. Đối với trường hợp sau cùng này glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể được cung cấp trong lọ riêng biệt hoặc dưới dạng đông khô cần phải hoàn nguyên với các chất pha loãng thích hợp trước khi tiến hành tiêm dưới da, hoặc có thể được cung cấp dưới dạng dược phẩm lỏng bởi nhà sản xuất. Dược phẩm kháng CD20 và glycoprotein hyaluronidaza hòa tan có thể được tạo ra dưới dạng các đối tượng riêng biệt hoặc có thể còn được cung cấp dưới dạng các kit chứa cả các thành phần thuốc tiêm và các hướng dẫn thích hợp cho đường dùng dưới da. Các hướng dẫn thích hợp để hoàn nguyên và/hoặc sử dụng một hoặc cả hai dược phẩm cũng có thể được cung cấp.

Vì vậy sáng chế cũng đề xuất các dược phẩm bao gồm dược phẩm ổn định, chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao dược dụng hoặc hỗn hợp của kháng

thể này và một lượng thích hợp của ít nhất một enzym hyaluronidaza dưới dạng kit chứa cả các thành phần thuốc tiêm và các hướng dẫn thích hợp để sử dụng chúng dưới da.

Khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất các dụng cụ tiêm chứa dược phẩm ổn định, nồng độ cao theo sáng chế. Dược phẩm này có thể còn chứa kháng thể kháng CD20 được dụng hoặc hỗn hợp của các phân tử kháng thể này và các tá dược thích hợp như nêu dưới đây và có thể còn chứa glycoprotein hyaluronidaza hòa tan hoặc dưới dạng dược phẩm hỗn hợp hoặc dưới dạng dược phẩm riêng biệt để cùng sử dụng.

Các kháng thể kháng CD20 khác nhau là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tốt hơn, nếu các kháng thể này là các kháng thể đơn dòng. Chúng hoặc có thể còn được gọi là các kháng thể khảm, các kháng thể được nhân tính hóa hoặc các kháng thể của người hoàn toàn. Chúng hoặc là các kháng thể kháng CD20 có chiều dài đầy đủ; các đoạn kháng thể kháng CD20 có cùng hoạt tính sinh học; chứa các biến thể trình tự axit amin và/hoặc các biến thể glycosyl hóa của các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể này. Ví dụ về các kháng thể kháng CD20 được nhân tính hóa đã được biết dưới các tên INN Rituximab, Ocrelizumab và Afutuzumab (HuMab<CD20>). Kháng thể kháng CD20 chữa bệnh thành công nhất là Rituximab được bán bởi Genentech Inc. và F. Hoffmann-La Roche Ltd dưới tên thương mại MABTHERA™ hoặc RITUXAN™.

Tốt hơn là kháng thể kháng CD20 như được xác định ở đây được chọn từ nhóm gồm có Rituximab (xem: ví dụ, patent Mỹ số 7,381,560 và EP2000149B1 của Anderson et al., xem, ví dụ, các hình vẽ 4 và 5), Ocrelizumab (như được bộc lộ trong WO 2004/056312) và WO 2006/084264 (ví dụ các thể biến dị thể hiện trên các bảng 1 và 2), tốt hơn là thể biến dị v.16 hoặc v.114 hoặc v.511 và Afutuzumab (HuMab<CD20>; xem WO2005/044859). Kháng thể kháng CD20 được ưu tiên nhất là Rituximab. Các thuật ngữ “Rituximab”, “Ocrelizumab” và

“Afutuzumab” (HuMab<CD20>) bao gồm tất cả các kháng thể kháng CD20 tương ứng đáp ứng đầy đủ các yêu cầu cần thiết để đạt được quyền thương mại hóa như một sản phẩm giống hoặc tương tự sinh học ở quốc gia hoặc khu vực được chọn từ nhóm gồm có các nước bao gồm Mỹ, châu Âu và Nhật. Rituximab có các vùng CDR được xác định trong patent Mỹ số 7,381,560 và EP2000149B1.

Số lượng glycoprotein hyaluronidaza hòa tan là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để xác định thêm chức năng, cơ chế hoạt động và các đặc tính của các glycoprotein hyaluronidaza hòa tan này, các thông tin cơ sở dưới đây được cung cấp.

Cơ chất kẽ SC (dưới da) chứa mạng lưới của các protein dạng sợi được bao trong gel nhớt đàn hồi của các glycosaminoglycan. Hyaluronan (HA), disacarit mạch thẳng lặp lại không sulfat hóa, là glycosaminoglycan chủ yếu của mô SC. HA được tiết xuất vào kẽ bằng các nguyên bào sợi với phân tử lượng cao, polyme megadalton nhớt sau đó bị thoái biến cục bộ, trong bạch huyết, và trong gan, nhờ tác động của các hyaluronidaza thể sinh tan và các exoglycosidaza. Khoảng 50% hyaluronan trong cơ thể được tạo ra bởi mô SC, trong đó nó được phát hiện với khoảng 0,8 mg/gm trọng lượng mô ướt (Aukland K. and Reed R., “Interstitial-Lymphatic Mechanisms in the control of Extracellular Fluid Volume”, *Physiology Reviews*, 1993; 73:1-78). Dự đoán rằng người trưởng thành nặng trung bình 70 kg chứa 15g HA, trong đó 30 phần trăm chuyển hóa mỗi ngày (tổng hợp và thoái biến) (Laurent L.B., et al., “Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, lymph nodes and liver”, *Exp. Physiol.* 1991; 76: 695-703). Như thành phần chính của thành phần tương tự gel của cơ chất dưới da, HA góp phần đáng kể vào độ nhớt của nó.

Các glycosaminoglycan (GAGs) là các polysacarit phức hệ mạch thẳng của cơ chất ngoại bào (ECM). Các GAG được đặc trưng bởi các cấu trúc

disacarit lặp lại của hexosamin được thế tại N và axit uronic (đối với trường hợp là hyaluronan (HA), chondroitin sulfat (CS), chondroitin (C), dermatan sulfat (DS), heparan sulfat (HS), và heparin (H)), hoặc galactosa (đối với trường hợp là keratan sulfat (KS)). Ngoài trừ HA, thì tất cả đều có liên kết cộng hóa trị với các protein nhân. Các GAG với các protein nhân của chúng về mặt cấu trúc được gọi là các proteoglycan (PGs).

Hyaluronan (HA) được thấy ở động vật có vú chủ yếu trong các mô liên kết, da, sụn, và trong hoạt dịch. Hyaluronan cũng là thành phần chính của thủy tinh mắt. Trong mô liên kết, nước của quá trình hydrat hóa kết hợp với hyaluronan tạo ra các cơ chất hydrat hóa giữa các mô. Hyaluronan đóng vai trò quan trọng trong hiện tượng sinh học liên quan đến tính vận động tế bào bao gồm phát triển nhanh, tái sinh, hồi phục, phát sinh phôi, phát triển phôi sinh học, làm lành vết thương, hình thành mạch, và hình thành khối u (Toole, Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (ed), Plenum Press, New York, 1991; pp. 1384-1386; Bertrand et al., Int. J. Cancer 1992; 52:1-6; Knudson et al., FASEB J. 1993; 7:1233-1241). Ngoài ra, các lượng hyaluronan liên quan đến tính xâm lấn khối u (Ozello et al., Cancer Res. 1960; 20:600-604; Takeuchi et al., Cancer Res. 1976; 36:2133-2139; Kimata et al., Cancer Res. 1983; 43:1347-1354).

HA được thấy trong cơ chất ngoại bào của nhiều tế bào, đặc biệt ở các mô liên kết mềm. HA được ấn định các chức năng sinh lý học khác nhau, như nội cân bằng protein trong nước và trong huyết tương (Laurent T.C. et al., FASEB J., 1992; 6: 2397-2404). Quá trình hình thành HA làm gia tăng các tế bào tăng sinh và có thể đóng vai trò trong sự gián phân. Nó còn liên quan đến sự vận động và di trú tế bào. HA dường như đóng các vai trò quan trọng trong quá trình điều chỉnh, phát triển, và biệt hóa tế bào (Laurent et al., supra).

HA được sử dụng rộng rãi trong y học lâm sàng. Các tính chất lưu biến và bảo vệ mô của nó được chứng minh có tác dụng trong phẫu thuật mắt (ví dụ để

bảo vệ nội mô giác mạc trong quá trình phẫu thuật bệnh đục thủy tinh thể). HA trong huyết thanh được dùng để chẩn đoán bệnh gan và các tình trạng viêm nhiễm khác nhau, như viêm khớp dạng thấp. Chứng phù nề do sự tích tụ HA gây ra có thể làm rối loạn chức năng của nhiều cơ quan khác nhau (Laurent et al., supra).

Các sự tương tác hyaluronan protein cũng liên quan đến cấu trúc của cơ chất ngoại bào hoặc “chất nền”.

Các hyaluronidaza là nhóm các enzym có hoạt tính axit hoặc trung tính được tìm thấy trong toàn bộ giới động vật. Các hyaluronidaza thay đổi liên quan đến tính đặc hiệu nền, và cơ chế hoạt động (công bố đơn quốc tế WO 2004/078140). Có ba loại hyaluronidaza chung: 1. Các hyaluronidaza điển hình của động vật có vú (EC 3.2.1.35) là các endo-beta-N-axetylhexosaminidaza với các tetrasacarit và hexasacarit là các sản phẩm cuối chính. Chúng có cả hoạt tính thủy phân và transglycosidaza, và có thể làm thoái biến hyaluronan và các chondroitin sulfat (CS), thường là C4-S và C6-S. 2. Các hyaluronidaza vi khuẩn (EC 4.2.99,1) làm thoái biến hyaluronan và CS và DS tới các mức độ khác nhau. Chúng là các endo-beta-N-axetylhexosaminidaza mà có thể hoạt động bởi phản ứng loại beta để tạo ra các sản phẩm cuối chủ yếu là disacarit. 3. Các hyaluronidaza (EC 3.2.1.36) từ địa, các vật ký sinh ăn bám khác, và các loại giáp xác là các endo-beta-glucuronidaza mà tạo ra các sản phẩm cuối tetrasacarit và hexasacarit nhờ thủy phân liên kết beta 1-3.

Các hyaluronidaza của động vật có vú có thể còn được chia thành hai nhóm: các enzym có hoạt tính axit và trung tính. Có sáu gen tương tự hyaluronidaza trong hệ gen người, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 và PH20/SPAM1. HYALP1 là gen giả, và HYAL3 không thể hiện có hoạt tính enzym đối với bất kỳ chất nền đã biết nào. HYAL4 là chondroitinaza và có hoạt tính không đáng kể đối với hyaluronan. HYAL1 là enzym có hoạt tính

axit nguyên mẫu và PH20 là enzym có hoạt tính trung tính nguyên mẫu. Các hyaluronidaza có hoạt tính axit, như HYAL1 và HYAL2 thường không có hoạt tính xúc tác ở độ pH trung tính (tức là pH = 7). Ví dụ HYAL1 có hoạt tính xúc tác in vitro không mạnh ở độ pH = 4,5 (Frost I.G. and Stern, R., "A microtiter-based assay for hyaluronidaza activity not requiring specialized reagents", *Anal. Biochemistry*, 1997; 251:263-269). HYAL2 là enzym có hoạt tính axit với hoạt tính đặc hiệu in vitro rất thấp.

Các enzym tương tự hyaluronidaza cũng có thể được đặc trưng bởi các loại thường ăn khớp với màng sinh chất qua neo glycosylphosphatidyl inositol như HYAL2 và PH20 người (Danilkovitch-Miagkova et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2003; 100(8):4580-4585; Phelps et al., *Science* 1988; 240(4860): 1780-1782), và các loại thường hòa tan như HYAL1 người (Frost, I.G. et al., "Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidaza", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 236(1):10-15). Tuy nhiên, có các biến đổi từ loài đến loài: chẳng hạn PH20 bò gắn kết rất lỏng lẻo với màng sinh chất và không dính bám qua neo nhạy phospholipaza (Lalancette et al., *Biol. Reprod.*, 2001; 65(2):628-36). Điểm đặc trưng duy nhất này của hyaluronidaza bò cho phép sử dụng enzym hyaluronidaza tinh hoàn bò hòa tan làm chất chiết cho sử dụng lâm sàng (Wydase™, Hyalase™). Loài PH20 khác là các enzym dính bám lipid mà thường không tan trừ khi sử dụng các chất tẩy hoặc các lipaza. Ví dụ PH20 người được neo vào màng sinh chất qua neo GPI. Các cố gắng để tạo ra các cấu trúc ADN PH20 người mà sẽ không đưa neo lipid vào polypeptit tạo ra enzym không có hoạt tính xúc tác, hoặc enzym không hòa tan (Arming et al., *Eur. J. Biochem.*, 1997; 247(3):810-4). Hyaluronidaza tinh trùng có trong tự nhiên được thấy ở cả hai dạng liên kết màng và hòa tan. Trong khi dạng liên kết màng 64 kDa có hoạt tính enzym ở độ pH = 7,0, dạng 54 kDa chỉ có hoạt tính ở pH = 4,0 (Cherr et al., *Dev. Biol.*, 1996; 10; 175(1): 142-53). Vì vậy, các dạng tan của PH20 thường không có hoạt tính enzym dưới các điều kiện trung tính.

Như nêu trên và theo các chỉ dẫn trong WO2006/091871 và patent Mỹ số 7,767,429 thì các lượng nhỏ của các glycoprotein hyaluronidaza hòa tan (sHASEGPs) có thể được đưa vào dược phẩm để tạo thuận tiện cho việc đưa thuốc chữa bệnh vào lớp dưới da. Bằng cách khử polyme hóa nhanh HA trong khoang ngoại bào sHASEGP làm giảm độ nhớt của kẽ, nhờ đó làm tăng độ dẫn thủy lực và cho phép lượng lớn hơn có thể được cung cấp một cách an toàn và tiện lợi vào mô SC. Độ dẫn thủy lực tăng là do sHASEGP tạo ra thông qua độ nhớt kẽ giảm làm cho độ phân tán lớn hơn nhiều, có khả năng làm tăng tính sinh khả dụng nội hấp của thuốc chữa bệnh được sử dụng qua SC.

Khi được tiêm ở lớp dưới da, quá trình khử polyme hóa HA bằng sHASEGP được khoan vùng ở vị trí tiêm trong mô SC. Bằng chứng thử nghiệm chứng tỏ rằng sHASEGP bị bất hoạt khu trú trong khoảng kẽ với thời gian bán tồn từ 13 đến 20 phút ở chuột, mà không có sự hấp thụ nội hấp được phát hiện trong máu sau một liều tiêm trong tĩnh mạch ở chuột CD-1. Trong ngăn mạch, sHASEGP thể hiện thời gian bán tồn lần lượt là 2,3 và 5 phút ở chuột và khỉ *Cynomolgus* tương ứng với các liều tới 0,5mg/kg. Độ thanh thải nhanh của sHASEGP, kết hợp với quá trình tổng hợp liên tục của chất HA trong mô, làm tăng độ thâm hoạt động khu trú và tạm thời đối với các phân tử cùng tiêm khác, các hiệu quả của chúng đảo ngược hoàn toàn trong 24 đến 48 giờ sau khi sử dụng (Bywaters G.L., et al., "Reconstitution of the dermal barrier to dye spread after Hyaluronidaza injection", Br. Med. J., 1951; 2 (4741): 1178-1183).

