



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

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



1-0040947

(51)⁷ A61K 39/395; A61K 9/00; A61K 47/18; (13) B
A61K 47/26; A61K 47/12; A61K 47/14

(21) 1-2019-04147

(22) 02/05/2012

(62) 1-2013-03795

(86) PCT/US2012/036069 02/05/2012

(87) WO2012/151247 08/11/2012

(30) 61/481,522 02/05/2011 US; 61/544,054 06/10/2011 US

(45) 26/08/2024 437

(43) 25/09/2019 378A

(73) MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. (US)

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

(72) DILUZIO, Willow (US); NGUYEN, Phuong M. (US); VARGA, Csanad M. (US);
PALANIAPPAN, Vaithianathan (US); BROWN, Jason (US); FOX, Irving H.; (US);
SCHOLZ, Catherine (US); JENKINS, Helen (GB); ROSARIO, Maria (PT).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) DƯỢC PHẨM LÔNG ỔN ĐỊNH CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG A4B7 VÀ VẬT
PHẨM CHỨA DƯỢC PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm kháng thể chứa hỗn hợp gồm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất chống oxy hóa hoặc chất tạo chelat, và ít nhất một axit amin tự do. Chế phẩm theo sáng chế có thể có độ ổn định được cải thiện, mức hình thành kết tụ giảm, hoặc cả hai. Sáng chế còn đề xuất phác đồ liều an toàn của các chế phẩm kháng thể này, phác đồ này dễ dàng được tuân thủ, và tạo ra kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ với lượng hữu hiệu điều trị *in vivo*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa các kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Dược phẩm này có thể là hỗn hợp chứa chất chống oxy hoá hoặc chất tạo chelat (ví dụ, xitrat), kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ và axit amin tự do. Dược phẩm này có thể ở dạng rắn hoặc lỏng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

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

Trong trường hợp kháng thể, việc duy trì được tính toàn vẹn về mặt cấu tạo thậm chí còn quan trọng hơn. Chu trình thoái hóa của các protein có thể liên quan đến sự mất ổn định hóa học (nghĩa là, quy trình bất kỳ liên quan đến sự cải biến protein bằng cách hình thành liên kết hoặc phân cắt để tạo ra một thực thể hóa học mới) hoặc sự mất ổn định vật lý (nghĩa là, các thay đổi ở cấu trúc bậc cao của protein). Sự mất ổn

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

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

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

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất việc xác định một chất chống oxy hoá hoặc chất tạo chelat, và ít nhất một axit amin, làm tá dược hữu ích để bào chế chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ mà sự mất ổn định của chúng khiến cho chúng dễ bị khử amit, oxy hoá, đồng phân hoá và/hoặc kết tụ. Chế phẩm này giúp cải thiện độ ổn định, làm giảm sự hình thành kết tụ và làm chậm quá trình thoái hóa của kháng thể có trong chế phẩm.

Do vậy, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất được phẩm lỏng ổn định chứa hỗn hợp gồm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất chống oxy hoá hoặc chất tạo chelat và ít nhất một axit amin tự do.

Theo một số phương án, dược phẩm lỏng ổn định này có mức hình thành kết tụ ít hơn khoảng 1,0% sau 12 tháng ở nhiệt độ trong phòng. Dược phẩm lỏng ổn định có thể có mức hình thành kết tụ ít hơn khoảng 0,2% sau 12 tháng ở nhiệt độ trong phòng.

Theo một số phương án, chất chống oxy hoá hoặc chất tạo chelat là xitrat. Theo một số phương án chất tạo chelat là EDTA.

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

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

Theo một số phương án, tỷ lệ mol giữa chất chống oxy hoá và chất hoạt động bề mặt nằm trong khoảng từ 3:1 đến 156:1.

Chế phẩm có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 6,3 đến 7,0. Độ pH của chế phẩm có thể nằm trong khoảng từ 6,5 đến 6,8. Chế phẩm có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 6,1 đến 7,0, hoặc nằm trong khoảng từ 6,2 đến 6,8.

Theo một số phương án, dược phẩm lỏng ổn định chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ với lượng ít nhất nằm trong khoảng từ 60mg/ml đến 160mg/ml. Chế phẩm có thể chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ với lượng ít nhất khoảng 160mg/ml. Chế phẩm có thể chứa kháng thể với lượng nằm trong khoảng từ 150mg/ml đến 180mg/ml hoặc khoảng 165mg/ml.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm lỏng ổn định chứa ít nhất khoảng từ 60mg/ml đến 160mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất đệm và ít nhất khoảng 10mM xitrat. Chất đệm có thể là đệm histidin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm lỏng ổn định chứa ít nhất khoảng từ 60mg/ml đến 180mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất đệm và ít nhất khoảng 5mM xitrat. Chất đệm có thể là đệm histidin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm lỏng ổn định chứa ít nhất khoảng 160mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ và ít nhất khoảng 10mM xitrat. Được phẩm này có thể còn chứa polysorbat 80.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm lỏng ổn định chứa khoảng 160mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ và ít nhất khoảng 5mM xitrat. Được phẩm này có thể còn chứa polysorbat 80.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm lỏng ổn định chứa hỗn hợp gồm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, xitrat, histidin, arginin và polysorbat 80. Chế phẩm có thể có mặt trong dụng cụ chứa, chẳng hạn như lọ, hộp, xy lanh hoặc dụng cụ tiêm tự động.

Kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ trong được phẩm lỏng ổn định theo sáng chế có thể là vedolizumab. Chế phẩm theo sáng chế có thể để sử dụng dưới da, trong tĩnh mạch, hoặc trong bắp.

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

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh viêm ruột, bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng được phẩm lỏng ổn định nêu trong bản mô tả. Bước sử dụng có thể là tiêm dưới da. Bước sử dụng có thể là tự sử dụng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất vật phẩm sản xuất, bao gồm dụng cụ chứa, được phẩm lỏng ổn định nêu trong bản mô tả, và hướng dẫn sử dụng nó.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho người bị bệnh viêm ruột, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột sử dụng globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết

kháng nguyên của nó có đặc tính gắn kết với integrin $\alpha 4\beta 7$ ở người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng cho bệnh nhân theo phác đồ liều sau đây: (a) liều ban đầu, ví dụ trong phác đồ điều trị giai đoạn gây đáp ứng, là 165mg globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng tiêm dưới da hai ngày một lần trong 6 liều; (b) tiếp theo ở tuần thứ sáu bằng liều thứ bảy và các liều tiếp theo, ví dụ, trong phác đồ điều trị giai đoạn duy trì, là 165mg globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng tiêm dưới da hai tuần một lần hoặc bốn tuần một lần khi cần; trong đó phác đồ liều này gây ra đáp ứng lâm sàng và làm thuyên giảm lâm sàng ở bệnh viêm ruột của bệnh nhân; và ngoài ra trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu gắn kết đối với phức hợp $\alpha 4\beta 7$, trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ và ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu dưới đây: chuỗi nhẹ: CDR1 SEQ ID NO:9, CDR2 SEQ ID NO:10, CDR3 SEQ ID NO:11; chuỗi nặng: CDR1 SEQ ID NO:12, CDR2 SEQ ID NO:13, CDR3 SEQ ID NO:14.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho người bị bệnh viêm ruột, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột sử dụng globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có tính đặc hiệu gắn kết với integrin $\alpha 4\beta 7$ ở người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên chứa vùng gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc không phải từ người và ít nhất một phần của kháng thể có nguồn gốc từ người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng cho bệnh nhân theo phác đồ liều sau đây bao gồm các liều dùng qua đường tĩnh mạch ở giai đoạn gây đáp ứng và các liều dùng qua đường dưới da ở giai đoạn duy trì: (a) liều dùng qua đường tĩnh mạch ban đầu là 300mg globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng truyền qua đường tĩnh mạch; (b) sau đó là liều dùng qua đường tĩnh mạch thứ hai tiếp theo 300mg globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng truyền qua đường tĩnh mạch ở khoảng hai tuần sau khi dùng liều ban đầu; (c) sau

đó bắt đầu ở tuần thứ sáu là liều thứ ba và các liều tiếp theo là 165mg globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng tiêm dưới da mỗi tuần một lần, hai tuần một lần, ba tuần một lần hoặc bốn tuần một lần nếu cần thiết; trong đó phác đồ liều gây ra đáp ứng lâm sàng và thuyên giảm lâm sàng ở bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột; và ngoài ra trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu gắn kết đối với phức hợp $\alpha 4\beta 7$, trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa ba vùng xác định hỗ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ và ba vùng xác định hỗ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu dưới đây: chuỗi nhẹ: CDR1 SEQ ID NO:9, CDR2 SEQ ID NO:10, CDR3 SEQ ID NO:11; chuỗi nặng: CDR1 SEQ ID NO:12, CDR2 SEQ ID NO:13, CDR3 SEQ ID NO:14.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phác đồ liều dùng để điều trị bệnh viêm ruột, trong đó phác đồ liều này bao gồm bước: cho bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột sử dụng globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có tính đặc hiệu gắn kết với integrin $\alpha 4\beta 7$ ở người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên chứa vùng gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc không phải từ người và ít nhất một phần của kháng thể có nguồn gốc từ người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng cho bệnh nhân theo phác đồ liều dùng qua đường dưới da hoặc tiêm bắp duy trì nồng độ thấp nhất trong huyết thanh ở trạng thái ổn định trung bình của globulin miễn dịch hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong khoảng từ 9 μ g/ml đến 13 μ g/ml; trong đó phác đồ liều này gây ra đáp ứng lâm sàng và làm thuyên giảm lâm sàng ở bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột; và ngoài ra trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu gắn kết đối với phức hợp $\alpha 4\beta 7$, trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa ba vùng xác định hỗ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ và ba vùng xác định hỗ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu dưới đây: chuỗi nhẹ: CDR1 SEQ ID NO:9, CDR2 SEQ ID NO:10, CDR3 SEQ ID NO:11; chuỗi nặng: CDR1 SEQ ID NO:12, CDR2 SEQ ID NO:13, CDR3 SEQ ID NO:14.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phác đồ liệu dùng để điều trị bệnh viêm ruột, trong đó phác đồ liệu này bao gồm bước: cho bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột sử dụng globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có tính đặc hiệu gắn kết với integrin $\alpha 4\beta 7$ ở người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên chứa vùng gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc không phải từ người và ít nhất một phần của kháng thể có nguồn gốc từ người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng cho bệnh nhân theo phác đồ liệu dùng qua đường dưới da hoặc tiêm bắp duy trì nồng độ thấp nhất trong huyết thanh ở trạng thái ổn định trung bình của globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó nằm trong khoảng từ 35 μ g/ml đến 40 μ g/ml; trong đó phác đồ liệu này gây ra đáp ứng lâm sàng và thuyên giảm lâm sàng ở bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột; và ngoài ra trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu gắn kết đối với phức hợp $\alpha 4\beta 7$, trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ và ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu dưới đây: chuỗi nhẹ: CDR1 SEQ ID NO:9, CDR2 SEQ ID NO:10, CDR3 SEQ ID NO:11; chuỗi nặng: CDR1 SEQ ID NO:12, CDR2 SEQ ID NO:13, CDR3 SEQ ID NO:14.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị người bị bệnh viêm ruột, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột sử dụng globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có tính đặc hiệu gắn kết với integrin $\alpha 4\beta 7$ ở người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên chứa vùng gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc không phải từ người và ít nhất một phần kháng thể có nguồn gốc từ người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng cho bệnh nhân theo phác đồ liệu sau đây: (a) một số lượng lớn liệu globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó dùng trong giai đoạn gây đáp ứng đủ để đạt được nồng độ thấp nhất trong huyết thanh ở trạng thái ổn định trung bình nằm trong khoảng từ 20 μ g/ml đến 30 μ g/ml globulin miễn dịch được làm

tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bằng khoảng sáu tuần dùng liều ban đầu; (b) được theo sau bởi một số lượng lớn các liều globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở giai đoạn duy trì nếu cần thiết để duy trì nồng độ thấp nhất trong huyết thanh ở trạng thái ổn định trung bình nằm trong khoảng từ 9µg/ml đến 13µg/ml hoặc nằm trong khoảng từ 35µg/ml đến 40µg/ml globulin miễn dịch hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó; trong đó phác đồ liều gây ra đáp ứng lâm sàng và thuyên giảm lâm sàng ở bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột; và ngoài ra trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu gắn kết đối với phức hợp $\alpha 4\beta 7$, trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa ba vùng xác định hỗ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ và ba vùng xác định hỗ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu dưới đây: chuỗi nhẹ: CDR1 SEQ ID NO:9, CDR2 SEQ ID NO:10, CDR3 SEQ ID NO:11; chuỗi nặng: CDR1 SEQ ID NO:12, CDR2 SEQ ID NO:13, CDR3 SEQ ID NO:14.

Theo một số khía cạnh, chế phẩm, phương pháp điều trị, liều và/hoặc phác đồ liều đảm bảo giảm đến mức tối thiểu khả năng bệnh nhân phát triển các kháng thể phản ứng với kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

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

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

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

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

Theo một số khía cạnh, globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng ở dạng liều cuối cùng ở nồng độ

nằm trong khoảng từ 1,0mg/ml đến 1,4mg/ml. Globulin miễn dịch tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có thể được dùng ở dạng liều cuối cùng bằng khoảng 1,2mg/ml.

Theo một số khía cạnh, globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên được dùng ở dạng liều cuối cùng có lượng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ nằm trong khoảng từ 70mg đến 250mg, nằm trong khoảng từ 90mg đến 200mg, nằm trong khoảng từ 150mg đến 180mg, hoặc ít nhất là 160mg.

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

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

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

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

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

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

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

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

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

Hình 6 cho thấy sự thay đổi hình thành kết tụ SEC (% mỗi ngày) do sự thay đổi nồng độ protein, độ pH và tỷ lệ mol chất hoạt động bề mặt:protein. Ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,5, sự hình thành kết tụ tương tự với sự hình thành kết tụ của chế phẩm trong đó tỷ lệ mol polysorbat 80:protein nằm trong khoảng từ 0,7 đến 1,5.

Hình 7 là đồ thị cho thấy ở các tỷ lệ mol polysorbat 80:protein lớn hơn 1,5, tỷ lệ hình thành kết tụ tăng khi độ pH tăng.

Hình 8 là đồ thị thể hiện ảnh hưởng của tá dược đến sự hình thành kết tụ. 25mM xitrat, 5mM xitrat, 5mM EDTA, 25mM xystein, hoặc 5mM xystein được thêm vào chế phẩm. Cả ba tá dược đều làm giảm sự hình thành kết tụ.

Hình 9 là tập hợp các đồ thị cho thấy sự giảm mức hình thành kết tụ với sự có mặt của 25mM xitrat trong chế phẩm, và mối tương quan giữa nồng độ protein tăng và tỷ lệ hình thành kết tụ tăng.

Hình 10 là đồ thị thể hiện kết quả của quá trình thoái hóa dạng CEX ở 40°C. Dữ liệu này cho thấy ảnh hưởng của sự thay đổi độ pH đến quá trình thoái hóa CEX.

Hình 11 là đồ thị thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ pH của chế phẩm. Độ pH của chế phẩm chứa histidin giảm cùng với nhiệt độ, trong khi độ pH của chế phẩm chứa xitrat không bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ.

Hình 12 là đồ thị thể hiện tỷ lệ phần trăm của dạng đồng chức năng chính CEX trong khoảng thời gian mười hai tháng. Các chế phẩm có độ pH nằm trong khoảng 6,0 đến 6,2 có dạng đồng chức năng chính ít hơn khoảng 1% đến 2% so với chế phẩm có độ pH nằm trong khoảng 6,3 đến 6,4.

Hình 13 là tập hợp các đồ thị chứng tỏ rằng độ nhớt chủ yếu bị ảnh hưởng bởi nồng độ protein và độ pH. Việc bổ sung sucroza, histidin và arginin vào có ảnh hưởng đến độ nhớt của chế phẩm.

Hình 14 là trình tự axit amin của (A) vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ kappa của kháng thể GM607'CL trưởng thành ở người và (B) vùng biến đổi trên chuỗi nặng 21/28'CL ở người.

Hình 15 thể hiện thành phần của sản phẩm protein trong xy lanh nạp sẵn.

Các Hình 16A-B thể hiện ảnh hưởng của (A) nồng độ protein và (B) độ nhớt đến lực bơm của các xy lanh khác nhau được thử nghiệm.

Hình 17 (A) thể hiện lực trượt ban đầu ở dạng hàm số của nồng độ protein và kích cỡ kim tiêm. Hình 17 (B) là lực trượt ban đầu đối với mỗi xy lanh và kích cỡ kim tiêm.

Hình 18 là profin hấp thụ của vedolizumab. Đồ thị này cho thấy nồng độ của các liều tiêm bắp và tiêm dưới da thường chồng chéo. Không có sự khác biệt rõ rệt toàn bộ về profin hấp thụ của các đường dùng này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa các kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Dược phẩm này có thể là hỗn hợp chứa chất chống oxy hoá hoặc chất tạo chelat (ví dụ, xitrat), kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ và axit amin tự do. Dược phẩm này có thể ở dạng rắn hoặc lỏng.

Định nghĩa

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

Chế phẩm “ổn định” là chế phẩm trong đó kháng thể trong đó về cơ bản vẫn giữ được độ ổn định vật lý của nó và/hoặc độ ổn định hóa học của nó và/hoặc hoạt tính sinh học của nó trong khi bảo quản. Theo một khía cạnh, chế phẩm về cơ bản vẫn giữ được độ ổn định vật lý và hóa học của nó, cũng như hoạt tính sinh học của nó trong khi bảo quản. Khoảng thời gian bảo quản thường được chọn dựa trên thời hạn sử dụng dự định của chế phẩm. Các kỹ thuật phân tích khác nhau để xác định độ ổn định protein là sẵn có trong lĩnh vực kỹ thuật này và được xem xét trong tài liệu: *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) và Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993) chẳng hạn. Độ ổn định có thể được xác định ở nhiệt độ được lựa chọn trong khoảng thời gian được lựa chọn. Ví dụ, chế phẩm lỏng ổn định ở nhiệt độ khoảng 40°C trong ít nhất khoảng 3 ngày, 5 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần hoặc 6 tuần. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm đông khô ổn định ở nhiệt độ khoảng 40°C trong ít nhất khoảng 2 tuần đến 4 tuần, ít nhất khoảng 3 tháng, ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 9 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, hoặc ít nhất khoảng 18 tháng. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm lỏng và/hoặc đông khô ổn định ở nhiệt độ khoảng 5°C và/hoặc 25°C trong ít nhất khoảng 1 tháng, ít nhất khoảng 3 tháng, ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 9 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, ít nhất khoảng 24 tháng, ít nhất khoảng 30 tháng, hoặc ít nhất khoảng 36 tháng; và/hoặc ổn định ở nhiệt độ khoảng -20°C và/hoặc -70°C trong ít nhất khoảng 1 tháng, ít nhất khoảng 3 tháng, ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 9 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, ít nhất khoảng 24 tháng, ít nhất khoảng 30 tháng, ít nhất khoảng 36