Ngoài các tác động của nó đối với sự phân tán dịch cục bộ thì sHASEGP còn có tác dụng như chất tăng cường hấp thụ. Các đại phân tử lớn hơn 16 kilodalton (kDa) bị loại trừ khỏi việc hấp thụ mức độ cao thông qua các mao dẫn bằng phân tán và hầu hết được hấp thụ qua các hạch bạch huyết dẫn. Vì vậy đại phân tử sử dụng dưới da như kháng thể chữa bệnh chẳng hạn (phân tử lượng khoảng 150 kDa) phải vượt qua cơ chất kẽ trước khi đi đến được các mạch bạch

huyết dẫn cho quá trình hấp thụ tiếp theo vào ngăn mạch. Bằng cách làm tăng sự phân tán khu trú, sHASEGP làm tăng tốc độ hấp thụ (K_a) của nhiều đại phân tử. Điều này dẫn đến các lượng trong máu tăng cao nhất (C_{max}) và có khả năng làm tăng tính sinh khả dụng so với cách sử dụng SC khi không có sHASEGP (Bookbinder L.H., et al., “A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics”, J. Control. Release 2006; 114: 230-241).

Các sản phẩm hyaluronidaza có nguồn gốc động vật đã được sử dụng lâm sàng hơn 60 năm, trước tiên để tăng độ phân tán và hấp thụ của các dược chất cùng sử dụng khác và đối với truyền dịch dưới da (tiêm/truyền dịch SC với thể tích lớn) (Frost G.I., “Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration”, Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4: 427-440). Các chi tiết về cơ chế hoạt động của các hyaluronidaza đã được mô tả chi tiết trong các công bố dưới đây: Duran-Reynolds F., “A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action”, CR Soc Biol Paris, 1938; 69-81; Chain E., “A mucolytic enzyme in testes extracts”, Nature 1939; 977-978; Weissmann B., “The transglycosylative action of testicular hyaluronidaza”, J. Biol. Chem., 1955; 216: 783-94; Tammi, R., Saamanen, A.M., Maibach, H.I., Tammi M., “Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture”, J. Invest. Dermatol. 1991; 97:126-130; Laurent, U.B.G., Dahl, L.B., Reed, R.K., “Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver”, Exp. Physiol. 1991; 76: 695-703; Laurent, T.C. and Fraser, J.R.E., “Degradation of Bioactive Substances: Physiology and Pathophysiology”, Henriksen, J.H. (Ed) CRC Press, Boca Raton, FL; 1991. pp. 249-265; Harris, E.N., et al., “Endocytic function, glycosaminoglycan specificity, and antibody sensitivity of the recombinant human 190-kDa hyaluronan receptor for endocytosis (HARE)”, J. Biol. Chem. 2004; 279:36201-36209; Frost, G.I., “Recombinant human

hyaluronidaza (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration”, Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4: 427-440. Các sản phẩm hyaluronidaza được chuẩn y ở các nước châu Âu chứa Hylase® “Dessau” và Hyalase®. Các sản phẩm hyaluronidaza có nguồn gốc động vật được chuẩn y ở Mỹ chứa Vitrase™, Hydase™, và Amphadase™.

Độ an toàn và hiệu quả của các sản phẩm hyaluronidaza đã được chứng minh rộng rãi. Rủi ro về độ an toàn đáng kể nhất được biết đến là tính quá mẫn và/hoặc tính gây dị ứng, nó được cho là có liên quan đến sự thiếu hụt độ tinh khiết của các dược phẩm thu được từ động vật (Frost, G.I., “Recombinant human hyaluronidaza (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration”, Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4 : 427-440). Cần lưu ý rằng có các khác biệt về các liều đã được chấp thuận của các hyaluronidaza thu được từ động vật giữa Anh, Đức và Mỹ. Ở Anh, liều thông thường khi làm chất phụ trợ để tiêm dưới da hoặc trong cơ là 1500 đơn vị, được bổ sung trực tiếp vào thuốc tiêm. Ở Mỹ, liều thông thường sử dụng cho mục đích này là 150 đơn vị. Khi truyền dịch dưới da, hyaluronidaza được sử dụng để hỗ trợ đường dùng dưới da với thể tích chất lỏng tương đối lớn. Ở Anh, 1500 đơn vị hyaluronidaza thường được đưa vào với mỗi 500 đến 1000 ml dung dịch để sử dụng dưới da. Ở Mỹ, 150 đơn vị được cho là phù hợp cho mỗi lít dung dịch truyền dưới da. Ở Đức, 150 đến 300 đơn vị được cho là thỏa đáng cho mục đích này. Ở Anh, việc khuếch tán để gây mê cục bộ được gia tốc bằng cách bổ sung 1500 đơn vị. Ở Đức và Mỹ 150 đơn vị được cho là phù hợp với mục đích này. Mặc dù có các khác biệt về liều (liều ở Anh nhiều hơn gấp mười lần ở Mỹ), nhưng không có các khác biệt rõ ràng nào về các mức độ an toàn của các sản phẩm hyaluronidaza có nguồn gốc động vật bán trên thị trường ở Mỹ và Anh lần lượt, được báo cáo.

Vào 2 tháng 12, 2005, Halozyne Therapeutics Inc. đã nhận được sự chấp thuận của FDA về dược phẩm có thể tiêm chứa hyaluronidaza của người tái tổ hợp, rHuPH20 (HYLENEX™). FDA phê chuẩn HYLENEX™ với liều bằng 150 đơn vị để sử dụng dưới da theo các chỉ dẫn dưới đây:

- làm chất phụ trợ để tăng sự hấp thụ và phân tán của các thuốc tiêm khác
- để truyền dịch dưới da
- làm chất phụ trợ để chụp tia x đường niệu SC nhằm cải thiện sự tái hấp thụ của các tác nhân chặn bức xạ.

Như là một phần của tài liệu tổng quan về các quy định pháp lý, nó quy định rằng rHuPH20 có các đặc tính tăng cường sự phân tán và hấp thụ tương tự với các thuốc tiêm khác như các dược phẩm hyaluronidaza có nguồn gốc động vật đã được chấp thuận trước đó, nhưng với mức độ an toàn cao. Đặc biệt, việc sử dụng hyaluronidaza của người tái tổ hợp (rHuPH20) so với các hyaluronidaza có nguồn gốc động vật giảm thiểu nguy cơ lây nhiễm các tác nhân gây bệnh từ động vật và các bệnh não dạng xốp có thể truyền nhiễm.

Các hyaluronidaza glycoprotein hòa tan (sHASEGP), quy trình để tạo ra chúng và việc sử dụng chúng trong các dược phẩm được mô tả trong WO 2004/078140.

Quá trình thử nghiệm chi tiết như nêu thêm dưới đây chứng tỏ rằng các dược phẩm yêu cầu bảo hộ có tính ổn định khi bảo quản tốt đáng ngạc nhiên và đáp ứng hoàn toàn tất cả các yêu cầu cần thiết để được chấp thuận bởi các chuyên gia y tế.

Enzym hyaluronidaza trong các dược phẩm theo sáng chế được cho là tăng cường khả năng cấp kháng thể kháng CD20 tới quá trình tuần hoàn nội hấp, ví dụ bằng cách tăng sự hấp thụ hoạt chất (nó hoạt động như chất tăng cường

thâm thấu). Enzym hyaluronidaza còn được cho là làm gia tăng khả năng cấp kháng thể kháng CD20 chữa bệnh vào quá trình tuần hoàn nội hấp bằng cách sử dụng dưới da nhờ quá trình thủy phân nghịch đảo hyaluronan, thành phần ngoại bào của mô kẽ SC. Việc thủy phân hyaluronan ở lớp dưới da tạm thời mở ra các rãnh trong khoảng kẽ của mô SC và nhờ đó tăng cường khả năng cấp kháng thể kháng CD20 chữa bệnh vào quá trình tuần hoàn nội hấp. Ngoài ra, đường dùng thể hiện giảm sự đau đớn ở người và sự phòng rộp của mô SC có thể tích nhỏ hơn.

Hyaluronidaza, khi dùng khu trú thì hiệu quả của nó hoàn toàn cục bộ. Nói cách khác hyaluronidaza bất hoạt và chuyển hóa cục bộ trong nhiều phút và không nhận thấy các hiệu quả nội hấp hoặc kéo dài. Quá trình làm mất hoạt tính nhanh của hyaluronidaza trong nhiều phút khi nó đi vào dòng máu cản trở khả năng thực để tiến hành các nghiên cứu phân bố sinh học có thể so sánh được giữa các sản phẩm hyaluronidaza khác nhau. Đặc tính này cũng giảm thiểu bất kỳ lo lắng tiềm tàng nào về độ an toàn nội hấp do sản phẩm hyaluronidaza không thể hoạt động tại các vị trí xa.

Đặc điểm thống nhất của các tất cả các enzym hyaluronidaza theo sáng chế là khả năng dễ khử polyme hóa hyaluronan của nó, bất kể các khác biệt về cấu trúc hóa học, nguồn gốc loài, về nguồn gốc mô, hoặc về các mẹ sản phẩm thuốc có nguồn gốc từ loài và mô giống nhau. Chúng bất thường ở chỗ hoạt tính của chúng là giống nhau (ngoại trừ về hiệu lực) mặc dù có các cấu trúc khác nhau.

Enzym hyaluronidaza theo được phẩm của sáng chế đặc trưng bởi không có tác dụng xấu đối với tính toàn vẹn phân tử của kháng thể kháng CD20 trong được phẩm ổn định được mô tả ở đây. Ngoài ra, enzym hyaluronidaza chỉ làm thay đổi việc cấp kháng thể kháng CD20 tới quá trình tuần hoàn nội hấp mà không có đặc tính bất kỳ nào có thể tạo ra hoặc góp phần vào các hiệu quả chữa

bệnh của kháng thể kháng CD20 đã hấp thụ nội hấp. Enzym hyaluronidaza không có tính sinh khả dụng nội hấp và không có tác dụng xấu tới tính toàn vẹn phân tử của kháng thể kháng CD20 trong các điều kiện bảo quản được khuyến cáo cho dược phẩm ổn định theo sáng chế. Vì vậy nó được coi là một tá dược trong dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 theo sáng chế này. Khi nó được sử dụng mà không có tác dụng chữa bệnh thì nó thể hiện là một thành phần của dạng dược phẩm ngoại trừ kháng thể kháng CD20 có hoạt tính chữa bệnh.

Một số các enzym hyaluronidaza thích hợp theo sáng chế là đã biết trong tình trạng kỹ thuật. Enzym được ưu tiên là enzym hyaluronidaza của người, tốt nhất là enzym đã biết như rHuPH20. rHuPH20 là thành viên của họ gồm các β -1,4 glycosyl hydrolaza có hoạt tính axit và trung tính khử polyme hóa hyaluronan bằng cách thủy phân liên kết β -1,4 giữa vị trí C₁ của N-acetyl glucosamin và vị trí C₄ của axit glucuronic. Hyaluronan là polysaccharit được tìm thấy trong chất nền nội bào của mô liên kết, như mô kẽ dưới da, và của một số mô chuyên hóa, như dây rốn và dịch thủy tinh. Việc thủy phân hyaluronan làm giảm tạm thời độ nhớt của mô kẽ và thúc đẩy sự phân tán của các dịch tiêm hoặc của các chất rỉ ra hoặc các dịch dò rỉ cục bộ, vì vậy làm tăng sự hấp thụ của chúng. Hiệu quả của hyaluronidaza là cục bộ và nghịch đảo với sự hoàn nguyên hoàn toàn của hyaluronan trong mô xuất hiện trong 24 đến 48 giờ (Frost, G.I., "Recombinant human hyaluronidaza (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4:427-440). Sự gia tăng độ thấm của mô liên kết nhờ thủy phân hyaluronan liên quan đến hiệu quả của hyaluronidaza về khả năng của chúng để làm tăng độ phân tán và hấp thụ của các phân tử đồng sử dụng.

Hệ gen người chứa một vài gen hyaluronidaza. Chỉ sản phẩm gen PH20 có hoạt tính hyaluronidaza hữu hiệu trong các điều kiện sinh lý ngoại bào và có

tác dụng như tác nhân lan truyền, trong khi các hyaluronidaza hoạt tính axit không có đặc tính này.

rHuPH20 là enzym hyaluronidaza đầu tiên và duy nhất có thể được sử dụng để chữa bệnh. Hệ gen người chứa một vài gen hyaluronidaza; chỉ sản phẩm gen PH20 có hoạt tính hyaluronidaza hữu hiệu dưới điều kiện sinh lý ngoại bào và có tác dụng như tác nhân lan truyền. PH20 protein người có trong tự nhiên có neo lipid gắn vào axit amin đầu tận cùng carboxy mà neo nó vào màng sinh chất. Enzym rHuPH20 được phát hiện bởi Halozyme là thể biến dị đoạn khuyết được làm cùn đầu không có các axit amin này ở đầu tận cùng carboxy tạo ra gắn kết lipid. Điều này làm cho enzym có hoạt tính pH trung tính, hòa tan tương tự với protein được thấy trong các dược phẩm tinh hoàn bò. rHuPH20 protein được tổng hợp bằng peptit tín hiệu 35 axit amin mà bị loại bỏ khỏi đầu tận cùng N trong quá trình tiết xuất. rHuPH20 protein trưởng thành chứa trình tự axit amin đầu tận cùng N tiến hoá thẳng từ trình tự được thấy trong một số dược phẩm hyaluronidaza bò.

Các PH20 hyaluronidaza, chứa PH20 có nguồn gốc động vật và rHuPH20 người tái tổ hợp, khử polyme hóa hyaluronan bằng cách thủy phân liên kết β -1,4 giữa vị trí C₁ của N-acetyl glucosamin và vị trí C₄ của axit glucuronic. Tetrasacarit là sản phẩm phân cắt nhỏ nhất (Weissmann, B., "The transglycosylative action of testicular hyaluronidaza", J. Biol. Chem., 1955; 216: 783-94). Cấu trúc N-acetyl glucosamin/axit glucuronic này được thấy trong các glycan liên kết tại N của các sản phẩm sinh học tái tổ hợp và vì vậy rHuPH20 sẽ không tác động đến quá trình glycosyl hóa của các kháng thể được bào chế với, ví dụ Rituximab chẳng hạn. Bản thân enzym rHuPH20 có sáu glycan liên kết tại N trên phân tử với các cấu trúc nhân tương tự với loại được thấy trong các kháng thể đơn dòng. Như được dự đoán, các cấu trúc liên kết tại N này không thay đổi theo thời gian, khẳng định sự thiếu hụt hoạt tính enzym của rHuPH20

đối với các cấu trúc glycan liên kết tại N. Thời gian bán tồn ngắn của rHuPH20 và quá trình tổng hợp ổn định hyaluronan dẫn đến tác động ngắn và cục bộ của enzym đối với các mô.

Tốt hơn nếu enzym hyaluronidaza là tá dược trong dược phẩm sử dụng dưới da theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp ADN. Theo cách này để đảm bảo rằng luôn thu được protein tương tự (trình tự axit amin đồng nhất) và tránh được phản ứng dị ứng do các protein bị lẫn gây ra khi cùng được tinh chế trong quá trình chiết từ mô. Tốt hơn nếu enzym hyaluronidaza sử dụng trong dược phẩm như được minh họa ở đây là enzym người, tốt nhất là rHuPH20.

Trình tự axit amin của rHuPH20 (HYLENEX™) là đã biết rõ và có thể sử dụng dưới số hiệu lưu giữ CAS số 75971-58-7. Phân tử lượng khoảng 61 kDa (xem thêm patent Mỹ số 7,767,429).

Nhiều so sánh cấu trúc và chức năng đã được tiến hành giữa các hyaluronidaza động vật có vú nguồn gốc tự nhiên và các dòng vô tính PH-20 ADN bổ trợ lấy từ người và động vật có vú. Gen PH-20 là gen được sử dụng cho sản phẩm tái tổ hợp rHuPH20; tuy nhiên sản phẩm thuốc tái tổ hợp là biến thể 447 axit amin được làm cùn đầu của protein đầy đủ được mã hóa bởi gen PH-20. Các tính tương tự về cấu trúc đối với các trình tự axit amin ít khi vượt quá 60% ở bất kỳ so sánh nào. Các so sánh chức năng thể hiện rằng hoạt tính của rHuPH20 là rất giống với hoạt tính của các sản phẩm hyaluronidaza đã được chấp thuận trước đó. Thông tin này là phù hợp với các phát hiện lâm sàng trong 50 năm qua bất kể nguồn gốc của hyaluronidaza, độ an toàn và hiệu quả lâm sàng của các đơn vị hyaluronidaza là tương đương.

Việc sử dụng rHuPH20 trong dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 SC theo sáng chế cho phép sử dụng lượng sản phẩm thuốc cao hơn và tăng cường

hữu hiệu độ hấp thụ kháng thể CD20 sử dụng dưới da, tốt hơn là Rituximab vào quá trình nội hấp.

Nồng độ mol đồng thẩm áp của dược phẩm ổn định theo sáng chế là 330 ± 50 mOsm/kg.

Dược phẩm ổn định theo sáng chế về cơ bản không chứa các hạt có thể nhìn thấy được (kiểm tra bằng mắt người). Các hạt dưới mức có thể nhìn thấy (như được xác định bằng cách che khuất ánh sáng) sẽ đáp ứng hoàn toàn các tiêu chuẩn sau:

- số lượng hạt tối đa $\geq 10\mu\text{m}$ trên lọ -> 6000

- số lượng hạt tối đa $\geq 25\mu\text{m}$ trên lọ -> 600

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng dược phẩm để bào chế thuốc hữu dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn có thể điều trị được bằng kháng thể kháng CD20, như tốt hơn là bệnh ung thư hoặc bệnh không ác tính ở đối tượng chứa cung cấp dược phẩm mô tả ở đây cho đối tượng với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn đã nêu. Tốt hơn là kháng thể kháng CD20 có thể được sử dụng đồng thời hoặc kế tiếp với tác nhân hóa liệu pháp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn mà có thể điều trị được bằng kháng thể kháng CD20 (ví dụ bệnh ung thư (được ưu tiên) hoặc bệnh không ác tính) ở đối tượng chứa cung cấp dược phẩm mô tả ở đây cho đối tượng với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn đã nêu. Bệnh ung thư hoặc bệnh không ác tính sẽ thường liên quan đến các tế bào biểu hiện CD20, sao cho kháng thể CD20 trong dược phẩm chữa bệnh SC theo sáng chế có thể gắn kết với các tế bào nhiễm bệnh. Tốt hơn nếu bệnh ung thư là bệnh ung thư biểu hiện CD20. Tốt hơn nếu bệnh không ác tính mà có thể được điều trị bằng dược phẩm theo sáng chế là bệnh tự miễn dịch như được

xác định ở đây. Tốt hơn là kháng thể kháng CD20 có thể được cùng sử dụng đồng thời hoặc kế tiếp với tác nhân hóa liệu pháp.

Quá trình bổ sung hyaluronidaza vào dược phẩm cho phép gia tăng thể tích thuốc tiêm có thể sử dụng dưới da một cách an toàn và tiện lợi. Thể tích thuốc tiêm được ưu tiên là từ 1 đến 15 ml. Nhận thấy rằng cách sử dụng dược phẩm theo sáng chế làm gia tăng độ phân tán, hấp thụ và tính sinh khả dụng của kháng thể chữa bệnh. Các phân tử lớn (tức là > 16 kDa) mà được sử dụng qua đường SC được hấp thụ tốt hơn vào ngăn mạch thông qua các dịch bạch huyết dẫn lưu (Supersaxo, A., et al., "Effect of Molecular Weight on the Lymphatic Absorption of Water-Soluble Compounds Following Subcutaneous Administration", 1990; 2:167-169; Swartz, M. A., "Advanced Drug Delivery Review, The physiology of the lymphatic system", 2001; 50: 3-20). Vì vậy tốc độ đưa các phân tử lớn này vào quá trình nội hấp chậm so với truyền trong tĩnh mạch, cho nên có khả năng lớn làm cho tần số/cường độ của các phản ứng liên quan đến việc truyền giảm.

Quá trình bào chế dược phẩm chứa kháng thể CD20 sử dụng dưới da (tốt hơn là Rituximab) theo sáng chế cần đến nồng độ kháng thể cao (khoảng 120 mg/ml) ở bước tinh chế cuối cùng của quá trình bào chế. Cho nên bước xử lý khác (siêu lọc/lọc kép) được đưa vào quá trình bào chế kháng thể CD20, tốt hơn là Rituximab. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao, ổn định theo sáng chế cũng có thể được cung cấp dưới dạng dược phẩm protein ổn định có thể hoàn nguyên với chất pha loãng thích hợp để tạo ra dược phẩm hoàn nguyên chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao.

Tốt hơn là dược phẩm chứa kháng thể CD20 SC theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh ung thư, tốt hơn là bệnh ung thư biểu hiện CD20.

Thuật ngữ “khoảng” như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế dùng để chỉ trị số cụ thể được đề xuất có thể thay đổi tới một mức độ nhất định, ví dụ, có nghĩa là các trị số nằm trong giới hạn $\pm 10\%$, tốt hơn là $\pm 5\%$, tốt nhất là $\pm 2\%$ nằm trong giá trị đã cho.

Ngoài các thử nghiệm nêu trên, các thử nghiệm in vivo khác nhau có thể được sử dụng bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, có thể cho các tế bào trong cơ thể của bệnh nhân tiếp xúc với kháng thể mà có thể được đánh dấu tùy ý bằng chất đồng vị đánh dấu có thể phát hiện được, ví dụ chất đồng vị phóng xạ, và gắn kết kháng thể với các tế bào ở bệnh nhân có thể được đánh giá, ví dụ bằng cách quét bên ngoài về độ phóng xạ hoặc bằng cách phân tích sinh thiết lấy ở bệnh nhân trước khi tiếp xúc với kháng thể.

Đã dự tính rằng được phẩm chứa kháng thể CD20 SC theo sáng chế này có thể cũng được sử dụng để điều trị các bệnh hoặc các rối loạn không ác tính khác nhau, như, chứa bệnh tự miễn dịch như được xác định ở đây: bệnh lạc nội mạc tử cung; bệnh xơ cứng bì; tái phát hẹp van tim; các polyp như polyp ruột kết, các polyp mũi hoặc các polyp dạ dày-ruột; u tuyến xơ; bệnh hô hấp; viêm túi mật; bệnh u xơ thần kinh; bệnh thận đa u nang; các bệnh viêm; các rối loạn da chứa bệnh vẩy nến và chứng viêm da; bệnh mạch; các tình trạng bệnh liên quan đến quá trình tăng sinh bất thường của các tế bào biểu mô mạch; bệnh loét dạ dày-ruột; bệnh Menetrier, bệnh u tuyến tiết hoặc hội chứng mất protein; các rối loạn thận; các rối loạn tạo mạch; bệnh mắt như bệnh thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi, hội chứng nấm Histoplasma mắt giả định, bệnh hình thành mạch mới võng mạc xuất phát từ bệnh võng mạc tăng sinh do tiểu đường, tạo mạch võng mạc, bệnh võng mạc do tiểu đường, hoặc bệnh thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi; các bệnh lý liên quan đến xương như bệnh viêm xương khớp, bệnh còi xương và chứng loãng xương; tổn thương sau tác động thiếu máu cục bộ não; các bệnh hóa xơ hoặc phù như bệnh cơ gan, chứng xơ hóa phổi, bệnh

sacoid, bệnh viêm tuyến giáp, hội chứng tăng độ nhót hệ thống, bệnh Osier Weber-Rendu, bệnh tắc phổi mãn tính, hoặc chứng phù sau bong, chấn thương, bức xạ, đột quỵ, chứng giảm oxy huyết hoặc chứng thiếu máu cục bộ; phản ứng nhạy quá mức của da; bệnh vồng mạc do tiểu đường và bệnh thận do tiểu đường; hội chứng Guillain-Barre; bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ hoặc thải bỏ mảnh ghép; bệnh Paget; viêm xương hoặc khớp; lão hóa sớm (ví dụ do bức xạ tử ngoại da người gây ra); chứng phì đại tuyến tiền liệt lành tính; một số lây nhiễm vi khuẩn kể cả các tác nhân gây bệnh vi khuẩn được chọn từ adenovirut, hantavirut, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia* spp. và chứng ho gà *Bordetella*; cục đông do kết tụ tiểu cầu gây ra; các bệnh sinh sản như bệnh lạc nội mạc tử cung, hội chứng tăng kích thích buồng trứng, tiền sản giật, chảy máu tử cung do rối loạn chức năng, hoặc đa kinh kéo dài; viêm màng hoạt dịch; bệnh vữa động mạch; bệnh thận cấp tính và mãn tính (chứa viêm thận tiểu cầu tăng sinh và bệnh thận do tiểu đường gây ra); bệnh chàm bội nhiễm; hình thành sẹo phì đại; sốc do nội độc tố và lây nhiễm nấm; bệnh polip đa u tuyến di truyền; các bệnh thoái hóa thần kinh (bệnh Alzheimer; sa sút trí tuệ liên quan đến AIDS, bệnh Parkinson, xơ cứng cột bên teo cơ, bệnh vồng mạch đui mù, bệnh teo cơ xương sống và thoái hóa tiểu não); các hội chứng loạn sản tử; thiếu máu không tái tạo; tổn thương do thiếu máu cục bộ; chứng xơ hóa phổi, thận hoặc gan, bệnh tăng nhạy do tế bào T gây ra; chứng hẹp môn vị phình trướng ở trẻ em; hội chứng tắc nghẽn đường tiết niệu; chứng viêm khớp vẩy nến; và viêm tuyến giáp Hashimoto. Các chỉ định điều trị đối với bệnh không ác tính được ưu tiên là như được xác định ở đây.

Nếu chỉ định là bệnh ung thư, bệnh nhân có thể được điều trị bằng tổ hợp của dược phẩm kháng thể, và tác nhân hóa liệu pháp. Việc sử dụng kết hợp chứa cùng sử dụng hoặc sử dụng đồng thời, sử dụng các dược phẩm riêng biệt hoặc dược phẩm đơn, và sử dụng liên tiếp theo thứ tự bất kỳ, trong đó tốt hơn là có khoảng thời gian khi cả hai (hoặc tất cả) hoạt chất đồng thời tạo ra các hoạt tính

sinh học của chúng. Vì vậy, tác nhân hóa liệu pháp có thể được cung cấp trước, hoặc sau khi sử dụng dược phẩm kháng thể theo sáng chế. Theo phương án này, tốt hơn nếu việc định thời giữa ít nhất một lần sử dụng tác nhân hóa liệu pháp và ít nhất một lần sử dụng dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế là khoảng 1 tháng hoặc ít hơn, và tốt nhất là khoảng 2 tuần hoặc ít hơn. Theo cách khác, tác nhân hóa liệu pháp và dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế được cho bệnh nhân sử dụng đồng thời dưới dạng dược phẩm đơn hoặc các dược phẩm riêng biệt.

Cách điều trị bằng dược phẩm chứa kháng thể này sẽ cải thiện các dấu hiệu hoặc các triệu chứng của bệnh ung thư hoặc bệnh. Ví dụ, nếu bệnh cần được điều trị là bệnh ung thư, liệu pháp này có thể làm tăng sự sống sót (sự sống sót toàn diện và/hoặc sống sót mà bệnh không tiến triển) và/hoặc có thể tạo ra đáp ứng lâm sàng khách quan (một phần hoặc hoàn toàn). Ngoài ra, cách điều trị bằng tổ hợp của tác nhân hóa liệu pháp và dược phẩm kháng thể có thể tạo ra lợi ích điều trị, hiệp đồng hoặc lớn hơn nhiều cho bệnh nhân.

Tốt hơn nếu kháng thể trong dược phẩm được dùng là kháng thể trần. Tuy nhiên, kháng thể được dùng có thể được kết hợp với tác nhân gây độc tế bào. Tốt hơn là thể tiếp hợp miễn dịch và/hoặc kháng nguyên mà nó được gắn kết với được đồng hóa bằng tế bào, làm tăng hiệu quả điều trị của thể tiếp hợp miễn dịch khi giết tế bào ung thư gắn kết với nó. Theo một phương án ưu tiên, tác nhân gây độc tế bào nhằm vào hoặc gây cản trở axit nucleic trong tế bào ung thư. Ví dụ về các tác nhân gây độc tế bào này chứa các maytansinoid, các calioheamixin, các ribonucleaza và endonucleaza ADN. Các thể tiếp hợp miễn dịch được ưu tiên là các thể tiếp hợp miễn dịch Rituximab-maytansinoid (T-DM1) tương tự với Trastuzumab-DM1 (T-DM1) như được mô tả trong WO 2003/037992, tốt hơn nữa là thể tiếp hợp miễn dịch T-MCC-DM1.

Để sử dụng dưới da, dược phẩm có thể được cung cấp bằng một thiết bị thích hợp, như (nhưng không giới hạn ở), bơm tiêm; thiết bị tiêm (ví dụ thiết bị INJECT-EASE™ và GENJECT™); bơm truyền (ví dụ như Accu-Chek™); bút kim phun (như GENPEN™; thiết bị không kim (ví dụ MEDDECTOR™ và BIOJECTOR™); hoặc qua hệ phân phối dưới da bằng miếng dán.