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

Độ ổn định của chế phẩm lỏng có thể được đánh giá định tính và/hoặc định lượng theo nhiều cách khác nhau, bao gồm xác định dime, multime và/hoặc mức hình thành kết tụ (ví dụ bằng cách áp dụng sắc ký loại trừ theo kích thước (size exclusion chromatography - SEC), đo khối phổ theo kỹ thuật ion hóa bằng phương pháp khử hấp phụ lazer được hỗ trợ bởi chất nền và phân tách các ion dựa trên thời gian bay (matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry - (MALDI-TOF MS), siêu ly tâm phân tích, tán xạ ánh sáng (phổ tương quan photon, tán xạ ánh sáng động (dynamic light scattering - DLS), tán xạ ánh sáng tĩnh, tán xạ ánh sáng lazer đa góc (multi-angle laser light scattering - MALLS)), phân tích hình ảnh trên kính hiển vi dựa trên dòng chảy, đếm trở kháng điện tử (coulter), hệ thống xác định mức độ che sáng hoặc đếm hạt chất lỏng khác, bằng cách đo độ đục, và/hoặc bằng cách quan sát bằng mắt thường); bằng cách đánh giá độ không đồng nhất điện tích có sử dụng sắc ký trao đổi cation (CEX), điện di điểm đẳng điện (isoelectric focusing - IEF), ví dụ kỹ thuật mao quản (cIEF), hoặc điện di vùng mao quản; phân tích trình tự đầu tận cùng amino hoặc đầu tận cùng carboxy; phân tích khối phổ; phân tích SDS-PAGE hoặc SEC để so sánh các kháng thể phân đoạn, nguyên vẹn và ở dạng multime (nghĩa là, dime, trime, v.v.); phân tích bản đồ peptit (ví dụ tryptic hoặc LYS-C); đánh giá hoạt tính sinh học hoặc chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể; và các phương pháp tương tự. Độ ổn định của chế phẩm ở trạng thái rắn cũng có thể được đánh giá định tính và/hoặc định lượng theo nhiều cách khác nhau, bao gồm các thử nghiệm trực tiếp, như xác định cấu trúc tinh thể theo phương pháp nhiễu xạ tia X trên mẫu bột (Ray Powder Diffraction - XRPD); đánh giá cấu trúc kháng thể ở trạng thái rắn bằng cách sử dụng phổ hồng ngoại biến đổi chuỗi Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR); và đo quá trình chuyển đổi nhiệt trong chất rắn đông khô (quá trình nóng chảy, chuyển đổi sang trạng thái thủy tinh, v.v.) bằng cách áp dụng phương pháp phân tích nhiệt lượng bằng tia quét vi sai (Differential Scanning Calorimetry - DSC) và các thử nghiệm gián tiếp như đo hàm lượng ẩm bằng thử nghiệm Karl Fisher, ví dụ, để ngoại suy khả năng mất ổn định hóa học do thủy phân. Sự mất ổn định có thể bao gồm một hoặc nhiều hiện tượng bất kỳ trong số: sự kết tụ (ví dụ, sự kết tụ các chất

tan không cùng hóa trị, sự kết tụ các chất tan cùng hóa trị (ví dụ, sự sắp xếp lại/sự xáo trộn liên kết disulfua), sự kết tụ các chất không tan), khử amit (ví dụ như khử amit trong Asn), sự oxy hoá (ví dụ như sự oxy hoá Met), đồng phân hoá (ví dụ như sự đồng phân hóa Asp), sự cắt/thủy phân/phân mảnh (ví dụ như phân mảnh vùng bản lề), hình thành succinimit, kéo dài đầu tận cùng N, xử lý đầu tận cùng C, sự khác biệt glycosyl, và các hiện tượng tương tự.

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

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

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

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

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

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

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

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

Thuật ngữ “hoạt tính sinh học” của kháng thể đơn dòng được dùng để chỉ khả năng gắn kết của kháng thể với kháng nguyên và tạo ra đáp ứng sinh học xác định

được có thể được xác định *in vitro* hoặc *in vivo*. Hoạt tính này có thể là hoạt tính đối kháng hoặc hoạt tính chủ vận.

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

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

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

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “chất đệm” dùng để chỉ chất đệm mà chống lại sự thay đổi về độ pH do tác dụng của các hợp phần tiếp hợp axit-bazơ của nó. Chất đệm có thể có mặt trong chế phẩm lỏng hoặc rắn theo sáng chế. Theo một số phương án, chất đệm theo sáng chế điều chỉnh độ pH của chế phẩm từ khoảng 5,0 đến 7,5, từ độ pH khoảng 5,5 đến 7,5, từ độ pH khoảng 6,0 đến 7,0, hoặc từ độ pH khoảng 6,3 đến 6,5. Theo một khía cạnh, ví dụ về chất đệm ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp, sẽ điều chỉnh độ pH trong khoảng từ 5,0 đến 7,5 bao gồm axetat, suxinat, gluconat, histidin, xitrat, phosphat, maleat, cacodylat, 2-[N-morpholino]etanaxit sulfonic (MES), bis(2-hydroxyetyl)iminotris[hydroxymetyl]metan (Bis-Tris), axit N-[2-axetamido]-2-iminodiacetic (ADA), glyxylglyxin và các chất đệm axit hữu cơ khác. Theo một khía cạnh khác, chất đệm theo sáng chế là histidin hoặc xitrat.

“Đệm histidin” là đệm chứa ion histidin. Ví dụ về chất đệm histidin bao gồm dung dịch histidin clorua, histidin axetat, histidin phosphat, histidin sulfat. Đệm histidin hoặc đệm histidin-HCl có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,0, độ pH nằm trong khoảng từ 6,1 đến 6,9, hoặc độ pH bằng khoảng 6,5.

“Đệm xitrat” là đệm chứa ion xitrat. Ví dụ về đệm xitrat bao gồm dung dịch natri xitrat, amoni xitrat, canxi xitrat, và kali xitrat. Đệm xitrat có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 6,2, độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5, độ pH nằm trong khoảng từ 6,1 đến 6,5, độ pH khoảng 6,1, độ pH khoảng 6,2, hoặc độ pH khoảng 6,5.

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

Trong bản mô tả này, “chất hoạt động bề mặt” được dùng để chỉ chất làm giảm sức căng bề mặt của chất lỏng. Theo một khía cạnh, chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt không ion. Ví dụ về các chất hoạt động bề mặt trong bản mô tả này bao gồm polysorbat (polyoxyetylen sorbitan monolaurat, Ví dụ, polysorbat 20 và polysorbat 80); TRITON (t-Octylphenoxypolyetoxyetanol, chất tẩy rửa không ion, do Union Carbide subsidiary of Dow Chemical Co., Midland MI cung cấp); natri đodexyl sulfat (SDS); natri laurel sulfat; natri octyl glycosit; lauryl-, myristyl-, linoleyl-, hoặc stearyl-sulfobetain; lauryl-, myristyl-, linoleyl- hoặc stearyl-sarcosin; linoleyl-, myristyl-, hoặc xetyl-betain; lauroamidopropyl-, cocamidopropyl-, linoleamidopropyl-, myristamidopropyl-, palmidopropyl-, hoặc isostearamidopropyl-betain (ví dụ như lauroamidopropyl); myristamidopropyl-, palmidopropyl-, hoặc isostearamidopropyl-dimetylamin; natri metyl cocoyl-, hoặc đinatri metyl oleyl-taurat; sorbitan monopalmitat; và nhóm MONAQUAT (do Mona Industries, Inc., Paterson, N.J. cung cấp); polyetyl glycol (PEG), polypropylen glycol (PPG), và copolyme của poloxyetylen và poloxypropylen glycol (ví dụ như Pluronics/Poloxamer, PF68 etc);

v.v.. Theo một khía cạnh khác, chất hoạt động bề mặt trong bản mô tả này là polysorbat 80.

Thuật ngữ “chất tạo chelat” được dùng để chỉ chất gắn kết với nguyên tử bởi nhiều hơn một liên kết. Theo một khía cạnh, ví dụ về chất tạo chelat trong bản mô tả này bao gồm xitrat, axit etylendiamintetraaxetic, axit etylenglycoltetraaxetic (EGTA), dimercaprol, axit dietylentriaminpentaaxetic, và N,N-bis(carboxymetyl)glyxin. Theo một khía cạnh khác, chất tạo chelat là xitrat hoặc EDTA.

Thuật ngữ “chất chống oxy hoá” được dùng để chỉ chất ức chế sự oxy hoá của một phân tử khác. Ví dụ về các chất chống oxy hoá trong bản mô tả này bao gồm xitrat, axit lipoic, axit uric, glutathion, tocopherol, caroten, lycopene, xystein, các hợp chất phosphonat, ví dụ, axit etidronic, desferoxamin và malat.

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

Lượng mol và tỷ lệ mol của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ và tá dược nêu trong bản mô tả được tính toán dựa trên giả thiết là kháng thể có phân tử lượng gần đúng khoảng 150.000 dalton. Phân tử lượng thực của kháng thể có thể không bằng 150.000 dalton, tùy thuộc vào thành phần axit amin hoặc cải biến sau dịch mã, ví dụ, phụ thuộc vào dòng tế bào được dùng để biểu hiện kháng thể. Phân tử lượng thực của kháng thể có thể bằng 150.000 dalton +/- 5%.

Thuật ngữ “kháng thể của người” bao gồm kháng thể có trình tự có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng phôi của người, như kháng thể có nguồn gốc từ chuột nhắt chuyển gen mang các gen globulin miễn dịch của người (ví dụ, chuột nhắt được biến đổi gen XENOMOUSE (do Abgenix, Fremont, CA cung cấp), HUMAB-MOUSE®, chuột nhắt chuyển nhiễm sắc thể KIRIN TC MOUSE™, KMMOUSE®

(do MEDAREX, Princeton, NJ cung cấp)), các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn của người, tế bào u tủy của người, hoặc tế bào B của người.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” được dùng trong bản mô tả này để chỉ kháng thể thu được từ quần thể các kháng thể về cơ bản đồng nhất, nghĩa là, các kháng thể riêng biệt chứa trong quần thể này giống hệt nhau và/hoặc gắn kết với cùng epitop, ngoại trừ các biến thể có thể được tạo ra trong quá trình sản xuất kháng thể đơn dòng, các biến thể như vậy thường có mặt với lượng nhỏ. Ngược lại với các chế phẩm kháng thể đa dòng mà thường bao gồm các kháng thể khác nhau trực tiếp chống lại các quyết định kháng nguyên (epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng trực tiếp chống lại một quyết định duy nhất trên kháng nguyên này. Cụm từ bỏ nghĩa “đơn dòng” cho biết đặc tính của kháng thể thu được từ quần thể các kháng thể về cơ bản đồng nhất, và cần phải không được hiểu như là đặc tính mong muốn của kháng thể theo phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp tế bào lai được mô tả lần đầu tiên trong tài liệu: Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), hoặc có thể được tạo ra theo các phương pháp ADN tái tổ hợp (xem patent Mỹ số 4,816,567 chẳng hạn). “Các kháng thể đơn dòng” cũng có thể được phân lập từ các thư viện kháng thể thể thực khuẩn bằng cách áp dụng các kỹ thuật được mô tả trong tài liệu: Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) và Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) chẳng hạn.