Lượng dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 đã nêu để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, và việc xác định thời gian sử dụng sẽ tùy thuộc vào loại (loại, giống, độ tuổi, trọng lượng, v.v..) và tình trạng của bệnh nhân cần điều trị và mức độ nghiêm trọng và bệnh cần điều trị. Cũng quan trọng để xác định liều thích hợp là tiến trình bệnh, dù kháng thể được sử dụng cho các mục đích phòng ngừa hay điều trị, tùy thuộc vào liệu pháp đã dùng trước đó, lịch sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng của họ với kháng thể. Việc xác định liều cuối cùng là tùy thuộc vào sự suy xét của bác sĩ điều trị. Kháng thể được sử dụng một cách thích hợp cho bệnh nhân một lần hoặc trong các đợt điều trị. Tùy thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1µg/kg đến 50mg/kg (ví dụ 0,1-20mg/kg) kháng thể kháng CD20 là liều sử dụng ban đầu đề xuất cho bệnh nhân.

Liều kháng thể kháng CD20 đã nêu được ưu tiên sẽ nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 10mg/kg trọng lượng cơ thể. Vì vậy một hoặc nhiều liều khoảng 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 4,0mg/kg, 10mg/kg hoặc 30mg/kg (hoặc kết hợp bất kỳ của chúng) có thể được cung cấp cho bệnh nhân. Tùy thuộc vào loại (loại, giống, độ tuổi, trọng lượng, v.v..) và tình trạng của bệnh nhân cần điều trị và tùy thuộc vào loại kháng thể kháng CD20, liều của kháng thể kháng CD20 thứ nhất có thể khác với liều của kháng thể kháng CD20 thứ hai. Các liều này có thể được sử dụng hàng ngày hoặc không liên tục, ví dụ ba đến 6 ngày một lần hoặc thậm chí một đến ba tuần một lần. Liều sử dụng ban đầu cao hơn, tiếp theo là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được sử dụng. Dựa vào các thử nghiệm lâm sàng (xem các Ví dụ 3 và 4 về ví dụ minh họa không giới hạn cho rituximab), liều

lượng được ưu tiên nằm trong khoảng từ 300mg/m² đến 900mg/m². Được ưu tiên hơn nếu giới hạn liều được ưu tiên của kháng thể kháng CD20 là khoảng 375mg/m² đến khoảng 800mg/m². Các liều ưu tiên đặc biệt của kháng thể kháng CD20 này là các liều nằm trong khoảng 375mg/m², khoảng 625mg/m² và khoảng 800mg/m². Ngoài ra, được ưu tiên là các liều cố định của kháng thể kháng CD20 đã nêu.

Theo một phương án, các liều lượng cố định đối với u bạch huyết tế bào B, tốt hơn nếu u bạch huyết không phải thể Hodgkin, là như sau. Ưu tiên là khoảng 1200 mg đến khoảng 1800 mg kháng thể kháng CD20 trên một liều. Ưu tiên hơn nữa là các liều được chọn từ nhóm vào khoảng 1300mg, khoảng 1500mg, khoảng 1600mg và khoảng 1700mg kháng thể kháng CD20 đã nêu trên một liều. Ưu tiên nhất, nếu liều cố định đối với các bệnh nhân có u bạch huyết tế bào B, tốt hơn là các bệnh nhân có u bạch huyết không phải thể Hodgkin, là khoảng 1400mg kháng thể kháng CD20 đã nêu (ví dụ Rituximab) trên một liều mà có thể được sử dụng theo các liệu trình khác nhau chứa khoảng 2 tháng một lần (chứa khoảng 8 tuần một lần), khoảng 3 tháng một lần (chứa khoảng 12 tuần một lần), trong khoảng 2 năm (hoặc nhiều hơn), v.v.. (cũng xem các Ví dụ 3 và 4 về ví dụ minh họa không giới hạn cho rituximab).

Theo một phương án khác, các liều cố định đối với các bệnh nhân bị bệnh bạch cầu, tốt hơn là các bệnh nhân bị bệnh bạch cầu tế bào bạch huyết mãn tính (CLL), là như sau. Ưu tiên là khoảng 1600mg đến khoảng 2200mg kháng thể kháng CD20 đã nêu trên một liều. Ưu tiên hơn nữa là các liều được chọn từ nhóm bao gồm các liều khoảng 1700 mg, khoảng 1800mg, khoảng 1900mg, và khoảng 2100mg kháng thể kháng CD20 đã nêu trên một liều. Theo một phương án, liều cố định đối với các bệnh nhân bị bệnh bạch cầu, tốt hơn là các bệnh nhân CLL, là khoảng 1870mg kháng thể kháng CD20 đã nêu (ví dụ Rituximab) trên một liều.

Theo một phương án khác nữa, các liều cố định đối với các bệnh nhân bị bệnh tự miễn dịch, như bệnh thấp khớp, đa xơ cứng, viêm thận luput, bệnh tiểu đường, ITP, và bệnh viêm mạch là như sau. Ưu tiên là khoảng 1200mg đến khoảng 2200mg kháng thể kháng CD20 đã nêu trên một liều, ví dụ khoảng 1500mg kháng thể kháng CD20 đã nêu (ví dụ Rituximab) trên một liều.

Nếu tác nhân hóa liệu pháp được sử dụng, mà nó thường được sử dụng với các liều đã biết, hoặc tùy ý giảm xuống do tác động kết hợp của các dược chất hoặc các tác dụng phụ không tốt do sử dụng tác nhân hóa liệu pháp. Quá trình điều chế và định liều cho các tác nhân hóa liệu pháp này có thể được sử dụng theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất hoặc như được xác định theo kinh nghiệm của thầy thuốc. Quá trình điều chế và định liều cho liệu pháp hóa học này cũng được mô tả trong Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

Tốt hơn là dược phẩm ổn định chứa kháng thể kháng CD20 được dùng theo sáng chế được tiêm dưới da, trong đó tốt hơn là sử dụng lặp lại vài lần trong các khoảng thời gian là 3 tuần (q3w). Tốt nhất là dung tích đầy đủ của dung dịch tiêm được sử dụng trong khoảng thời gian 1 đến 10 phút, tốt hơn là 2 đến 6 phút, tốt nhất là 3 ± 1 phút. Tốt nhất là sử dụng trong 2 ml/phút, tức là khoảng 240mg/phút. Đối với nhiều bệnh nhân nếu không có các tác nhân hóa liệu pháp khác được sử dụng trong tĩnh mạch (IV) thì cách sử dụng dưới da này làm cho bệnh nhân có thể dễ dàng tự sử dụng tại nhà hơn. Điều này giúp cho việc tuân thủ chế độ điều trị cao và giảm/loại bỏ các chi phí để sử dụng IV (tức là, các chi phí điều dưỡng để sử dụng IV, tiền thuê giường, chi phí cho bệnh nhân đi lại...). Cách sử dụng dưới da theo sáng chế sẽ rất có khả năng liên quan đến tần số và/hoặc cường độ giảm của các phản ứng gắn liền với việc truyền.

Theo một phương án ưu tiên, dược phẩm được sử dụng để ngăn ngừa hoặc làm giảm sự di căn hoặc sự lan truyền thêm ở bệnh nhân bị bệnh ung thư

biểu hiện CD20 này. Dược phẩm được sử dụng để làm tăng thời gian sống của bệnh nhân này, làm tăng tiến trình sống sót mà bệnh không tiến triển của bệnh nhân này, làm tăng khoảng thời gian đáp ứng, tạo ra sự cải thiện có ý nghĩa về mặt lâm sàng và đáng kể theo thống kê ở bệnh nhân được điều trị như được xác định bằng khoảng thời gian sống mà bệnh không tiến triển, tỷ lệ đáp ứng hoặc khoảng thời gian đáp ứng. Theo một phương án ưu tiên, dược phẩm được sử dụng để làm tăng tỷ lệ đáp ứng ở nhóm bệnh nhân.

Trong phạm vi của sáng chế này, một hoặc nhiều chất ức chế sinh trưởng khác, các tác nhân chống ung thư, gây độc tế bào, hóa liệu pháp, chống tạo mạch, chất chống ung thư hoặc (các) xytokin, hoặc các hợp chất nâng cao hiệu quả của các tác nhân này có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20 bằng kháng thể kháng CD20. Tốt hơn là việc điều trị bằng kháng thể kháng CD20 được sử dụng mà không có các tác nhân chống ung thư, gây độc tế bào, hóa liệu pháp khác này, hoặc các hợp chất nâng cao hiệu quả của các tác nhân này.

Các tác nhân này chứa, ví dụ: các tác nhân alkyl hóa hoặc các tác nhân có tác dụng alkyl hóa như xyclophosphamit (CTX; ví dụ xytoxan®), clorambuxil (CHL; ví dụ leukeran®), cisplatin (CisP; ví dụ platinol®) busulfan (ví dụ myleran®), melphalan, carmustin (BCNU), streptozotixin, trietylenmelamin (TEM), mitomycin C, và các loại tương tự; các chất chống chuyển hóa, như metotrexat (MTX), etoposid (VP16; ví dụ vepesid®), 6-mercaptopurin (6MP), 6-thioguanin (6TG), cytarabin (Ara-C), 5-flouraxil (5-FU), capecitabin (ví dụ Xeloda®), dacarbazin (DTIC), và các loại tương tự; các chất kháng sinh, như actinomycin D, doxorubicin (DXR; ví dụ adriamycin®), daunorubicin (daunomycin), bleomycin, mithramycin và các loại tương tự; các alkaloid, như các vinca alkaloid như vincristin (VCR), vinblastin, và các loại tương tự; và các tác nhân chống u khác, như paclitaxel (ví dụ taxol®) và các dẫn xuất paclitaxel,

các tác nhân kìm hãm tế bào, các glucocorticoid như dexamethason (DEX; ví dụ decadron®) và các corticosteroid như prednison, các chất ức chế nucleosit enzym như hydroxyure, các enzyme làm kiệt axit amin như asparaginas, leucovorin và các dẫn xuất axit folic khác, và các tác nhân chống u khác, tương tự. Các tác nhân dưới đây cũng có thể được sử dụng làm các tác nhân khác: arnifostin (ví dụ ethylol®), dactinomycin, meclorethamin (hơi cay nitow), streptozoxin, cyclophosphamid, lomustin (CCNU), doxorubicin lipo (ví dụ doxil®), gemcitabin (ví dụ gemzar®), daunorubicin lipo (ví dụ daunoxome®), procarbazine, mitomycin, docetaxel (ví dụ taxotere®), aldesleukin, carboplatin, oxaliplatin, cladribine, camptothecin, CPT 11 (irinotecan), 10-hydroxy 7-ethyl-camptothecin (SN38), floxuridin, fludarabin, ifosfamid, idarubicin, mesna, interferon beta, interferon alpha, mitoxantron, topotecan, leuprolid, megestrol, melphalan, mercaptopurin, plicamycin, mitotan, pegaspargase, pentostatin, pipobroman, plicamycin, tamoxifen, teniposide, testolactone, thioguanin, thiotepa, uracil mù tạt, vinorelbine, clorambucil. Tốt hơn là việc điều trị bằng kháng thể kháng CD20 được sử dụng mà không có các tác nhân khác này.

Việc sử dụng các tác nhân gây độc tế bào và chống ung thư được mô tả ở trên cũng như được chất chống ung thư đặc hiệu đích chống tăng sinh giống như các chất ức chế protein kinase trong chế độ điều trị bằng hóa liệu pháp thường sẽ được mô tả rõ trong các lĩnh vực điều trị bệnh ung thư, và việc sử dụng chúng ở đây cũng được cân nhắc để theo dõi sự dung nạp và hiệu quả và để kiểm soát đường dùng và liều sử dụng, với một số điều chỉnh. Ví dụ, liều thực tế của các tác nhân gây độc tế bào có thể thay đổi tùy thuộc vào đáp ứng của tế bào đã nuôi cấy của bệnh nhân được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp nuôi cấy mô. Nói chung, liều lượng sẽ giảm so với lượng sử dụng không có các tác nhân bổ sung khác.

Các liều lượng thông thường của tác nhân gây độc tế bào hữu hiệu có thể nằm trong các giới hạn được khuyến cáo của nhà sản xuất, và trong đó được biểu thị bằng các đáp ứng in vitro hoặc các đáp ứng trong các loại động vật, có thể giảm đến một bậc về nồng độ hoặc lượng. Vì vậy, liều thực tế sẽ phụ thuộc vào quyết định của thầy thuốc, tình trạng bệnh nhân, và hiệu quả của phương pháp điều trị dựa vào đáp ứng in vitro của các tế bào ác tính đã nuôi cấy ban đầu hoặc mẫu mô nuôi cấy mô, hoặc các đáp ứng được thấy ở các loại động vật thích hợp.

Trong phạm vi của sáng chế này, một lượng bức xạ ion hóa hữu hiệu có thể được tiến hành và/hoặc thuốc có phóng xạ có thể được sử dụng cùng với việc điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20 bằng kháng thể kháng CD20. Nguồn bức xạ có thể hoặc để dùng bên ngoài hoặc bên trong cho bệnh nhân cần điều trị. Nếu nguồn để dùng bên ngoài cho bệnh nhân thì liệu pháp được biết là liệu pháp chiếu xạ chùm bên ngoài (EBRT). Nếu nguồn bức xạ để dùng bên trong cho bệnh nhân thì việc điều trị được gọi là liệu pháp tia phóng xạ để gần (BT). Các nguyên tử phóng xạ để sử dụng trong phạm vi của sáng chế này có thể được chọn từ nhóm chứa, nhưng không chỉ giới hạn ở, radi, xesi-137, iridi-192, amerixi-241, vàng-198, coban-57, đồng-67, tecneti-99, iot-123, iot-131, và indi-111. Cũng có thể đánh dấu kháng thể bằng các chất đồng vị phóng xạ này. Tốt hơn là việc điều trị bằng kháng thể kháng CD20 được sử dụng mà không có bức xạ ion hóa này.

Liệu pháp chiếu xạ là điều trị chuẩn để không chế các khối u không thể cắt bỏ hoặc không mô được và/hoặc các khối u di căn. Các kết quả cải thiện đã được thấy nếu liệu pháp chiếu xạ được kết hợp với hóa trị liệu. Liệu pháp chiếu xạ dựa vào nguyên lý là lượng phóng xạ cao được cung cấp tới vùng đích sẽ làm chết các tế bào có khả năng sinh sản ở cả các mô u và mô bình thường. Chế độ liều phóng xạ thường được xác định có liên quan đến liều hấp thụ bức xạ (Gy),

thời gian và phân đoạn, và phải được xác định cẩn thận bởi bác sỹ chuyên khoa ung thư. Lượng bức xạ mà bệnh nhân tiếp nhận sẽ phụ thuộc vào nhiều vấn đề khác nhau, nhưng hai vấn đề quan trọng nhất là vị trí khối u so với các cấu trúc hoặc các cơ quan quan trọng của cơ thể, và mức độ mà khối u đã lan toả. Tiến trình điều trị thông thường đối với bệnh nhân đang trải qua liệu pháp chiếu xạ sẽ là một liệu trình điều trị trong khoảng 1 đến 6 tuần, với liều tổng nằm trong khoảng 10 và 80 Gy được cung cấp cho bệnh nhân với lượng mỗi ngày là khoảng 1,8 đến 2,0 Gy, 5 ngày một tuần. Theo một phương án ưu tiên của sáng chế này, sẽ có tính hiệp đồng nếu các khối u ở bệnh nhân được điều trị bằng liệu pháp điều trị kết hợp của sáng chế và phóng xạ. Nói cách khác, việc ức chế sự phát triển của khối u bằng các chế phẩm chứa được phẩm chứa kháng thể CD20 theo sáng chế được gia tăng khi được điều trị kết hợp với phóng xạ, tùy ý với các tác nhân chống ung thư hoặc hoá trị liệu khác. Các thông số về các liệu pháp phóng xạ phụ trợ, ví dụ có trong WO 99/60023.

Các chế độ điều trị khác có thể được kết hợp với kháng thể chứa, nhưng không chỉ giới hạn ở (các) tác nhân hóa trị liệu thứ hai (ba, bốn, v.v..) (nói theo cách khác là “dung dịch thuốc hỗn hợp” của các tác nhân hóa trị liệu khác nhau); kháng thể đơn dòng khác; chất ức chế sinh trưởng; tác nhân gây độc tế bào; tác nhân hóa trị liệu; tác nhân chống tạo mạch; và/hoặc xytokin, v.v..; hoặc hỗn hợp thích hợp bất kỳ của chúng.

Ngoài các chế độ điều trị nêu trên, bệnh nhân có thể được loại bỏ các tế bào ung thư bằng cách phẫu thuật và/hoặc liệu pháp chiếu xạ.

Theo một phương án khác của sáng chế, vật dụng được đề xuất chứa được phẩm theo sáng chế và cung cấp các hướng dẫn để sử dụng nó. Vật dụng này chứa một hộp. Các hộp thích hợp chứa, ví dụ, chai, lọ (ví dụ các lọ hai hoặc đa ngăn), bơm tiêm (như các bơm tiêm hai hoặc đa ngăn) và các ống thử nghiệm. Hộp có thể được tạo ra từ nhiều loại nguyên liệu như thủy tinh hoặc chất dẻo.

Hộp chứa dược phẩm và gắn nhãn trên nó, hoặc kết hợp với, hộp có thể chỉ ra các hướng dẫn để sử dụng. Hộp chứa dược phẩm có thể là lọ đa dụng, nó có tính đến việc sử dụng lặp lại (ví dụ từ 2 đến 6 lần dùng) chế phẩm hoàn nguyên. Vật dụng có thể còn chứa các chất khác mong muốn theo quan điểm sử dụng và thương mại, chứa các chất đệm khác, các chất pha loãng, các bộ lọc, kim, bơm tiêm, và bao gói gắn với các hướng dẫn sử dụng.

Tốt hơn là kháng thể được bào chế theo sáng chế hầu như là tinh khiết và hầu như mong muốn là đồng nhất (tức là không chứa các protein nhiễm tạp, v.v.. trong đó enzym hyaluronidaza trong dược phẩm theo sáng chế này không được gọi là protein nhiễm tạp của kháng thể đơn dòng kháng CD20 theo sáng chế).

Sáng chế sẽ được hiểu đầy đủ hơn bằng cách tham chiếu tới các Ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, chúng sẽ không được coi là làm hạn chế phạm vi của sáng chế. Tất cả các tài liệu và các patent viện được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các dược phẩm chứa kháng CD20 để sử dụng dưới da theo sáng chế được tạo ra dựa vào các kết quả thử nghiệm như được nêu dưới đây nhờ sử dụng các phương pháp và các thử nghiệm phân tích và điều chế chung như được thể hiện dưới đây.

Ví dụ 1: Bào chế các dược phẩm dạng lỏng nồng độ cao

Rituximab được bào chế bằng các kỹ thuật tân công đã biết từ quá trình tạo ra các protein tái tổ hợp. Dòng tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc được tạo ra bằng cách di truyền (CHO) như được mô tả trong EP-B-2000149 được khuếch đại trong dịch nuôi cấy tế bào từ ngân hàng tế bào gốc. Kháng thể đơn dòng Rituximab được thu hoạch từ dịch nuôi cấy tế bào này và được làm sạch bằng sắc ký sử dụng phép sắc ký ái lực cố định Protein A, phép sắc ký trao

đổi ion, lọc để loại bỏ các nhiễm tạp virus, tiếp theo sắc ký trao đổi anion và siêu lọc/lọc thẩm tách..

rHuPH20 được điều chế bằng các kỹ thuật tân công là đã biết từ quá trình tạo ra các protein tái tổ hợp. Quy trình này bắt đầu bằng cách làm tan băng các tế bào từ ngân hàng tế bào hoạt động (WCB) hoặc từ ngân hàng tế bào gốc (MCB) và tăng thể tích nhờ dịch nuôi cấy tế bào trong hàng loạt bình quay. Dịch nuôi cấy tế bào dung tích tới 6 lít được dùng để tạo ra nguồn tế bào liên tục được duy trì dưới áp suất chọn lọc bằng metotrexat. Khi đã tăng thể tích tới khoảng 36 lít, dịch nuôi cấy được chuyển vào bình phản ứng sinh học dung tích 400 lít để thể tích mẻ cuối cùng khoảng 300 lít. Bình phản ứng sinh học sản xuất được thao tác theo kiểu cấp theo mẻ, không lựa chọn áp suất, và thời gian của giai đoạn sản xuất khoảng hai tuần. rHuPH20 được dùng vào dịch nuôi cấy. Bình phản ứng sinh học dung tích 1000 lít có thể cũng được sử dụng cho thể tích mẻ cuối cùng là 500 lít. Sau khi kết thúc giai đoạn sản xuất, dịch nuôi cấy tế bào thu được này được làm sạch bằng cách lọc, và sau đó được xử lý bằng dung môi/chất tẩy để làm bất hoạt các virus. Tiếp đó, protein được làm sạch bằng một loạt gồm bốn quy trình sắc ký cột để loại bỏ các tạp chất của quy trình và sản phẩm. Bước lọc virus được tiến hành, và sau đó khối đã lọc được cô, bào chế đưa vào chất đệm cuối cùng: 10mg/mL rHuPH20 trong dung dịch chứa 20mM chất đệm L-histidin/HCl, độ pH=6,5, 130mM NaCl, 0,05% (khối lượng/thể tích) polysorbate 80. Lượng rHuPH20 được bảo quản ở nhiệt độ dưới -70°C.

Các tá dược khác của dược phẩm theo sáng chế được sử dụng rộng rãi trong thực tế và được biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Vì vậy, không cần phải giải thích chi tiết chúng.

Các dược phẩm là dược phẩm dạng lỏng để sử dụng dưới da theo sáng chế được bào chế như sau.

Để bảo chế các dược phẩm dạng lỏng, Rituximab được trao đổi chất đệm dựa vào chất đệm lọc kép là chế phẩm đệm đã được dự tính và, nếu cần cô bằng lọc thẩm tách tới nồng độ kháng thể khoảng 200mg/ml. Sau khi lọc xong, các tá dược (ví dụ, trehaloza, rHuPH20, chất hoạt động bề mặt) được bổ sung như các dung dịch gốc được bổ sung vào dung dịch chứa kháng thể. Cuối cùng, nồng độ protein được điều chỉnh bằng chất đệm tới nồng độ Rituximab khoảng 120mg/ml.

Tất cả các dược phẩm được lọc tiệt trùng qua các màng lọc gắn kết protein mức thấp có cỡ lỗ 0,22 μ m và được nạp đầy vô trùng vào các lọ nhỏ thủy tinh tiệt trùng dung tích 6ml bịt kín bằng nút cao su phủ ETFE (Copolyme của etylen và tetrafloetylen) và các nắp nhôm. Thể tích nạp đầy khoảng 3,0ml. Các dược phẩm này được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau (5°C, 25°C và 40°C) trong các khoảng thời gian khác nhau và nén bằng cách lắc (1 tuần với tần suất lắc 200 vòng phút ở nhiệt độ 5°C và 25°C) và các phương pháp stress làm đông lạnh - tan băng. Các mẫu được phân tích trước và sau khi áp dụng các thử nghiệm stress bằng các phương pháp, phân tích sau:

- 1) phép đo quang phổ UV;
- 2) phép sắc ký loại trừ kích thước (SEC);
- 3) phép sắc ký trao đổi ion (IEC);
- 4) phân tích độ đục của dung dịch;
- 5) phân tích các hạt nhìn thấy; và
- 6) phân tích hoạt tính rHuPH20.

Phổ UV, được sử dụng để xác định lượng protein, được thực hiện bằng phổ quang kế Perkin Elmer λ 35 UV với chiều dài bước sóng nằm trong khoảng

từ 240nm đến 400nm. Các mẫu protein tinh khiết được pha loãng tới khoảng 0,5mg/ml chế phẩm đậm tương ứng. Nồng độ protein được tính theo công thức 1.

$$\text{Công thức 1: Nồng độ protein} = \frac{A(280) - A(320) \times \text{dil. factor}}{\epsilon \left(\frac{\text{cm}^2}{\text{mg}} \right) \times d(\text{cm})}$$

Mức độ hấp thu ánh sáng UV ở 280nm được hiệu chỉnh theo mức độ tán xạ ánh sáng ở 320nm và nhân với hệ số pha loãng, nó được xác định từ các khối đã được cân và tỷ trọng của mẫu tinh khiết và chất đậm pha loãng. Tử số được chia cho kết quả của độ dài đường dẫn d của ống thủy tinh thử nghiệm và hệ số tắt ϵ .

Phép sắc ký loại trừ kích thước (SEC) được sử dụng để phát hiện loại phân tử lượng cao hòa tan (các khối kết tụ) và các sản phẩm thủy phân phân tử lượng thấp (LMW) trong các chế phẩm. Phương pháp sử dụng thiết bị HPLC thích hợp có gắn cảm biến UV (bước sóng phát hiện 280nm) và cột TosoHaas TSK G3000SWXL (7,8x300mm). Các khối kết tụ và các sản phẩm thủy phân, monome nguyên vẹn được tách bằng profin rửa giải đẳng thành phần pha động bằng cách sử dụng 0,2M di-kali hydro phosphat, 0,25 M kali clorua, độ pH= 7,0 với tốc độ chảy là 0,5ml/phút,

Phép sắc ký trao đổi ion (IEC) được thực hiện để phát hiện các sản phẩm thoái biến hóa học làm thay đổi điện tích thực của Rituximab trong các dược phẩm này. Nhằm mục đích này, Rituximab được cắt bằng Papain. Phương pháp sử dụng thiết bị HPLC thích hợp gắn bộ cảm biến UV (chiều dài bước sóng phát hiện là 280nm) và cột trao đổi cation phân tích Polymer Labs PL-SCX 1000A. 10mM MES, độ=pH 6,0 và 10mM MES, 0,2 M natri clorua, độ=pH 6,0, lần lượt được sử dụng làm các pha động A và B, với tốc độ dòng chảy là 1 ml/phút.

Để xác định độ đục, màu trắng sữa được đo bằng FTU (các đơn vị độ đục) bằng cách sử dụng đục kế HACH 2100AN ở nhiệt độ trong phòng.

Các mẫu được phân tích đối với các hạt nhìn thấy bằng cách sử dụng dụng cụ kiểm tra bằng mắt Seidenader V90-T.

Thử nghiệm enzym in vitro về rHuPH20 như hyaluronidaza được sử dụng làm thử nghiệm về hoạt tính. Thử nghiệm này dựa vào sự hình thành của chất kết tủa không hòa tan khi hyaluronan (natri hyaluronat) gắn kết với chất kết tủa cation. Hoạt tính enzym được đo bằng cách ủ rHuPH20 với chất nền hyaluronan và sau đó làm kết tủa hyaluronan không hấp thụ bằng anbumin huyết thanh axit hóa (huyết thanh ngựa). Độ đục được đo ở chiều dài bước sóng là 640 nm và mức giảm độ đục do hoạt tính enzym gây ra đối với chất nền hyaluronan là số đo hoạt tính enzym. Quy trình này được tiến hành bằng cách sử dụng đường cong chuẩn được tạo ra bởi các mức pha loãng của mẫu chuẩn thử nghiệm rHuPH20, và hoạt tính mẫu được đọc từ đường cong này.

Các kết quả của thử nghiệm về độ ổn định đối với các dược phẩm từ A đến J được nêu trong các bảng sau.

Các dược phẩm và dữ liệu về độ ổn định của các dược phẩm tiếp được chứa chất Rituximab dạng lỏng theo sáng chế

Dược phẩm A là dược phẩm lỏng với thành phần 120mg/ml Rituximab, 20mM L-histidin, 210mM trehalosa dihydrat, 10mM metionin, 0,06% polysorbate 80, 2.000 U/ml rHuPH20 ở độ= pH 5,5.

Nhiệt độ bảo quản/ điều kiện ứng suất	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion		Độ đục (FTU)	Các hạt nhìn thấy được	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Ban đầu	114	2,2	97,8	0,1	24	65	4,2	Không chứa các hạt	1970
Lắc 5°C	1 tuần	114	2,4	97,5	0,1	n.d.	n.d.	4,2	Không chứa các hạt	1760
Lắc 25°C	1 tuần	115	2,3	97,6	0,1	n.d.	n.d.	4,4	Không chứa các hạt	1676
Đông lạnh/ Làm tan băng	(5 chu trình)	114	2,4	97,5	0,1	n.d.	n.d.	4,4	Không chứa các hạt	2123
5°C	4 tuần	114	2,2	97,8	0,1	25	65	4,7	Không chứa các hạt	1979

25°C	13 tuần	114	2,1	97,8	0,1	26	62	4,6	Không chứa các hạt	2219
	26 tuần	114	2,1	97,8	0,2	25	63	4,4	Không chứa các hạt	2412
	4 tuần	114	2,0	97,9	0,1	25	64	4,7	Không chứa các hạt	1975
	13 tuần	n.d.	1,9	97,8	0,3	24	61	4,8	Không chứa các hạt	2215
	26 tuần	n.d.	1,9	97,6	0,5	22	60	4,3	Không chứa các hạt	2409
40°C	4 tuần	114	2,1	97,3	0,6	19	61	5,5	Không chứa các hạt	n.d.
	13 tuần	n.d.	3,2	91,4	5,4	13	55	8,1	Không chứa các hạt	n.d.

n.d. không xác định

Dược phẩm B là được phẩm lỏng với thành phần 120mg/ml Rituximab, 20mM L-histidin, 210mM trehaloza dihydrat, 10mM metionin, 0,06% polysorbate 80, 2.000 U/ml rHuPH20 ở độ pH= 6,1.