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

“Các đoạn gắn kết kháng nguyên” của globulin miễn dịch được làm tương thích với người được điều chế trong chế phẩm theo sáng chế chứa ít nhất vùng thay đổi của các chuỗi nặng và/hoặc các chuỗi nhẹ của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Ví dụ, đoạn gắn kết kháng nguyên của vedolizumab bao gồm các gốc axit amin 20 đến 131 của trình tự chuỗi nhẹ được làm tương thích với người SEQ ID NO:4. Ví dụ về các đoạn gắn kết kháng nguyên bao gồm các đoạn Fab, các đoạn Fab', các đoạn scFv và $F(ab')_2$ của globulin miễn dịch được làm tương thích với người đã biết trong lĩnh vực. Các đoạn gắn kết kháng nguyên của globulin miễn dịch được làm tương thích với người theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách phân cắt nhờ enzym hoặc theo các kỹ thuật tái tổ hợp. Chẳng hạn, việc phân cắt nhờ papain hoặc pepsin có thể được áp dụng để tạo ra các đoạn Fab hoặc $F(ab')_2$ tương ứng. Các kháng thể cũng có thể được tạo ra ở nhiều dạng cắt cụt bằng cách sử dụng các gen kháng thể, trong đó một hoặc nhiều codon kết thúc được đưa vào trước vị trí kết thúc tự nhiên. Ví dụ, cấu trúc tái tổ hợp mã hoá chuỗi nặng của đoạn $F(ab')_2$ có thể được thiết kế để bao gồm các trình tự ADN mã hoá miền CH1 và vùng bản lề của chuỗi nặng này. Theo một khía cạnh, các đoạn gắn kết kháng nguyên ức chế $\alpha 4\beta 7$ integrin gắn kết với một hoặc nhiều phối tử của nó (ví dụ như MAdCAM addressin niêm mạc (ví dụ, MAdCAM-1), fibronectin).

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

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

Đoạn Fab cũng chứa miền ổn định của chuỗi nhẹ và miền ổn định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng. Các đoạn Fab' khác với các đoạn Fab ở chỗ có bổ sung một vài gốc ở đầu tận cùng carboxy của miền CH1 của chuỗi nặng bao gồm một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề của kháng thể. Fab'-SH trong bản mô tả này được dùng để chỉ Fab', trong đó (các) gốc xystein của miền ổn định mang ít nhất một nhóm thiol tự do. Các đoạn kháng thể $F(ab')_2$ được tạo ra trước tiên ở dạng các cặp đôi đoạn Fab' có xystein bản lề giữa chúng. Các phản ứng ngẫu hợp hóa học của các đoạn kháng thể đã được biết rõ.

Các đoạn kháng thể “Fv chuỗi đơn” hoặc “scFv” bao gồm các miền V_H và V_L của kháng thể, trong đó các miền này có mặt trong chuỗi polypeptit đơn. Theo một khía cạnh, polypeptit Fv còn bao gồm một liên kết polypeptit giữa các miền V_H và V_L , cho phép scFv này tạo ra cấu trúc mong muốn để gắn kết kháng nguyên. Để biết rõ về scFv, xem tài liệu: Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

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

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

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

“Mức tương đồng” được định nghĩa là tỷ lệ phần trăm các gốc trong biến thể trình tự axit amin giống hệt nhau sau khi so sánh các trình tự và đưa vào các khe hở, nếu cần thiết, để đạt được phần trăm tương đồng tối đa. Các phương pháp và các chương trình máy tính để so sánh trình tự là đã biết trong lĩnh vực này.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

các FR của trình tự globulin miễn dịch của người. Tuy ý, kháng thể được làm tương thích với người cũng sẽ bao gồm ít nhất một phần vùng ổn định globulin miễn dịch (Fc), thường là vùng ổn định của globulin miễn dịch của người. Để biết thêm chi tiết, xem tài liệu: Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); và Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

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

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

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

bệnh hoặc có thể mắc bệnh hoặc dễ bị bệnh. Thuật ngữ “bệnh nhân” và “đối tượng” được sử dụng thay cho nhau trong bản mô tả.

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

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

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

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

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

Chế phẩm

Như nêu trong bản mô tả, đã khám phá ra rằng các kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ổn định hơn khi được bào chế với chất chống oxy hoá hoặc chất tạo chelat. Ngoài ra, như nêu trong bản mô tả, các kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể được bào chế để giảm mức hình thành kết tụ (ví dụ, lượng polysorbat 80 trong chế phẩm có thể giảm). Ví dụ, chế phẩm bao gồm xitrat hoặc EDTA và các kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ làm giảm tỷ lệ hình thành kết tụ của kháng thể trong quá trình bảo quản. Chế phẩm cũng có thể được bảo quản mà không cần oxy để làm giảm mức hình thành kết tụ. Theo một phương án, chế phẩm có mức hình thành kết tụ kháng thể thấp hơn khoảng 2,5% ở 25°C sau 12 tháng. Theo một phương án, chế phẩm có mức hình thành kết tụ kháng thể thấp hơn khoảng 2,0% ở 25°C sau 12 tháng. Theo một phương án, chế phẩm có mức hình thành kết tụ kháng thể thấp hơn khoảng 1,6% ở 25°C sau 12 tháng. Theo một phương án, chế phẩm có mức hình thành kết tụ kháng thể thấp hơn khoảng 1,3% ở 25°C sau 12 tháng. Theo một phương án, chế phẩm có mức hình thành kết tụ kháng thể thấp hơn khoảng 1,0% ở 25°C sau 12 tháng. Theo một phương án khác, chế phẩm có mức hình thành kết tụ kháng thể thấp hơn khoảng 0,5% ở 5°C sau 12 tháng. Theo một phương án khác, chế phẩm có mức hình thành kết tụ kháng thể thấp hơn khoảng 0,3% ở 5°C sau 12 tháng.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ổn định. Chế phẩm này chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ và chất chống oxy hoá hoặc chất tạo chelat. Chế phẩm này còn chứa chất đệm có thể là một hoặc nhiều axit amin tự do. Chế phẩm này tùy ý còn có thể chứa chất hoạt động bề mặt. Kháng thể trong chế phẩm có thể là kháng thể với chiều dài đầy đủ hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, như đoạn Fab, Fv, scFv, Fab' hoặc F(ab')₂.

Mức hình thành kết tụ có thể được giảm bằng cách loại bỏ oxy ra khỏi chế phẩm. Theo cách khác, chế phẩm có thể chứa chất chống oxy hoá hoặc chất tạo chelat. Theo một khía cạnh, ví dụ về các chất chống oxy hoá và chất tạo chelats có thể được chứa trong chế phẩm bao gồm axit lipoic, axit uric, glutathion, tocopherol, caroten, lycopen, cystein, axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA), axit etylenglycoltetraaxetic (EGTA), đimercaprol, axit dietyltri aminpentaaxetic, và N,N-bis(carboxymetyl) glyxin, các hợp chất phosphonat, ví dụ, axit etidronic, desferoxamin, malat và xitrat. Một số chất chống oxy hoá và chất tạo chelat có thể làm giảm tỷ lệ hình thành kết tụ

trong quá trình bảo quản chế phẩm. Theo một khía cạnh khác, chất tạo chelat và/hoặc chất chống oxy hoá là xitrat hoặc EDTA. Ví dụ về nồng độ chất tạo chelat đối với chế phẩm lỏng nằm trong khoảng từ hơn 0mM đến 60mM, từ khoảng 5mM đến g 50mM, từ khoảng 5mM đến 15mM, từ khoảng 10mM đến 25mM, và từ khoảng 20mM đến 30mM. Theo một khía cạnh khác, nồng độ chất tạo chelat nằm trong khoảng từ 0mM đến 30mM. Theo một phương án, chất tạo chelat và/hoặc chất chống oxy hoá là xitrat, và nồng độ xitrat nằm trong khoảng từ khoảng 0mM đến 15mM, từ khoảng 0mM đến 10mM, hoặc từ khoảng 0mM đến 5mM.

Chế phẩm có thể chứa axit amin tự do mong muốn bất kỳ, có thể ở dạng L, dạng D hoặc hỗn hợp mong muốn bất kỳ của các dạng này. Theo một khía cạnh, axit amin tự do có thể được chứa trong chế phẩm bao gồm, ví dụ, histidin, alanin, arginin, glyxin, axit glutamic, serin, lysin, tryptophan, valin, xystein và hỗn hợp của chúng. Một số axit amin có thể làm cho các protein ổn định chống lại quá trình thoái hóa trong quá trình sản xuất, làm khô, đông khô và/hoặc bảo quản, ví dụ, nhờ các liên kết hydro, các cầu muối, các đặc tính chống oxy hoá, hoặc các tương tác kỵ nước hoặc bằng cách loại trừ ra khỏi bề mặt protein. Các axit amin có thể hoạt động như các chất điều biến tính trương hoặc có thể đóng vai trò làm giảm độ nhớt của chế phẩm. Theo một khía cạnh khác, các axit amin tự do, như histidin và arginin, có thể đóng vai trò làm chất bảo vệ đông khô, và không kết tinh khi đông khô ở dạng hợp phần của chế phẩm. Các axit amin tự do, như axit glutamic và histidin, ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp, có thể đóng vai trò làm các chất đệm trong dung dịch nước có độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7,5. Theo một khía cạnh khác nữa, chế phẩm chứa histidin, arginin, hoặc hỗn hợp gồm histidin và arginin. Theo một khía cạnh khác nữa, nồng độ axit amin tự do đối với chế phẩm lỏng nằm trong khoảng từ khoảng 9mM đến 0,5M, ví dụ, từ khoảng 10mM đến 90mM, từ khoảng 10mM đến 75mM, từ khoảng 10mM đến 40mM, từ khoảng 25mM đến 50mM, từ khoảng 15mM đến 300mM, từ khoảng 20mM đến 200mM, từ khoảng 25mM đến 150mM, từ khoảng 50mM đến 75mM, từ khoảng 50mM đến 120mM, từ khoảng 50 đến 150mM, hoặc khoảng 50mM hoặc khoảng 125mM.