Nhiệt độ bảo quản/ điều kiện ứng suất	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước				HPLC trao đổi ion		Độ đục (FTU)	Các hạt nhìn thấy được	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)				
-	Ban đầu	117	2,3	97,7	0,1	25	63	7,1	Không chứa các hạt	2463	
Lắc 5°C	1 tuần	116	2,2	97,7	0,1	n.d.	n.d.	7,2	Không chứa các hạt	2288	
Lắc 25°C	1 tuần	118	2,1	97,8	0,1	n.d.	n.d.	6,9	Không chứa các hạt	2613	
Đông lạnh/ Làm tan băng 5°C	(5 chu trình)	116	2,3	97,7	0,1	n.d.	n.d.	6,6	Không chứa các hạt	2259	
	4 tuần	117	2,2	97,8	0,1	25	62	6,3	Không chứa các hạt	2485	
	13 tuần	114	2,3	97,6	0,1	25	62	6,3	Không chứa các hạt	2237	

	26 tuần	119	2,2	97,7	0,1	25	61	6,8	Không chứa các hạt	2344
25°C	4 tuần	n.d.	2,0	97,9	0,1	25	62	6,6	Không chứa các hạt	2179
	13 tuần	n.d.	2,1	97,7	0,2	24	61	6,3	Không chứa các hạt	2083
	26 tuần	n.d.	2,1	96,2	1,8	23	60	6,9	Không chứa các hạt	2397
	4 tuần	n.d.	2,2	96,1	1,7	21	59	8,6	Không chứa các hạt	n.d.
40°C	13 tuần	n.d.	3,3	92,2	4,5	14	53	21,0	Không chứa các hạt	n.d.

n.d. không xác định

Dược phẩm C là được phẩm lỏng với thành phần 120mg/ml Rituximab, 20mM L-histidin, 210mM trehaloza dihydrat, 10mM metionin, 0,06% polysorbate 80, 12.000 U/ml rHuPH20 ở độ pH= 5,5.

Nhiệt độ bảo quản/ điều kiện ứng suất	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước				HPLC trao đổi ion		Độ đục (FTU)	Các hạt nhìn thấy được	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)				
-	Ban đầu	126	1,7	98,3	0,0	27	58		4,4	Không chứa các hạt	11963
Lắc 5°C	1 tuần	127	1,6	98,3	0,0	n.d.	n.d.		4,0	Không chứa các hạt	12083
Lắc 25°C	1 tuần	127	1,6	98,4	0,1	n.d.	n.d.		4,5	Không chứa các hạt	11150
Đông lạnh/ Làm tan băng	(5 chu trình)	126	1,6	98,4	0,0	n.d.	n.d.		4,2	Không chứa các hạt	11869
5°C	7 tuần	124	1,5	98,5	0,0	26	62		5,0	Không chứa các hạt	12206
	19 tuần	120	1,5	98,5	0,1	26	62		4,1	Không chứa các hạt	11945

	26 tuần	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Không chứa các hạt	n.d.
25°C	7 tuần	n.d.	1,5	97,8	0,7	25	63	5,8	Không chứa các hạt	12259
	19 tuần	n.d.	1,5	97,3	1,2	24	61	4,8	Không chứa các hạt	13137
	26 tuần	n.d.	1,8	96,6	1,6	24	60	4,4	Không chứa các hạt	12948
	7 tuần	n.d.	2,5	94,6	2,9	18	60	10,2	Không chứa các hạt	n.d.
40°C	19 tuần	n.d.	3,7	89,8	6,5	12	55	20,0	Không chứa các hạt	n.d.

n.d. không xác định

Dược phẩm D là được phẩm lỏng với thành phần 120mg/ml Rituximab, 20mM axit axetic, 210mM trehaloza dihydrat, 10mM metionin, 0,06% polysorbate 20, 12.000 U/ml rHuPH20 ở độ pH= 5,5.

Nhiệt độ bảo quản/ điều kiện ứng suất	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion	Độ đục (FTU)	Các hạt nhìn thấy được	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HM W (%)	Monome (%)	LMW (%)				
-	Ban đầu	127	1,6	98,4	0,0	26	4,9	Không chứa các hạt	12619
Lắc 5°C	1 tuần	125	1,5	98,4	0,0	n.d.	4,3	Không chứa các hạt	12507
Lắc 25°C	1 tuần	123	1,5	98,4	0,1	n.d.	4,3	Không chứa các hạt	12923
Đông lạnh/ Làm tan băng	(5 chu trình)	124	1,5	98,4	0,0	n.d.	4,4	Không chứa các hạt	12394
5°C	7 tuần	125	1,5	98,4	0,0	26	5,0	Không chứa các hạt	10030
	19 tuần	123	1,5	98,5	0,1	26	4,7	Không chứa các hạt	15324

										các hạt	
	26 tuần	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Không chứa các hạt	n.d.
	7 tuần	n.d.	1,6	97,7	0,7	25	62	4,9	13099	Không chứa các hạt	13099
25°C	19 tuần	n.d.	1,6	97,2	1,2	24	61	5,1	13031	Không chứa các hạt	13031
	26 tuần	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Không chứa các hạt	n.d.
	7 tuần	n.d.	2,6	94,8	2,6	17	60	28,7	n.d.	Không chứa các hạt	n.d.
40°C	19 tuần	n.d.	3,6	90,5	6,0	9	56	51,9	n.d.	Không chứa các hạt	n.d.

n.d. không xác định	
---------------------	--

Dược phẩm E là được phẩm lỏng với thành phần 120mg/ml Rituximab, 20mM L-histidin, 210mM trehaloza dihydrat, 10mM metionin, 0,06% polysorbate 20, 12.000 U/ml rHuPH20 ở độ pH =5,5.

Nhiệt độ bảo quản/ điều kiện ứng suất	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion	Độ đục (FTU)	Các hạt nhìn thấy được	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HM W (%)	Monome (%)	LMW (%)				
-	Ban đầu	126	1,5	98,5	0,0	26	4,6	Không chứa các hạt	12231
Lắc 5°C	1 tuần	128	1,5	98,5	0,0	n.d.	4,4	Không chứa các hạt	12524
Lắc 25°C	1 tuần	127	1,5	98,5	0,1	n.d.	4,2	Không chứa các hạt	11438
Đông lạnh/ Làm tan băng	(5 chu trình)	127	1,5	98,5	0,0	n.d.	4,3	Không chứa các hạt	14440
5°C	7 tuần	125	1,5	98,5	0,0	26	4,7	Không chứa các hạt	12824
	19 tuần	125	1,5	98,5	0,1	26	4,5	Không chứa các hạt	13891

Dược phẩm F là được phẩm lỏng với thành phần 120mg/ml Rituximab, 20mM L-histidin, 120mM natri clorua, 10mM metionin, 0,02% polysorbate 80, 12.000 U/ml rHuPH20 ở độ pH =5,5.

Nhiệt độ bảo quản/ điều kiện ứng suất	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước				HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt nhìn thấy được	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HM W (%)	Mono me (%)	LMW (%)	các đoạn Fab NS a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)				
-	Ban đầu	124	1,6	98,3	0,0	3	26	62	28,7	Không chứa các hạt	12034	
Lắc 5°C	1 tuần	127	1,6	98,4	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	31,0	Không chứa các hạt	12083	
Lắc 25°C	1 tuần	125	2,4	97,5	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	31,1	Không chứa các hạt	11150	
Đông lạnh/ Làm tan bằng	(5 chu trình)	125	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	30,4	Không chứa các hạt	11869	
5°C	7 tuần	122	1,6	98,4	0,0	3	25	63	31,4	Không chứa các hạt	10368	
	19 tuần	118	1,5	98,4	0,1	3	26	62	31,8	Không chứa các hạt	11654	

Dược phẩm G là được phẩm lỏng với thành phần 120mg/ml Rituximab, 20mM axit xitric, 120mM natri clorua, 10mM metionin, 0,02% polysorbate 80, 12.000U/ml rHuPH20 ở độ pH= 6,5.

Nhiệt độ bảo quản/ điều kiện ứng suất	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt nhìn thấy được	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Mono me (%)	LMW (%)	các đoạn Fab NS a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Ban đầu	126	1,8	98,1	0,0	4	26	62	40,3	Không chứa các hạt	10808
Lắc 5°C	1 tuần	122	1,8	98,2	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	35,6	Không chứa các hạt	9324
Lắc 25°C	1 tuần	125	2,3	97,7	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	35,7	Không chứa các hạt	n.a.
Đông lạnh/ Làm tan bằng	(5 chu trình)	126	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	34,5	Không chứa các hạt	11270

5°C	7 tuần	124	1,8	98,2	0,0	3	24	63	38,5	Không chứa các hạt	12854
	19 tuần	118	1,7	98,2	0,1	3	26	62	37,6	Không chứa các hạt	11202
	26 tuần	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		Không chứa các hạt	n.d.
25°C	7 tuần	n.d.	1,9	97,4	0,7	2	24	63	40,2	Không chứa các hạt	11645
	19 tuần	n.d.	2,1	96,9	1,1	3	24	60	36,9	Không chứa các hạt	14233
	26 tuần	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		Không chứa các hạt	n.d.
40°C	7 tuần	n.d.	3,1	94,3	2,6	5	19	58	101,0	Không	n.d.

												chứa các hạt		
	19 tuần	n.d.	4,8	89,4	5,8	7	12	52	385,0	Không chứa các hạt	n.d.			

n.d. không xác định

Dược phẩm H là được phẩm lỏng với thành phần 120mg/ml Rituximab, 20mM axit xitric, 210mM trehaloza dihydrat, 10mM metionin, 0,06% polysorbate 80, 12.000U/ml rHuPH20 ở độ pH= 6,5.

Nhiệt độ bảo quản/ điều kiện ứng suất	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước				HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt nhìn thấy được	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	các đoạn Fab NS a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)				
-	Ban đầu	127	2,0	98,0	0,0	3	26	62	33,4	Không chứa các hạt	11951	
Lắc 5°C	1 tuần	128	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	30,3	Không chứa các hạt	10936	
Lắc 25°C	1 tuần	127	1,9	98,0	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	29,7	Không chứa các hạt	12595	
Đông lạnh/ Làm tan băng	(5 chu trình)	127	1,9	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	32,0	Không chứa các hạt	11442	
5°C	7 tuần	124	1,8	98,2	0,0	3	24	63	33,8	Không chứa các hạt	11723	
	19 tuần	122	1,7	98,2	0,1	3	26	62	30,8	Không chứa các hạt	12180	

Dược phẩm I là được phẩm lỏng với thành phần 120mg/ml Rituximab, 20mM L-histidin, 120mM natri clorua, 10mM metionin, 0,04% polysorbate 80, 12.000U/ml rHuPH20 ở độ pH =6,0.

Nhiệt độ bảo quản/ điều kiện ứng suất	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion			Độ đục (FTU)	Các hạt nhìn thấy được	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	các đoạn Fab NS a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	Ban đầu	123	1,7	98,3	0,0	3	25	62	34,0	Không chứa các hạt	11022
Lắc 5°C	1 tuần	125	1,6	98,3	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	33,3	Không chứa các hạt	12231
Lắc 25°C	1 tuần	124	1,7	98,3	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	32,1	Không chứa các hạt	8371
Đông lạnh/ Làm tan bằng	(5 chu trình)	123	1,8	98,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	32,9	Không chứa các hạt	12058
5°C	7 tuần	122	1,6	98,4	0,0	3	25	62	33,5	Không chứa các hạt	11108
	19 tuần	119	1,6	98,4	0,1	3	26	62	34,4	Không chứa các hạt	11548

Dược phẩm J là được phẩm lỏng với thành phần 25mg/ml GA101 (huMAB<CD20>), 20mM L-histidin, 240mM trehalosa dihydrat, 0,02% poloxamer 188, 2.000U/ml rHuPH20 ở độ pH= 6,0.

Nhiệt độ bảo quản/ điều kiện ứng suất	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion		Độ đục (FTU)	Các hạt nhìn thấy được	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	Vùng axit (%)	Đỉnh chính (%)			
-	Ban đầu	25,1	0,6	98,5	0,9	18,5	68,6	6,0	Không chứa các hạt	1833
-20°C	26 tuần	26,2	0,6	98,6	0,8	18,7	68,3	5,8	Không chứa các hạt	2078
5°C	26 tuần	25,7	0,7	98,4	0,9	19,1	67,9	5,6	Không chứa các hạt	1380
25°C	26 tuần	25,9	0,9	97,3	1,9	26,7	60,8	6,0	Không chứa các hạt	978
40°C	26 tuần	26,1	3,0	86,8	9,7	40,9	19,5	7,2	Hầu như không chứa các hạt	< giới hạn xác định số lượng

n.d. không xác định

Ví dụ 2: bào chế các dược phẩm 2H7 được nhân tính hóa dạng lỏng kháng CD20

Để bào chế các dược phẩm dạng lỏng, kháng thể tái tổ hợp được nhân tính hóa 2H7 kháng CD20 (2H7.v16 đã được bộc lộ trong WO 2006/084264) được trao đổi chất đệm dựa vào chất đệm lọc thẩm tách chứa dược phẩm đệm đã dự tính và nếu cần, cô tới nồng độ kháng thể khoảng 60 và 120mg/ml. Sau khi đạt được nồng độ đích, các tá dược (ví dụ trehaloza, rHuPH20, polysorbate 20) được bổ sung dưới dạng các dung dịch gốc vào dung dịch kháng thể. Nồng độ protein cuối cùng được điều chỉnh bằng dược phẩm đệm cuối cùng tới nồng độ 2H7 được nhân tính hóa khoảng 30, 50, và 100mg/ml.

Tất cả các dược phẩm được lọc tiệt trùng qua các màng lọc gắn kết protein mức thấp 0,22 μ m và đổ đầy vô trùng vào các lọ nhỏ thủy tinh tiệt trùng 3ml đầy bằng các nút cao su butyl được tạo lớp với nhựa flo và bịt nắp bằng vòng bít nhôm/chất dẻo không bẫy lên được. Thể tích đổ đầy khoảng 1,2ml. Các dược phẩm đó được giữ ở các nhiệt độ khác nhau (5°C, 25°C và 40°C) trong các khoảng thời gian khác nhau. Các mẫu được phân tích ở các điểm thời gian ổn định bằng các phương pháp phân tích dưới đây:

- 1) phép đo quang phổ UV;
- 2) sắc ký loại trừ kích thước (SEC);
- 3) sắc ký trao đổi ion (IEC);
- 4) thử nghiệm gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) đối với hoạt tính 2H7 được nhân tính hóa
- 5) thử nghiệm độ độc đối với hoạt tính rHuPH20

1). Nồng độ protein được xác định bằng phép nghiên cứu phổ độ hấp thụ bức xạ tia tử ngoại nhờ sử dụng phổ quang kế Agilent 8453 với chiều dài

bước sóng khoảng từ 240nm đến 400nm. Các mẫu được pha loãng theo trọng lượng tới khoảng 0,5mg/ml bằng được phẩm đệm tương ứng. Các nồng độ protein được tính toán theo công thức 1:

Nồng độ protein = $((A_{\max} - A_{320}) \times DF) / (\epsilon(\text{cm}^2/\text{mg}) \times d(\text{cm}))$ (công thức 1)

trong đó DF là hệ số pha loãng, d là chiều dài đường dẫn của ống thủy tinh thử nghiệm và ϵ là hệ số hấp thụ bằng 1,75 ($\text{cm}^2/\text{mg}^{-1}$) đối với 2H7 tại $A_{\max}$. Độ hấp thụ ánh sáng UV tại $A_{\max}$ (thường từ 278 đến 280nm) được hiệu chỉnh theo sự tán xạ ánh sáng ở 320nm và nhân với hệ số pha loãng, nó được xác định từ các khối lượng đã cân và tỷ trọng của mẫu tinh khiết và chất đệm pha loãng. Tử số được chia cho kết quả của độ dài đường dẫn của ống thủy tinh thử nghiệm d và hệ số hấp thụ ϵ .

2). Phép sắc ký loại trừ kích thước (SEC) được sử dụng để phát hiện loại phân tử lượng cao có thể hòa tan (các thể kết tụ) và các sản phẩm thủy phân phân tử lượng thấp (các mảnh) trong các chế phẩm. SEC được thực hiện theo Agilent Technologies, Inc. HPLC loại 1100 có gắn bộ cảm biến UV (bước sóng phát hiện 280nm) và cột TSK G3000SWXL (7,8x300mm). Monome, các thể kết tụ và các sản phẩm thủy phân nguyên vẹn được tách bằng profil rửa giải đẳng thành phần pha đông, nhờ sử dụng 0,20M kali phosphat và 0,25M kali clorua ở độ pH=6,2 với tốc độ chảy là 0,3 ml/phút.

3). Phép sắc ký trao đổi ion (IEC) được thực hiện để phát hiện các sản phẩm thoái biến hóa học làm thay đổi điện tích thực của kháng thể kháng CD20 trong các chế phẩm. Nhằm mục đích này, kháng thể kháng CD20 được ủ với Carboxypeptidaza B để xúc tác quá trình thủy phân của các axit amin bazơ. Phép sắc ký trao đổi ion được tiến hành bằng Agilent Technologies, Inc. HPLC loại 1100 có gắn bộ cảm biến UV (bước sóng phát hiện 280nm) và cột Dionex ProPac WCX-10 (4 x 250 mm). Các thể biến dị axit hoặc bazơ được tách nhờ sử dụng gradien tuyến tính của 25mM kali phosphat ở độ pH=6,9

(pha động A) và 120mM kali clorua hoà tan trong 25mM kali phosphat (pha động B) với tốc độ dòng chảy là 0,5 ml/phút.

4). Thử nghiệm gây độc tế bào phụ thuộc bề mặt (CDC) thử nghiệm được tiến hành để xác định hoạt tính của kháng thể kháng CD20 *in vitro*. Thử nghiệm hiệu lực gây độc tế bào phụ thuộc bề mặt (CDC) được sử dụng nhằm xác định khả năng của kháng thể làm tan các tế bào nguyên bào lympho B người (WIL2-S) với sự có mặt của bề mặt người. Thử nghiệm được tiến hành trong các đĩa vi chuẩn độ nuôi cấy mô 96 giếng. Trong thử nghiệm này, nhiều nồng độ kháng thể kháng CD20 trong chất, đối chứng, hoặc (các) mẫu được pha loãng trong chất pha loãng thử nghiệm được ủ với các tế bào WIL2-S (50.000 tế bào/giếng) với sự có mặt của một lượng không đổi bề mặt người. Đĩa này được ủ ở 37°C/5% CO₂ trong lồng ấp ẩm trong 1 đến 2 giờ. Kết thúc thời gian ủ, 50µL thuốc nhuộm oxy hoá khử, ALAMARBLUE™ được thêm vào mỗi giếng và đĩa thử nghiệm được ủ trong 15 đến 26 giờ. ALAMARBLUE™ là thuốc nhuộm oxy hoá khử mà phát huỳnh quang tại bước sóng kích thích bằng 530nm và bước sóng phát xạ bằng 590nm khi được khử bằng các tế bào sống. Vì vậy, các thay đổi về màu và sự phát huỳnh quang tỷ lệ với số lượng các tế bào có thể sống. Các kết quả, biểu hiện theo các đơn vị phát huỳnh quang tương đối (RFU), được vẽ đồ thị so với các nồng độ kháng thể kháng CD20 và chương trình đường thẳng song song được sử dụng để đánh giá hoạt tính của các mẫu kháng thể kháng CD20 so với chất tham chiếu.

5). Thử nghiệm độ đục được sử dụng để xác định hoạt tính hyaluronidaza và nồng độ enzym. Phương pháp này dựa vào sự hình thành của chất kết tủa không hòa tan được khi axit hyaluronic gắn kết với anbumin huyết thanh. Một cách vắn tắt, một loạt mẫu hyaluronidaza rhuPH20 loãng (Halozyme, Inc.) hoạt động trong điều kiện chuẩn tham khảo từ 2,5U/ml đến 0,25U/ml được tạo ra trong chất pha loãng enzym (70mM NaCl, 25mM PIPES, pH=5,5, 0,66 mg/ml sản phẩm thủy phân gelatin, 0,1% anbumin

huyết thanh người). Các mẫu thử nghiệm được pha loãng tới nồng độ cuối cùng là 1,5U/ml trong chất pha loãng enzym. 30 μ l các dung dịch pha loãng mẫu và chuẩn được chuyển vào đĩa 96 giếng “đáy đen trong” (Nunc). Sau đó đĩa này được bọc và làm ấm sơ bộ trong 5 phút ở 37°C. Sau đó phản ứng được kích thích bằng cách bổ sung 30 μ l dung dịch gồm 0,25mg/ml dung dịch chất nền axit hyaluronic làm ấm sơ bộ (70mM NaCl, 25mM PIPES, pH=5,5, 0,25mg/ml natri hyaluronat khô, Lifecore Biomedical). Đĩa này được lắc trong thời gian ngắn và được ủ trong 10 phút ở 37°C. Sau bước ủ này, phản ứng được ngừng bằng cách bổ sung 240 μ l dung dịch huyết thanh làm việc (2,5% huyết thanh ngựa, 500mM kali axetat, pH=4,25). Sau khoảng thời gian triển khai 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, độ đục của phản ứng được đo ở bước sóng 640nm bằng đầu đọc vi đĩa. Sự giảm độ đục do hoạt tính enzym đối với chất nền axit hyaluronic là số đo hoạt tính hyaluronidaza. Hoạt tính mẫu được xác định so với đường cong hiệu chỉnh hình thành từ các mức pha loãng của mẫu chuẩn làm việc rhuPH20.

Các kết quả thu được với các dược phẩm chứa kháng thể 2H7 được nhân tính hóa khác nhau được thể hiện trong các bảng dưới đây:

Dược phẩm K là được phẩm lỏng với thành phần 30mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 0 U/ml rhuPH20 ở độ pH= 5,3.

Nhiệt độ bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion		Hiệu lực CDC (% hoạt tính đặc hiệu)	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	% thể biến dị axit	Đỉnh chính (%)		
-	Ban đầu	32	0,9	98,9	0,2	27,1	67,5	103	ND
5°C	12 tuần	ND	0,8	98,1	1,1	27,8	65,9	110	ND
	24 tuần	ND	0,8	98,1	1,1	25,6	68,1	89	ND
	36 tuần	ND	0,9	98,6	0,5	27,0	68,3	97	ND
	48 tuần	ND	1,0	97,4	1,6	25,9	68,3	96	ND
	72 tuần	ND	0,9	97,9	1,2	25,2	68,2	109	ND
	96 tuần	ND	0,9	97,8	1,3	28,1	66,1	96	ND
25°C	4 tuần	ND	0,7	98,0	1,2	29,5	64,7	ND	ND

	8 tuần	ND	0,8	97,7	1,5	32,5	61,9	ND	ND
	12 tuần	ND	0,8	97,4	1,8	35,0	59,1	83	ND
	24 tuần	ND	1,0	96,8	2,2	40,9	52,1	ND	ND
40°C	2 tuần	ND	0,7	97,8	1,6	36,0	57,7	ND	ND
	4 tuần	ND	0,8	96,6	2,5	45,1	47,4	ND	ND
	8 tuần	ND	1,0	94,9	4,1	60,3	33,3	ND	ND

n.d. không xác định

Dược phẩm L là được phẩm lỏng với thành phần 30mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30mM natri axetat, 8% trehalosa dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 1500 U/ml rhuPH20 ở độ pH =5,3.

Nhiệt độ bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion		Hiệu lực CDC (% hoạt tính đặc hiệu)	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	% thể biến dị axit	Đỉnh chính (%)		
-	Ban đầu	32	0,9	98,9	0,2	27,1	67,4	114	1309
5°C	12 tuần	ND	0,8	97,9	1,3	27,6	65,7	110	1520
	24 tuần	ND	0,8	98,1	1,2	26,1	67,1	82	1112
	36 tuần	ND	0,9	97,3	1,8	27,0	67,9	98	1166
	48 tuần	ND	0,9	97,3	1,8	26,2	67,9	100	1620
	72 tuần	ND	0,9	97,9	1,3	26,0	68,2	97	ND
	96 tuần	ND	0,9	97,8	1,3	28,1	66,0	96	ND
25°C	4 tuần	ND	0,7	98,0	1,3	29,5	64,7	ND	1147

	8 tuần	ND	0,8	97,8	1,4	32,1	61,9	ND	847
	12 tuần	ND	0,8	97,3	1,9	35,1	59,3	89	892
	24 tuần	ND	1,0	96,8	2,2	41,3	51,9	ND	777
40°C	2 tuần	ND	0,8	97,6	1,6	35,3	57,4	ND	ND
	4 tuần	ND	0,8	96,7	2,4	45,2	46,9	ND	ND
	8 tuần	ND	1,0	95,0	4,0	59,8	34,3	ND	ND

n.d. không xác định

Dược phẩm M là được phẩm lỏng với thành phần 30mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 12.000 U/ml rhuPH20 ở độ pH= 5,3.

Nhiệt độ bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion		Hiệu lực CDC (% hoạt tính đặc hiệu)	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	% thể biến dị axit	Đỉnh chính (%)		
-	Ban đầu	33	0,9	98,9	0,2	27,2	67,4	103	10584
5°C	12 tuần	ND	0,8	97,7	1,6	26,5	66,8	111	8864
	24 tuần	ND	0,8	97,8	1,4	25,8	68,1	85	14319
	36 tuần	ND	0,8	97,5	1,7	27,1	68,0	96	11408
	48 tuần	ND	0,9	96,7	2,4	26,2	67,9	95	13817
	72 tuần	ND	0,9	97,6	1,6	26,4	68,0	98	ND
	96 tuần	ND	0,9	97,4	1,6	28,3	65,8	108	ND
25°C	4 tuần	ND	0,8	97,7	1,5	29,6	64,7	ND	13464

	8 tuần	ND	0,8	97,4	1,7	32,1	61,9	ND	10975
	12 tuần	ND	0,9	97,0	2,1	35,4	58,7	92	10394
	24 tuần	ND	1,0	96,5	2,5	41,0	51,8	ND	819
40°C	2 tuần	ND	1,1	97,3	1,6	35,7	57,2	ND	ND
	4 tuần	ND	0,8	96,6	2,5	45,5	47,5	ND	ND
	8 tuần	ND	1,0	94,9	4,1	59,9	33,3	ND	ND

n.d. không xác định

Dược phẩm N là được phẩm lỏng với thành phần 50mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 0 U/ml rhuPH20 ở độ pH= 5,3.

Nhiệt độ bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion		Hiệu lực CDC (% hoạt tính đặc hiệu)	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	% thể biến dị axit	Đỉnh chính (%)		
-	Ban đầu	50	0,9	98,9	0,2	27,0	67,6	107	ND
5°C	12 tuần	ND	0,9	98,1	1,0	26,9	66,6	86	ND
	24 tuần	ND	0,9	97,9	1,1	25,8	67,7	88	ND
	36 tuần	ND	1,0	97,9	1,1	27,1	68,5	92	ND
	48 tuần	ND	1,0	97,8	1,2	26,2	67,8	95	ND
	72 tuần	ND	1,0	97,8	1,2	26,5	67,9	101	ND
	96 tuần	ND	1,1	97,6	1,3	28,4	65,8	98	ND
25°C	4 tuần	ND	0,9	97,9	1,2	29,5	64,9	ND	ND

	8 tuần	ND	0,9	97,6	1,5	32,1	61,8	ND	ND
	12 tuần	ND	1,0	97,4	1,6	35,3	58,9	86	ND
	24 tuần	ND	0,9	97,9	1,1	40,0	52,8	ND	ND
40°C	2 tuần	ND	0,9	97,5	1,6	35,3	56,9	ND	ND
	4 tuần	ND	1,1	96,2	2,7	45,2	47,8	ND	ND
	8 tuần	ND	1,4	94,1	4,4	59,7	32,9	ND	ND

n.d. không xác định

Dược phẩm O là được phẩm lỏng với thành phần 50mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 1500 U/ml rhuPH20 ở độ pH= 5,3.

Nhiệt độ bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion		Hiệu lực CDC (% hoạt tính đặc hiệu)	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	% thể biến dị axit	Đỉnh chính (%)		
-	Ban đầu	51	0,9	98,9	0,2	27,1	67,4	116	1537
5°C	12 tuần	ND	0,9	97,8	1,3	25,8	67,4	109	1454
	24 tuần	ND	0,9	97,9	1,2	26,0	67,7	84	1372
	36 tuần	ND	1,0	97,5	1,5	27,7	67,3	93	1432
	48 tuần	ND	1,1	97,0	2,0	26,0	68,4	102	1356
	72 tuần	ND	1,1	97,6	1,4	26,5	68,0	97	ND
	96 tuần	ND	1,2	97,6	1,3	28,2	65,9	104	ND
25°C	4 tuần	ND	0,9	97,9	1,3	29,7	64,6	ND	1269

	8 tuần	ND	0,9	97,4	1,6	32,1	62,0	ND	966
	12 tuần	ND	1,0	97,5	1,5	35,2	58,9	89	1002
	24 tuần	ND	1,3	96,5	2,2	40,5	52,2	ND	ND
40°C	2 tuần	ND	0,9	97,5	1,6	35,9	56,1	ND	ND
	4 tuần	ND	1,1	96,3	2,6	46,5	45,7	ND	ND
	8 tuần	ND	1,4	94,6	4,0	60,5	31,9	ND	ND

n.d. không xác định

Dược phẩm P là được phẩm lỏng với thành phần 50mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 12.000 U/ml rhuPH20 ở độ pH= 5,3.