Tuỳ ý, chế phẩm còn có thể chứa ít nhất một chất hoạt động bề mặt, ví dụ, để điều chỉnh mức hình thành kết tụ tan và không tan. Theo một khía cạnh, chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt không ion. Theo một khía cạnh khác, chất hoạt

động bề mặt là chất hoạt động bề mặt ion. Ví dụ về các chất hoạt động bề mặt có thể được chứa trong chế phẩm bao gồm, ví dụ, polysorbat 20, polysorbat 80, poloxamer (Pluronic®) và hỗn hợp của chúng. Khi có mặt, chất hoạt động bề mặt này thường được chứa với lượng làm giảm sự hình thành kết tụ không tan của kháng thể, ví dụ, trong quá trình đóng chai, làm lạnh, làm khô, đông khô và/hoặc hoàn nguyên, với sự có mặt của silic, các lọ làm đầy, xy lanh đóng sẵn, và/hoặc hộp. Nồng độ chất hoạt động bề mặt thường nằm trong khoảng từ 0,0001% đến 1,0%, từ khoảng 0,01% đến 0,5%, ví dụ, khoảng 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,20%, 0,3%, 0,4%, hoặc 0,5% (khối lượng/thể tích). Nồng độ cao hơn của chất hoạt động bề mặt, ví dụ, polysorbat 80 có thể dẫn đến mức hình thành kết tụ SEC lớn hơn. Việc giảm nồng độ polysorbat 80 có thể làm giảm mức hình thành kết tụ SEC trong khi bảo quản. Theo một khía cạnh, tỷ lệ mol chất hoạt động bề mặt:kháng thể nằm trong khoảng từ 0,7:1 đến 2,0:1. Theo một khía cạnh khác, tỷ lệ mol chất hoạt động bề mặt:kháng thể là 1,5:1.

Theo một phương án, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ chứa kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ với nồng độ cao. Ví dụ, theo một phương án, chế phẩm lỏng có thể bao gồm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ với lượng ít nhất khoảng 60mg/ml, ít nhất khoảng 70mg/ml, ít nhất khoảng 80mg/ml, ít nhất khoảng 90mg/ml, ít nhất khoảng 100mg/ml, ít nhất khoảng 110mg/ml, ít nhất khoảng 120mg/ml, ít nhất khoảng 130mg/ml, ít nhất khoảng 140mg/ml, ít nhất khoảng 150mg/ml, ít nhất khoảng 160mg/ml, ít nhất khoảng 170mg/ml, ít nhất khoảng 180mg/ml, ít nhất khoảng 190mg/ml, ít nhất khoảng 200mg/ml, ít nhất khoảng 250mg/ml, ít nhất khoảng 300mg/ml, từ khoảng 60mg/ml đến 190mg/ml, từ khoảng 60mg/ml đến 170mg/ml, kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ với lượng nằm trong khoảng từ 150mg/ml đến 180mg/ml, hoặc khoảng 160mg/ml hoặc khoảng 165mg/ml. Theo cách khác, theo một khía cạnh khác, chế phẩm lỏng có thể bao gồm ít nhất khoảng 154mg/ml, ít nhất khoảng 176mg/ml.

Chế phẩm có thể là chế phẩm lỏng hoặc rắn. Chế phẩm lỏng là dung dịch hoặc hỗn dịch trong nước, được bào chế trong dung môi nước thích hợp, như nước hoặc hỗn hợp nước/hữu cơ, như hỗn hợp rượu trong nước. Chế phẩm lỏng có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,3, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,5, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,3, nằm trong khoảng từ 6,3 đến 7,1, hoặc nằm trong khoảng từ 6,4 đến 7,0, hoặc nằm trong khoảng từ 6,3 đến 6,8, như khoảng 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, hoặc 6,9. Chế phẩm

lông có thể được giữ ở nhiệt độ trong phòng, được làm lạnh (ví dụ, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C), hoặc được đông lạnh (ví dụ, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -20°C hoặc -70°C) để bảo quản.

Chế phẩm rắn có thể được bào chế theo cách thích hợp bất kỳ và có thể ở dạng bánh hoặc bột, ví dụ, có bổ sung chất bảo vệ đông khô. Theo một khía cạnh, chế phẩm rắn được bào chế bằng cách làm khô chế phẩm lỏng như đã nêu trong bản mô tả, ví dụ bằng cách làm khô đông khô hoặc làm khô phun. Khi chế phẩm là chế phẩm rắn, chế phẩm này có thể có hàm lượng ẩm không lớn hơn khoảng 5%, không lớn hơn khoảng 4,5%, không lớn hơn khoảng 4%, không lớn hơn khoảng 3,5%, không lớn hơn khoảng 3%, không lớn hơn khoảng 2,5%, không lớn hơn khoảng 2%, không lớn hơn khoảng 1,5%, không lớn hơn khoảng 1%, hoặc là hầu như khan. Chế phẩm rắn có thể được hòa tan, nghĩa là được hoàn nguyên, trong môi trường hoặc dung môi thích hợp để trở thành chất lỏng thích hợp để sử dụng. Các dung môi thích hợp để hoàn nguyên chế phẩm rắn bao gồm nước, nước muối đẳng trương, dung dịch đệm, ví dụ, nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer (lactat hoặc dextroza), môi trường thiết yếu tối thiểu, dung dịch rượu/nước, dung dịch dextroza, v.v.. Lượng dung môi có thể tạo ra nồng độ protein trị liệu cao hơn, bằng, hoặc nhỏ hơn nồng độ trước khi làm khô. Theo một khía cạnh khác, nồng độ kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ được hoàn nguyên bằng nồng độ trong chế phẩm lỏng trước khi làm khô.

Chế phẩm có thể vô trùng, và điều này có thể được thực hiện theo các quy trình mà chuyên gia trong lĩnh vực biết rõ để tạo ra dược phẩm vô trùng thích hợp để dùng cho đối tượng là người, trước khi, hoặc sau khi, bào chế chế phẩm. Chế phẩm có thể được làm vô trùng ở dạng lỏng, ví dụ, trước khi làm khô và/hoặc sau khi hoàn nguyên bằng cách lọc qua các cỡ lỗ nhỏ, bằng cách xử lý vô khuẩn hoặc bằng cách cho tiếp xúc với bức xạ cực tím. Các cỡ lỗ lọc có thể là 0,1 μ m hoặc 0,2 μ m để lọc các vi sinh vật hoặc từ 10nm đến 20nm để lọc các hạt virus. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, chế phẩm đã làm khô có thể được làm vô trùng, ví dụ, bằng cách cho tiếp xúc với bức xạ gamma. Theo một khía cạnh, chế phẩm lỏng chứa kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ được vô trùng bằng cách lọc trước khi làm khô.

Theo một khía cạnh, chế phẩm này ổn định khi bảo quản. Các thử nghiệm độ ổn định khác nhau đã được các chuyên gia trong lĩnh vực biết rõ để xác nhận độ ổn định

của chế phẩm. Ví dụ, kháng thể trong chế phẩm lỏng có thể ổn định khi bảo quản ở khoảng 25°C trong ít nhất khoảng 4 tuần, ít nhất khoảng 2 tháng, ít nhất khoảng 3 tháng, hoặc ít nhất khoảng 6 tháng, hoặc ít nhất khoảng 9 tháng, hoặc ít nhất khoảng 12 tháng; ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất khoảng 3 tháng, ít nhất khoảng 1 năm, ít nhất khoảng 2 năm, ít nhất khoảng 3 năm hoặc lâu hơn. Theo cách khác hoặc ngoài ra, kháng thể trong chế phẩm có thể ổn định khi bảo quản ở nhiệt độ khoảng 15°C trong ít nhất khoảng 4 tuần, ít nhất khoảng 3 tháng, ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 9 tháng, ít nhất khoảng 1 năm, hoặc lâu hơn. Theo cách khác hoặc ngoài ra, kháng thể trong chế phẩm có thể ổn định khi bảo quản ở nhiệt độ khoảng -20°C hoặc -70°C trong ít nhất khoảng 4 tuần; ít nhất khoảng 3 tháng, ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 9 tháng, ít nhất khoảng 1 năm, ít nhất khoảng 2 năm, ít nhất khoảng 3 năm, ít nhất khoảng 4 năm hoặc lâu hơn.

Độ ổn định có thể được kiểm tra bằng cách đánh giá độ ổn định vật lý, độ ổn định hóa học, và/hoặc hoạt tính sinh học của kháng thể trong chế phẩm trong khoảng thời gian bảo chế cũng như sau khi bảo quản ở nhiệt độ được chỉ ra. Độ ổn định vật lý và/hoặc hóa học của chế phẩm lỏng hoặc bột khô được hoàn nguyên có thể được đánh giá định tính và/hoặc định lượng theo nhiều cách khác nhau (xem: *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*, Rodriguez-Diaz *et al.* eds. Informa Healthcare (2005) chẳng hạn), bao gồm đánh giá mức hình thành kết tụ tan và không tan (ví dụ bằng cách sử dụng sắc ký loại trừ theo kích thước, siêu ly tâm phân tích, MALDI-TOF MS, tán xạ ánh sáng (động học (DLS) hoặc MALLS), chụp ảnh trên kính hiển vi dựa trên dòng chảy (flow-based microscopic imaging), hoặc hệ thống đếm hạt chất lỏng khác, bằng cách đo độ đục, bằng cách ly tâm theo gradien tỷ trọng và/hoặc bằng cách quan sát bằng mắt thường); bằng cách đánh giá tính không đồng nhất về mặt điện tích có sử dụng sắc ký trao đổi cation (cũng xem Vlasak and Ionescu, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:468-481 (2008) và Harris *et al. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 752:233-245 (2001)), điện di điểm đẳng điện hoặc điện di vùng mao quản; phân tích trình tự đầu tận cùng amino hoặc đầu tận cùng carboxy; phân tích khối phổ; phân tích SDS-PAGE để so sánh các kháng thể phân đoạn, nguyên vẹn và multimer (nghĩa là, dimer, trimer, v.v.); lập bản đồ peptit (ví dụ tryptic hoặc LYS-và các peptit tương tự). Tính không ổn định có thể dẫn đến sự kết tụ, khử amit (ví dụ, khử amit Asn), sự oxy hoá (ví dụ, sự oxy hoá Met), đồng phân hoá (ví dụ, đồng phân hoá Asp),

sự biến tính, sự phân cắt/sự thủy phân/phân mảnh (ví dụ, phân mảnh vùng bản lề), sự hình thành succinimit, các xystein không cặp đôi, sự duỗi ở đầu tận cùng N, sự biến đổi đầu tận cùng C, sự khác biệt glycosyl hoá, v.v. Hoạt tính sinh học hoặc chức năng gắn kết kháng nguyên, ví dụ, chức năng gắn kết của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ với MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1) hoặc ức chế việc gắn kết của tế bào biểu hiện integrin $\alpha 4\beta 7$ với MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1), ví dụ, MAdCAM đã được cố định (ví dụ, MAdCAM-1), có thể được đánh giá bằng cách áp dụng các kỹ thuật khác nhau mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật đã biết (xem: Soler *et al.*, *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 330:864-875 (2009) chẳng hạn). Việc đo hàm lượng ẩm của chế phẩm khô có thể cho biết chế phẩm sẽ trải qua quá trình thoái hóa hóa học hoặc vật lý như thế nào, trong đó độ ẩm cao hơn dẫn đến thoái hóa nhiều hơn.