Nhiệt độ bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion		Hiệu lực CDC (% hoạt tính đặc hiệu)	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	% thể biến dị axit	Đỉnh chính (%)		
-	Ban đầu	52	0,9	98,9	0,2	27,2	67,4	110	9932
5°C	12 tuần	ND	0,9	97,7	1,4	26,8	67,6	102	9668
	24 tuần	ND	0,9	97,7	1,4	25,7	68,2	ND	11292
	36 tuần	ND	1,0	97,5	1,5	27,5	67,0	96	15469
	48 tuần	ND	1,1	97,4	1,6	26,1	68,2	100	10832
	72 tuần	ND	1,0	97,7	1,3	26,3	68,0	106	ND
	96 tuần	ND	1,2	97,4	1,5	29,3	64,8	100	ND
25°C	4 tuần	ND	0,9	97,6	1,5	29,7	64,6	ND	11765

	8 tuần	ND	1,0	97,6	1,4	32,3	61,9	ND	11594
	12 tuần	ND	1,1	97,1	1,8	35,4	58,8	86	10119
	24 tuần	ND	1,2	96,4	2,4	41,1	51,8	ND	8960
40°C	2 tuần	ND	1,1	97,3	1,6	35,9	55,5	ND	ND
	4 tuần	ND	1,1	96,4	2,5	44,9	46,5	ND	ND
	8 tuần	ND	1,4	94,5	4,1	60,4	33,2	ND	ND

n.d. không xác định

Dược phẩm Q là được phẩm lỏng với thành phần 100mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30mM natri axetat, 8% trehalosa dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 0 U/ml rhuPH20 ở độ pH =5,3.

Nhiệt độ bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion		Hiệu lực CDC (% hoạt tính đặc hiệu)	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	% thể biến dị axit	Đỉnh chính (%)		
-	Ban đầu	102	1,0	98,8	0,2	27,2	67,5	101	ND
5°C	12 tuần	ND	1,2	97,7	1,1	26,7	68,0	106	ND
	24 tuần	ND	1,3	97,6	1,2	25,8	67,5	84	ND
	36 tuần	ND	1,3	97,2	1,5	27,4	67,4	95	ND
	48 tuần	ND	1,3	97,2	1,6	26,2	68,3	89	ND
	72 tuần	ND	1,4	97,4	1,2	26,4	68,3	106	ND
	96 tuần	ND	1,5	97,2	1,2	28,1	66,4	96	ND
25°C	4 tuần	ND	1,2	97,5	1,2	31,0	63,7	ND	ND

	8 tuần	ND	1,5	97,2	1,4	32,4	61,9	ND	ND
	12 tuần	ND	1,6	96,7	1,7	35,4	58,9	90	ND
	24 tuần	ND	1,9	96,0	2,1	40,6	52,1	ND	ND
40°C	2 tuần	ND	1,4	97,1	1,6	35,4	57,7	ND	ND
	4 tuần	ND	1,8	95,5	2,7	45,6	47,3	ND	ND
	8 tuần	ND	2,3	93,5	4,3	60,3	32,9	ND	ND

n.d. không xác định

Dược phẩm R là dược phẩm lỏng với thành phần 100mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 1500 U/ml rhuPH20 ở độ pH= 5,3.

Nhiệt độ bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion		Hiệu lực CDC (% hoạt tính đặc hiệu)	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	% thể biến dị axit	Đỉnh chính (%)		
-	Ban đầu	101	1,0	98,8	0,2	27,3	67,5	98	1389
5°C	12 tuần	ND	1,2	97,7	1,2	25,3	67,7	104	1655
	24 tuần	ND	1,3	97,6	1,2	26,0	67,6	82	1381
	36 tuần	ND	1,3	96,6	2,2	26,7	68,7	95	1644
	48 tuần	ND	1,3	96,5	2,2	26,2	68,2	94	1381
	72 tuần	ND	1,4	97,5	1,2	26,7	68,1	106	ND
	96 tuần	ND	1,5	97,2	1,3	28,1	66,2	95	ND
25°C	4 tuần	ND	1,2	97,5	1,2	29,2	64,2	ND	1376

	8 tuần	ND	1,4	97,3	1,3	32,5	60,4	ND	1018
	12 tuần	ND	1,6	96,9	1,5	35,3	58,9	91	942
	24 tuần	ND	1,9	96,0	2,2	40,7	53,8	ND	616
40°C	2 tuần	ND	1,3	97,1	1,5	35,8	55,8	ND	ND
	4 tuần	ND	1,8	95,6	2,7	45,8	47,6	ND	ND
	8 tuần	ND	2,3	93,6	4,0	59,3	32,4	ND	ND

n.d. không xác định

Dược phẩm S là được phẩm lỏng với thành phần 100mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 12.000 U/ml rhuPH20 ở độ pH= 5,3.

Nhiệt độ bảo quản	Thời gian bảo quản	Nồng độ protein (mg/ml)	HPLC loại trừ kích thước			HPLC trao đổi ion		Hiệu lực CDC (% hoạt tính đặc hiệu)	Hoạt tính enzym (U/ml)
			HMW (%)	Monome (%)	LMW (%)	% thể biến dị axit	Đỉnh chính (%)		
-	Ban đầu	101	1,0	98,8	0,2	27,4	67,4	99	11692
5°C	12 tuần	ND	1,1	97,6	1,2	25,8	68,1	97	10599
	24 tuần	ND	1,2	97,6	1,2	26,1	67,2	80	11946
	36 tuần	ND	1,2	97,1	1,7	26,1	69,3	95	14894
	48 tuần	ND	1,3	97,0	1,8	25,7	68,4	89	11820
	72 tuần	ND	1,4	97,4	1,3	26,4	68,3	102	ND
	96 tuần	ND	1,5	97,1	1,4	28,1	66,2	97	ND
25°C	4 tuần	ND	1,3	97,4	1,3	29,8	64,6	ND	11897

	8 tuần	ND	1,4	97,1	1,4	32,5	61,6	ND	11117
	12 tuần	ND	1,5	96,6	1,8	35,5	58,7	89	10763
	24 tuần	ND	1,9	95,9	2,3	41,1	51,1	ND	7783
40°C	2 tuần	ND	1,4	97,0	1,6	35,6	55,9	ND	ND
	4 tuần	ND	1,8	95,6	2,6	46,0	48,0	ND	ND
	8 tuần	ND	2,2	93,8	4,0	61,4	32,7	ND	ND

n.d. không xác định

Ví dụ 3: Điều trị cho bệnh nhân bằng dược phẩm

Các chế độ điều trị chứa Rituximab trở thành tiêu chuẩn chăm sóc cho các bệnh nhân bị mắc các loại bệnh ác tính tế bào B dương tính với CD20 khác nhau. Hiện nay, rituximab được dùng theo đường truyền trong tĩnh mạch (IV) trong vài giờ. Thời gian truyền kéo dài và các tác dụng phụ liên quan đến việc truyền được ghi lại ở một số bệnh nhân là các hệ quả khó chịu của liệu pháp hiện hành. Ngoài ra, biện pháp cần thiết để thiết lập đường vào trong tĩnh mạch được xem như là xâm nhập và có thể làm đau đớn, đặc biệt ở các bệnh nhân bị các bệnh ác tính phải được điều trị nhắc lại. Đường dùng dưới da (SC) có thể đơn giản hóa đáng kể việc điều trị, rút ngắn thời gian sử dụng tới ít hơn 10 phút và sự chịu đựng của bệnh nhân được cải thiện. Hyaluronidaza của người tái tổ hợp (rHuPH20) được triển khai và chứng tỏ có cải thiện độ phân tán và độ hấp thụ của các dược chất cùng sử dụng. Nó được kết hợp với rituximab để cho phép các thể tích tiêm lớn hơn 10mL là đường dùng SC an toàn và tiện lợi. Các mục đích của cách điều trị này là lựa chọn liệu dược phẩm rituximab SC với rHuPH20 đã điều chế như được mô tả trong Ví dụ 1 (Dược phẩm A) tạo ra sự tiếp xúc tương hợp với IV rituximab và để đánh giá độ an toàn và độ dung nạp của nó ở các bệnh nhân nữ và nam có u bạch huyết dạng nang (FL) trong quá trình điều trị duy trì.

Ví dụ này cung cấp dữ liệu giai đoạn 1 từ thử nghiệm pha Ib có khả năng thích nghi đa trung tâm, gán nhãn bất kỳ, ngẫu nhiên. 124 các bệnh nhân được chọn ngẫu nhiên chia thành một trong bốn nhóm điều trị duy trì bằng rituximab: đối chứng tiêm tĩnh mạch (IV) 16 bệnh nhân, liều 1 dùng dưới da (SC) 34 bệnh nhân ($375\text{mg}/\text{m}^2$), liều 2 dùng dưới da (SC) 34 bệnh nhân ($625\text{mg}/\text{m}^2$) và liều 3 dùng dưới da (SC) 40 bệnh nhân ($800\text{mg}/\text{m}^2$). Trước khi phân ngẫu nhiên, các bệnh nhân được chọn được điều trị bằng ít nhất một liều rituximab tiêm tĩnh mạch (IV) với $375\text{mg}/\text{m}^2$ trong chế độ duy

trì. Đối với các bệnh nhân đã được phân ngẫu nhiên vào một trong các nhóm dùng qua đường dưới da (SC), liều đơn tiêm tĩnh mạch (IV) được thay thế bằng liều dùng dưới da (SC). Các bệnh nhân được cung cấp rituximab hoặc với chế độ điều trị 2 tháng một lần (q2m) hoặc 3 tháng một lần (q3m), theo thực tiễn cục bộ. Dữ liệu an toàn có thể lấy được từ toàn bộ 119 bệnh nhân. Rituximab dùng dưới da (SC) thường được dung nạp tốt. Không có các quan sát đáng kể nào về mặt lâm sàng hoặc tác động có hại nghiêm trọng liên quan đến việc điều trị được báo cáo. Toàn bộ 95 tác động có hại (AEs) được thông báo ở 46 bệnh nhân (39%). AE thường được dẫn chứng nhất là “phản ứng liên quan đến đường dùng thuốc” (AAR, chứa chứng phát ban, ban đỏ và sự khó chịu nhẹ). Các AAR đó có thể được loại trừ, phần lớn cường độ nhẹ và chỉ 1 tác động đòi hỏi phải có điều trị nào đó (thuốc có tác dụng tăng cường tiêu hóa chống nôn). Toàn diện, profil AE không khác biệt đáng kể với dạng mong đợi ở các bệnh nhân điều trị bằng rituximab tiêm tĩnh mạch (sau AAR, các tác động hay xảy ra là các rối loạn dạ dày-ruột và các lây nhiễm nhẹ). Bốn tác động có hại nghiêm trọng (SAEs) được báo cáo ở bốn bệnh nhân riêng biệt, tất cả được thông báo là không liên quan đến việc sử dụng thuốc nghiên cứu. Không có các AE dẫn đến chết người, hủy bỏ hoặc ngừng điều trị.

Tổng thể tích sử dụng dưới da ở mỗi bệnh nhân nằm trong khoảng từ 4,4 đến 15,0mL. Khoảng thời gian tiêm trung bình là 2mL/phút. Các nồng độ Rituximab tối đa trong huyết thanh ở các nhóm tiêm dưới da xuất hiện trong ngày 2 và ngày 8 (48 giờ và 168 giờ). Các thông số dược động học là tuyến tính đối với liều trong phạm vi các liều sử dụng tiêm dưới da (375, 625 và 800 mg/m²). Các nồng độ Rituximab vào ngày 28 (C₂₈) và mức độ phơi nhiễm huyết thanh (AUC₀₋₅₇) ở các bệnh nhân sử dụng 625mg/m² rituximab SC có thể ngang bằng với mức độ phơi nhiễm huyết thanh ở các bệnh nhân sử dụng liều rituximab chuẩn là 375mg/m².

Tóm lại, rituximab sử dụng dưới da có thể được phân phối nhanh chóng, tiện lợi và an toàn trong khi đạt được độ phơi huyết thanh có thể ngang bằng với dược phẩm sử dụng trong tĩnh mạch đã được chấp thuận ở các bệnh nhân FL trong quá trình điều trị duy trì. Sức chịu đựng của bệnh nhân là tốt. Các kết quả đó khuyến khích thêm cho việc thử nghiệm sử dụng rituximab dưới da và liều cố định bằng 1400mg rituximab SC được chọn lựa cho thử nghiệm không thấp hơn thông thường C_{trough} ở giai đoạn 2 của thử nghiệm.

Ví dụ 4: Rituximab SQ so với Rituximab IV ở các bệnh nhân bị u bạch huyết không phải thể Hodgkin, có nang

Các bệnh nhân bị u bạch huyết có nang (mức thấp) chưa được điều trị trước đó được điều trị bằng chế độ duy trì bằng hoặc (a) dược phẩm rituximab SC (điều chế theo Ví dụ 1, Dược phẩm A) kết hợp với CHOP hoặc CVP, hoặc (b) rituximab IV kết hợp với CHOP hoặc CVP.

Các bệnh nhân sẽ được ngẫu nhiên tiếp nhận 375mg/m² Rituximab bằng cách truyền trong tĩnh mạch hoặc 1400mg Rituximab sử dụng dưới da. Ngoài ra, các bệnh nhân sẽ được nhận hóa trị liệu chuẩn (CVP hoặc CHOP). Các bệnh nhân mà đạt được đáp ứng hoàn toàn hoặc một phần sau 8 chu trình điều trị sẽ được điều trị duy trì trong tối đa 12 chu trình nữa. Chu trình điều trị duy trì sẽ lặp lại sau 8 tuần. Thời gian tiên liệu đối với việc điều trị thử nghiệm là 96 tuần.

Việc điều trị bằng 1400mg kháng thể kháng CD20 Rituximab SQ để làm cách điều trị duy trì mỗi đợt cách nhau 8 tuần cho tới 12 chu trình được mong đợi là an toàn và hiệu quả để điều trị u bạch huyết dạng nang, tùy ý kết hợp với hóa trị liệu (chứa CHOP hoặc CVP).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao, ổn định bao gồm 30 mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30 mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 0 U/ml rHuPH20 ở độ pH 5,3.
2. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao, ổn định bao gồm 30 mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30 mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 1500 U/ml rHuPH20 ở độ pH 5,3.
3. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao, ổn định bao gồm 30 mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30 mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 12.000 U/ml rHuPH20 ở độ pH 5,3.
4. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao, ổn định bao gồm 50 mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30 mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 0 U/ml rHuPH20 ở độ pH 5,3.
5. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao, ổn định bao gồm 50 mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30 mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02 polysorbate 20, 1500 U/ml rHuPH20 ở độ pH 5,3.
6. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao, ổn định bao gồm 50 mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30 mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 12.000 U/ml rHuPH20 ở độ pH 5,3.
7. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao, ổn định bao gồm 100 mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30 mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 0 U/ml rHuPH20 ở độ pH 5,3.
8. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao, ổn định bao gồm 100 mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30 mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 1500 U/ml rHuPH20 ở độ pH 5,3.

9. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 nồng độ cao, ổn định bao gồm 100 mg/ml 2H7 được nhân tính hóa, 30 mM natri axetat, 8% trehaloza dihydrat, 0,02% polysorbate 20, 12.000 U/ml rHuPH20 ở độ pH 5,3.