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

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

Theo một số phương án, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có $\geq 50\%$ dạng đồng chức năng tích điện chính, $\geq 55\%$ dạng đồng chức năng tích điện chính, hoặc từ 65% đến 70% dạng đồng chức năng tích điện chính. Theo các khía cạnh khác, chế phẩm kháng thể ổn định kháng $\alpha 4\beta 7$ có $\leq 45\%$ dạng đồng chức năng tích điện có tính axit, $\leq 40\%$ dạng đồng chức năng tích điện có tính axit, $\leq 30\%$ dạng đồng chức năng tích điện có tính axit hoặc từ 22% đến 28% dạng đồng chức năng có tính axit. Cũng theo các

khía cạnh khác, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ổn định có $\leq 25\%$ dạng đồng chức năng có tính bazơ, $\leq 20\%$ dạng đồng chức năng có tính bazơ, $\leq 15\%$ dạng đồng chức năng có tính bazơ, khoảng 5% dạng đồng chức năng có tính bazơ hoặc khoảng 10% dạng đồng chức năng có tính bazơ. Theo một khía cạnh, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ổn định có $\geq 55\%$ dạng đồng chức năng chính, $\leq 30\%$ dạng đồng chức năng có tính axit và/hoặc $\leq 20\%$ dạng đồng chức năng có tính bazơ, ví dụ, như được xác định bởi CEX. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ổn định có $\geq 50\%$ dạng đồng chức năng chính, $\leq 45\%$ dạng đồng chức năng có tính axit và/hoặc $< 10\%$ dạng đồng chức năng có tính bazơ, ví dụ, như được xác định bởi cIEF.

Theo một số khía cạnh, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ở dạng rắn khô có hàm lượng ẩm $\leq 10\%$, $\leq 5\%$ hàm lượng ẩm hoặc hàm lượng ẩm $< 2,5\%$. Thời gian cần thiết để hoàn nguyên là ≤ 60 phút, ≤ 50 phút hoặc ≤ 40 phút hoặc ≤ 30 phút hoặc ≤ 20 phút.

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

Theo một phương án, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có $\geq 90\%$ kháng thể monome, $\geq 95\%$ kháng thể monome, hoặc từ 97% đến 99% kháng thể monome. Theo một phương án khác, phần lớn nguyên liệu trong chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có bán kính trung bình $\leq 20\text{nm}$, $\leq 15\text{nm}$, $\leq 10\text{nm}$, hoặc nằm trong khoảng từ 5nm đến 7nm. Theo một khía cạnh, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có $\geq 80\%$ lượng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo protein phân tích. Theo một khía cạnh, có $\geq 90\%$ chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có $\leq 10\%$ kết tụ, $\leq 5\%$ kết tụ, $\leq 2,5\%$ kết tụ, $\leq 1,5\%$ kết tụ, $\leq 1,0\%$ kết tụ hoặc $\leq 0,5\%$ kết tụ. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ổn định có $\geq 96\%$ monome

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

Kích cỡ hạt, lớn hơn từ 1 đến 2 micron, ví dụ, của kết tụ hoặc tá dược không hòa tan, nghĩa là, trong chế phẩm lỏng, hoặc trong chế phẩm được hoàn nguyên có thể được xác định bằng độ đục (ví dụ, hệ thống đếm hạt chất lỏng (HIAC) bằng Hach Ultra Analytics (Grants Pass, OR)), kính hiển vi, máy đếm hạt điện tử, hệ thống dựa trên hình ảnh qua kính hiển vi hoặc kỹ thuật số (ví dụ, dựa trên dòng chảy) như hình ảnh vi lưu (microfluidics imaging - MFI) do Brightwell (Ottawa, CA) cung cấp hoặc thiết bị phân tích hạt dựa trên hình ảnh FLOWCAM® do Fluid Imaging Technologies (Yarmouth, ME) cung cấp. Theo một khía cạnh, kích cỡ hạt trong chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ bằng khoảng $30\mu\text{m}$, khoảng $25\mu\text{m}$, khoảng $10\mu\text{m}$, khoảng $5\mu\text{m}$, khoảng $2\mu\text{m}$ hoặc $1\mu\text{m}$ hoặc nhỏ hơn. Lượng các hạt cần được giảm tới mức tối thiểu trong chế phẩm kháng thể. Theo một khía cạnh, lượng các hạt trong một liều chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ là < 6000 hạt có đường kính $\geq 10\mu\text{m}$ và/hoặc < 600 hạt có đường kính $\geq 25\mu\text{m}$ (U.S. Pharmacopoeia Chp. 788, phương pháp đếm dựa trên độ đục; một nửa của lượng này được định lượng bằng phương pháp định lượng trên kính hiển vi). Theo một khía cạnh khác, lượng hạt trong liều chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ là khoảng 1000 hạt $\geq 10\mu\text{m}$ và khoảng 0 đến 100 hạt $\geq 25\mu\text{m}$ (phương pháp MFI). Theo một khía cạnh khác nữa, lượng hạt trong mỗi mililit, ví dụ, theo phương pháp đo MFI, trong liều chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ nằm trong khoảng từ 500 đến 2000 hạt $2\mu\text{m}$ đến $10\mu\text{m}$ trong mỗi ml, khoảng 50 đến 350 hạt $\geq 10\mu\text{m}$ trong mỗi ml và khoảng 0 đến 50 hạt $\geq 25\mu\text{m}$ trong mỗi ml. Theo một khía cạnh khác nữa, lượng hạt trong liều chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ nằm trong khoảng từ 500 đến 100.000, nằm trong khoảng từ 1000 đến 5000 hoặc nằm trong khoảng từ 1500 đến 3000 hạt $2\mu\text{m}$ đến $10\mu\text{m}$ trong mỗi ml.

Độ nhớt của chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể được điều chỉnh để tiêm dưới da hoặc tiêm bắp. Độ nhớt có thể bị ảnh hưởng bởi nồng độ protein và độ pH. Ví dụ, khi nồng độ protein tăng, độ nhớt có thể tăng. Gia tăng độ pH có thể làm giảm độ nhớt của chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Trong một số chế phẩm protein, natri clorua được thêm vào để giảm độ nhớt của chế phẩm. Các hợp phần khác có thể ảnh hưởng đến độ nhớt của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ là các axit amin như histidin và arginin.

Chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ có thể đẳng trương (ví dụ, 250mOsm hoặc 350mOsm) hoặc ưu trương (ví dụ, lớn hơn 350mOsm, lớn hơn 450mOsm, lớn hơn 550mOsm hoặc lớn hơn 650mOsm), ví dụ, để tiêm dưới da hoặc tiêm bắp. Theo một khía cạnh, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ không nhược trương, ví dụ, nhỏ hơn 250mOsm. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ nằm trong khoảng từ 350mOsm đến 400mOsm, nằm trong khoảng từ 400mOsm đến 450mOsm hoặc nằm trong khoảng từ 350mOsm đến 450mOsm.

Tính không ổn định dẫn đến biến tính có thể được đánh giá bằng phương pháp phân tích nhiệt lượng bằng tia quét vi sai (DSC). Các kháng thể có hai nhiệt độ nóng chảy (T_m) trong phương pháp DSC, ví dụ, T_{m1} và T_{m2} . Một số tá được có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ nguyên thể. Việc phát hiện ra nhiệt độ nóng chảy cao hơn khi so sánh chế phẩm bằng phương pháp DSC có thể chỉ ra chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ ổn định hơn với T_m cao hơn. Ví dụ, ở độ pH=5,7, T_m của một chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ là thấp hơn, và do đó kém ổn định hơn ở độ pH=6,5. Theo một khía cạnh, T_{m1} của chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ $>60^\circ\text{C}$. Theo một khía cạnh khác, T_{m1} của chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ nằm trong khoảng từ 65°C đến 70°C hoặc bằng khoảng 69°C . Theo một khía cạnh, T_{m2} của chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ $>80^\circ\text{C}$. Theo một khía cạnh khác, T_{m2} của chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ nằm trong khoảng từ 82°C đến 88°C hoặc bằng khoảng 86°C .

Theo một phương án, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ có ái lực gắn kết hoặc trị số EC50 nằm trong khoảng từ 60% đến 140% kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ tiêu chuẩn tham chiếu. Theo một khía cạnh, kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ trong chế phẩm nêu trong bản mô tả gắn kết với $\alpha\beta 7$, ví dụ, trên tế bào (WO98/06248 hoặc Patent Mỹ số 7,147,851), ở trị số nằm trong khoảng từ 80% đến 120% so với kháng thể tiêu chuẩn tham chiếu. Theo một phương án khác, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ có khả năng ức chế ít nhất 50%, hoặc ít nhất 60% việc gắn kết của tế bào biểu hiện $\alpha\beta 7$ integrin với MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1), ví dụ, thể khảm MAdCAM-Ig (xem công bố đơn sáng chế Mỹ số 20070122404, cũng được dùng làm ví dụ tiêu chuẩn tham chiếu).

Như đã nêu trên, việc làm lạnh chế phẩm được dự tính cụ thể trong bản mô tả này. Vì vậy, chế phẩm có thể được kiểm tra độ ổn định bằng cách lạnh đông và rã đông. Do đó, kháng thể trong chế phẩm lỏng có thể ổn định bằng cách lạnh đông và rã

đông chế phẩm, ví dụ kháng thể có thể ổn định sau một, hai, ba, bốn, năm hoặc nhiều hơn năm chu trình lạnh đông/rã đông.

Theo một số phương án, dược phẩm là chế phẩm lỏng chứa ít nhất khoảng 60mg/ml đến 170mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất đệm (ví dụ, histidin), và ít nhất khoảng 5mM xitrat. Theo các phương án khác, chế phẩm là chế phẩm lỏng chứa ít nhất khoảng 60mg/ml đến 170mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất đệm (ví dụ, xitrat), axit amin (ví dụ, arginin) và chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 80).

Theo một phương án khác, chế phẩm bao gồm ít nhất khoảng 140mg/ml hoặc khoảng 150mg/ml đến 170mg/ml, ví dụ, khoảng 160mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất đệm (ví dụ, histidin), ít nhất khoảng 5mM xitrat và axit amin tự do (ví dụ, arginin).

Theo một phương án khác nữa, chế phẩm bao gồm ít nhất khoảng 160mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất đệm (ví dụ, histidin), ít nhất khoảng 5mM xitrat, 0,2% polysorbat 80, và axit amin tự do (ví dụ, arginin). Theo một phương án, nồng độ chất đệm trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 15mM đến 75mM, nằm trong khoảng từ 25mM đến 65mM, hoặc khoảng 50mM. Nồng độ axit amin tự do trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 50mM đến 250mM, nằm trong khoảng từ 75mM đến 200mM, nằm trong khoảng từ 100mM đến 150mM hoặc khoảng 125mM; nồng độ polysorbat 80 trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,4%, nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,4%, nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,3%, nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,25%, nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,2%, hoặc khoảng 0,2%.

Theo một số phương án, chế phẩm là chế phẩm rắn (ví dụ, chế phẩm đông khô), chứa hỗn hợp gồm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, xitrat, histidin, arginin, polysorbat 80, và chất bảo vệ đông khô hoặc sacarit, như đường không khử. Sacarit có thể được chứa trong chế phẩm lỏng để đạt đến nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến 20%, hoặc nằm trong khoảng từ 6% đến 10%.

Theo một phương án, chế phẩm là chế phẩm đông khô và được bảo quản ở dạng liều đơn trong một dụng cụ chứa, ví dụ, lọ thuốc, xy lanh, hộp, và/hoặc dụng cụ tiêm tự động. Dụng cụ chứa có thể được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng 2°C đến 8°C hoặc 25°C cho đến khi nó được dùng cho đối tượng cần sử dụng. Lọ có thể là lọ có dung tích 5cc, 10cc hoặc 20cc chẳng hạn (ví dụ cho liều 160mg/ml). Lọ này có

thể chứa ít nhất khoảng 20mg, ít nhất khoảng 50mg, ít nhất khoảng 70mg, ít nhất khoảng 80mg, ít nhất khoảng 100mg, ít nhất khoảng 120mg, ít nhất khoảng 155mg, ít nhất khoảng 180mg, ít nhất khoảng 200mg, ít nhất khoảng 240mg, ít nhất khoảng 300mg, ít nhất khoảng 360mg, ít nhất khoảng 400mg, ít nhất khoảng 540mg, hoặc ít nhất khoảng 900mg kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một khía cạnh, dụng cụ chứa chứa khoảng 165mg kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

Theo một phương án khác, chế phẩm là chế phẩm lỏng và được bảo quản ở dạng liều đơn trong một hoặc hai lọ, hộp, xy lanh, hoặc dụng cụ tiêm tự động. Lọ, hộp, xy lanh, hoặc dụng cụ tiêm tự động có thể được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C cho đến khi toàn bộ lượng chứa trong đó, ví dụ, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, được dùng cho đối tượng cần sử dụng. Lọ có thể là lọ có dung tích 5, 10 hoặc 20cc chẳng hạn (ví dụ để dùng cho liều 160mg/ml). Lọ có thể chứa ít nhất khoảng 20mg, ít nhất khoảng 50mg, ít nhất khoảng 70mg, ít nhất khoảng 80mg, ít nhất khoảng 100mg, ít nhất khoảng 120mg, ít nhất khoảng 155 mg, ít nhất khoảng 180mg, ít nhất khoảng 200mg, ít nhất khoảng 240mg, ít nhất khoảng 300mg, ít nhất khoảng 360mg, ít nhất khoảng 400mg, ít nhất khoảng 540mg, hoặc ít nhất khoảng 900mg kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một khía cạnh, lọ chứa khoảng 165mg kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Xy lanh hoặc hộp có thể là dụng cụ chứa có dung tích 1ml hoặc 2ml (ví dụ để dùng cho liều 160mg/ml) hoặc lớn hơn 2ml, ví dụ, để dùng cho liều cao hơn (ít nhất 320mg hoặc 400mg hoặc lớn hơn). Xy lanh hoặc hộp có thể chứa ít nhất khoảng 20mg, ít nhất khoảng 50mg, ít nhất khoảng 70mg, ít nhất khoảng 80mg, ít nhất khoảng 100mg, ít nhất khoảng 120mg, ít nhất khoảng 155mg, ít nhất khoảng 180mg, ít nhất khoảng 200mg, ít nhất khoảng 240mg, ít nhất khoảng 300mg, ít nhất khoảng 360mg, ít nhất khoảng 400mg, hoặc ít nhất khoảng 500mg kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

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

như polyester; chất bảo quản; chất làm trơn thành dụng cụ chứa, ví dụ, silic, dầu khoáng, glyxerin, hoặc dẫn xuất perfloropolyete TRIBOGLIDE® (do Tribo Film Research, Inc. cung cấp) để dễ tiêm và/hoặc các ion trái dấu tạo muối như natri.

Kháng thể $\alpha 4\beta 7$

Các kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ thích hợp để sử dụng trong chế phẩm bao gồm các kháng thể từ nguồn mong muốn bất kỳ, như các kháng thể người với chiều dài đầy đủ, các kháng thể chuột, các kháng thể thỏ và các kháng thể tương tự, và các kháng thể được thiết kế mong muốn bất kỳ, như các kháng thể khảm, các kháng thể được làm tương thích với người, và các kháng thể tương tự. Đoạn gắn kết kháng nguyên của loại kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này, như các đoạn Fab, Fv, scFv, Fab' và $F(ab')_2$, cũng thích hợp để sử dụng trong chế phẩm.

Kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể gắn kết với epitop trên chuỗi $\alpha 4$ (ví dụ, MAb 21.6 được làm tương thích với người (patent Mỹ số 5.840.299 của Bendig và đồng tác giả)), trên chuỗi $\beta 7$ (ví dụ, FIB504 hoặc dẫn xuất được làm tương thích với người (ví dụ, patent Mỹ số 7,528,236 của Fong và đồng tác giả)), hoặc gắn kết với epitop tổ hợp được tạo ra bằng cách kết hợp chuỗi $\alpha 4$ với chuỗi $\beta 7$. Theo một khía cạnh, kháng thể gắn kết epitop tổ hợp trên phức hợp $\alpha 4\beta 7$, nhưng không gắn kết epitop trên chuỗi $\alpha 4$ hoặc chuỗi $\beta 7$ trừ khi các chuỗi này được kết hợp với nhau. Sự kết hợp của integrin $\alpha 4$ với integrin $\beta 7$ có thể tạo ra epitop tổ hợp bằng cách đưa vào các gốc ở gần có mặt trên cả hai chuỗi cùng chứa epitop này hoặc bằng cách làm lộ cấu hình vị trí gắn kết epitop trên một chuỗi, ví dụ, chuỗi integrin $\alpha 4$ hoặc chuỗi integrin $\beta 7$, mà nó khó gắn kết với kháng thể khi không có mặt của đối tác integrin thích hợp hoặc khi không có sự hoạt hoá integrin. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ gắn kết cả hai chuỗi integrin $\alpha 4$ và integrin $\beta 7$, và do vậy, nó đặc hiệu đối với phức hợp integrin $\alpha 4\beta 7$. Các kháng thể như vậy có thể gắn kết $\alpha 4\beta 7$ nhưng không gắn kết $\alpha 4\beta 1$, và/hoặc không gắn kết $\alpha E\beta 7$ chẳng hạn. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ gắn kết với epitop giống hoặc về cơ bản giống với kháng thể Act-1 (Lazarovits, A. I. *et al.*, *J. Immunol.*, 133(4): 1857-1862 (1984), Schweighoffer *et al.*, *J. Immunol.*, 151(2): 717-729, 1993; Bednarczyk *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(11): 8348-8354, 1994). Dòng tế bào lai ACT-1 ở chuột, tạo ra kháng thể đơn dòng Act-1 ở chuột, do Millennium Pharmaceuticals, Inc., 40 Landsdowne Street, Cambridge, Mass. 02139, U.S.A. nộp

lưu theo Hiệp ước Budapest ngày 22 tháng 8 năm 2001, tại Cơ quan lưu giữ chủng giống của Mỹ American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, U.S.A., với số truy cập PTA-3663. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ là kháng thể người hoặc protein gắn kết $\alpha 4\beta 7$ có sử dụng các CDR được đề xuất bởi công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2010/0254975.

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

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ để dùng trong chế phẩm là kiểu được làm tương thích với người của kháng thể Act-1 ở chuột nhất. Các phương pháp thích hợp để điều chế các kháng thể được làm tương thích với người đã được biết rõ trong lĩnh vực. Thông thường, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ được làm tương thích với người sẽ chứa chuỗi nặng chứa 3 vùng xác định hỗ trợ của chuỗi nặng (các CDR: CDR1, SEQ ID NO:8, CDR2, SEQ ID NO:9 và CDR3, SEQ ID NO:10) của kháng thể Act-1 ở chuột nhất và vùng khung chuỗi nặng thích hợp ở người; và còn chứa chuỗi nhẹ mà chứa 3 CDR của chuỗi nhẹ (CDR1, SEQ ID NO:11, CDR2, SEQ ID NO:12 và CDR3, SEQ ID NO:13) của kháng thể Act-1 chuột nhất và vùng khung chuỗi nhẹ thích hợp ở người. Kháng thể Act-1 được làm tương thích với người có thể chứa vùng khung thích hợp ở người, bao gồm vùng khung liên ứng, cùng hoặc không cùng với các phần tử thể axit amin. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin thuộc vùng khung có thể được thay bằng một axit amin khác, như axit amin ở vị trí tương ứng trên kháng thể Act-1 chuột nhất. Vùng ổn định ở người hoặc một phần của nó, nếu có mặt, có thể có nguồn gốc từ các chuỗi nhẹ κ hoặc λ , và/hoặc các chuỗi nặng γ (ví dụ, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), μ , α (ví dụ, $\alpha 1$, $\alpha 2$), δ hoặc ϵ của các kháng thể người, bao gồm các biến thể alen. Một vùng ổn định cụ thể (ví dụ như IgG1), các biến thể hoặc các phần của nó có thể được dùng để biến đổi chức năng cảm ứng. Ví dụ, vùng ổn định đã được đột biến (biến thể) có thể được kết hợp vào protein dung hợp để làm giảm đến mức tối thiểu khả năng gắn kết với các thụ thể Fc và/hoặc khả năng cố định bổ thể (xem ví dụ, patent Anh số GB 2,209,757 B

của Winter và đồng tác giả; công bố WO 89/07142 của Morrison và đồng tác giả,;, WO 94/29351, Dec. 22, 1994 của Morgan và đồng tác giả). Các kiểu kháng thể Act-1 đã được làm tương thích với người được mô tả trong các công bố PCT số WO98/06248 và WO07/61679, toàn bộ nội dung của từng tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

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

Các thay thế khác đối với trình tự kháng thể có thể là, ví dụ, đột biến ở vùng khung chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, như đột biến của isoleuxin thành valin ở gốc 2 của SEQ ID NO:14; đột biến của methionin thành valin ở gốc 4 của SEQ ID NO:14; đột biến của alanin thành glyxin ở gốc 24 của SEQ ID NO:15; đột biến của arginin thành lysin ở gốc 38 của SEQ ID NO:15; đột biến của alanin thành arginin ở gốc 40 của SEQ ID NO:15; đột biến của methionin thành isoleuxin ở gốc 48 của SEQ ID NO:15; đột biến của isoleuxin thành leuxin ở gốc 69 của SEQ ID NO:15; đột biến của arginin thành valin ở gốc 71 của SEQ ID NO:15; đột biến của threonin thành isoleuxin ở gốc

73 của SEQ ID NO:15; hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng; và thay thế các CDR chuỗi nặng bằng các CDR (CDR1, SEQ ID NO:8, CDR2, SEQ ID NO:9 và CDR3, SEQ ID NO:10) của kháng thể Act-1 ở chuột nhắt; và sự thay thế các CDR chuỗi nhẹ bằng CDR chuỗi nhẹ (CDR1, SEQ ID NO:11, CDR2, SEQ ID NO:12 và CDR3, SEQ ID NO:13) của kháng thể Act-1 của chuột nhắt.

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

Các kháng thể $\alpha 4\beta 7$ khác cũng có thể được sử dụng trong chế phẩm này và các phác đồ liệu nêu trong bản mô tả. Ví dụ, các kháng thể $\alpha 4\beta 7$ được mô tả trong US 2010/0254975 (Amgen, Inc.), toàn bộ nội dung của tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn, thích hợp để dùng trong các chế phẩm và phương pháp điều trị bệnh viêm ruột ở cá thể.

Kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể được tạo ra bằng cách biểu hiện các trình tự axit nucleic mã hoá mỗi chuỗi trong tế bào sống, ví dụ, tế bào trong giống cấy. Nhiều loại hệ thống vật truyền biểu hiện vật chủ có thể được sử dụng để biểu hiện phân tử kháng thể theo sáng chế. Các hệ thống biểu hiện vật chủ là chất dẫn thuốc mà nhờ nó các trình tự mã hóa quan tâm có thể được sản xuất và được tinh chế sau đó, nhưng cũng là tế bào mà có thể biểu hiện kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ in situ, khi được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm với các trình tự mã hóa nucleotit thích hợp. Các hệ thống này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các vi sinh vật như vi khuẩn (ví dụ, *E. coli*, *B. subtilis*) được biến nạp với các vật truyền biểu hiện ADN thể thực khuẩn vi khuẩn, ADN plasmid hoặc ADN cosmit tái tổ hợp chứa các trình tự mã hóa kháng thể; nấm men (ví dụ, *Saccharomyces*, *Pichia*) được biến nạp với các vật truyền biểu hiện nấm men tái tổ hợp chứa các trình tự mã hóa kháng thể; hệ tế bào côn trùng được gây nhiễm với các

vật truyền biểu hiện virus tái tổ hợp (ví dụ, baculovirus) chứa các trình tự mã hóa kháng thể; hệ tế bào thực vật được gây nhiễm với các vật truyền biểu hiện virus tái tổ hợp (ví dụ, virus gây bệnh đốm ở súp lơ (cauliflower mosaic virus – CaMV); virus khảm thuốc lá (tobacco mosaic virus - TMV) hoặc được biến nạp với các vật truyền biểu hiện plasmid tái tổ hợp (ví dụ, Ti plasmid) chứa các trình tự mã hóa kháng thể; hoặc hệ tế bào động vật có vú (ví dụ, tế bào COS, CHO, BHK, 293, 3T3, NS0) chứa cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp chứa đoạn khởi đầu có nguồn gốc từ bộ gen của tế bào động vật có vú (ví dụ, đoạn khởi đầu metallothionein) hoặc virus từ động vật có vú (ví dụ, đoạn khởi đầu muện adenovirus; đoạn khởi đầu 7,5K ở virus gây bệnh đậu mùa). Ví dụ, tế bào động vật có vú như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary cells - CHO), cùng với vật truyền như yếu tố khởi đầu sớm là hợp chất trung gian chính từ cytomegalovirus người, là hệ biểu hiện hữu hiệu các kháng thể (Foecking *et al.*, *Gen* 45:101 (1986); Cockett *et al.*, *Bio/Technology* 8:2 (1990)).

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

Trong hệ côn trùng, virus đa diện nhân *Autographa californica* (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus - AcNPV) được sử dụng làm vật truyền để biểu

hiện gen lạ. Virut này phát triển trong tế bào *Spodoptera frugiperda*. Trình tự mã hóa kháng thể có thể được tách dòng riêng biệt thành vùng không thiết yếu (ví dụ gen polyhedrin) của virut và được đặt dưới sự kiểm soát của đoạn khởi đầu AcNPV (ví dụ đoạn khởi đầu polyhedrin).

Ở các tế bào chủ động vật có vú, có thể sử dụng một số hệ biểu hiện trên cơ sở virut. Trong các trường hợp ở đó adenovirut được sử dụng làm vật truyền biểu hiện, trình tự mã hóa kháng thể quan tâm có thể được gắn vào một phức hợp điều khiển phiên mã/dịch mã ở adenovirut, ví dụ, đoạn khởi đầu muộn và trình tự dẫn đầu chạc ba. Sau đó, gen khảm này có thể được xen vào bộ gen adenovirut bằng cách tái tổ hợp *in vitro* hoặc *in vivo*. Việc cài xen vào vùng không thiết yếu của bộ gen virut (ví dụ, vùng E1 hoặc E3) sẽ tạo ra virut tái tổ hợp sống sót và có khả năng biểu hiện phân tử kháng thể ở các vật chủ được cấy nhiễm (ví dụ, xem Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359 (1984)). Tín hiệu khởi đầu đặc hiệu cũng có thể được yêu cầu để dịch mã có hiệu quả các trình tự mã hóa kháng thể đã được cài xen. Các tín hiệu này bao gồm codon khởi đầu ATG và các trình tự liền kề. Hơn nữa, codon khởi đầu này cần phải cùng pha với khung đọc của trình tự mã hóa mong muốn để đảm bảo dịch mã toàn bộ đoạn cài xen. Các tín hiệu điều khiển dịch mã ngoại sinh và các codon khởi đầu có thể có nhiều nguồn gốc, cả tự nhiên và tổng hợp. Hiệu quả biểu hiện có thể được gia tăng do bao gồm các yếu tố tăng cường phiên mã thích hợp, trình tự kết thúc phiên mã, v.v.. (xem: Bittner *et al. Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987)).

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

người (ví dụ, Hep G2), dòng tế bào ung thư vú như, ví dụ, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 và T47D, và dòng tế bào tuyến vú bình thường như, Ví dụ, CRL7030 và Hs578Bst.

Bộ máy glycosyl hoá của các loại tế bào khác nhau có thể tạo ra các kháng thể với hợp phần glycosyl hoá khác với hợp phần ở các loại tế bào khác, hoặc các loại tế bào không có sự glycosyl hoá, như tế bào vi khuẩn. Theo một khía cạnh, các loại tế bào dùng để sản xuất kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ là tế bào động vật có vú, như tế bào NS0 hoặc CHO. Theo một khía cạnh, tế bào động vật có vú có thể bao gồm khuyết đoạn của enzym tham gia vào quá trình trao đổi chất của tế bào và gen ngoại sinh đáng quan tâm có thể liên kết có điều khiển với enzym thay thế, ví dụ, trong cấu trúc hoặc vật truyền để đưa vào tế bào, ví dụ, bằng cách biến nạp hoặc chuyển nhiễm. Cấu trúc hoặc vật truyền với gen ngoại sinh này tạo cho tế bào mà có cấu trúc hoặc vật truyền này một lợi thế lựa chọn để khuyến khích sự sản xuất polypeptit được mã hoá bởi gen ngoại sinh này. Theo một phương án, tế bào CHO là tế bào DG44 (Chasin và Urlaub (1980) *PNAS USA* 77:4216) có gen dihydrofolat reductaza bị khuyết đoạn hoặc làm mất hoạt tính. Theo một phương án khác, tế bào CHO là tế bào CHO K1 có gen glutamin syntaza bị khuyết đoạn hoặc làm mất hoạt tính (xem, patent Mỹ số 5,122,464 hoặc 5,827,739 chẳng hạn).

Chế phẩm rắn

Chế phẩm rắn theo sáng chế thường được bào chế bằng cách làm khô chế phẩm lỏng. Phương pháp làm khô thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng, như đông khô hoặc làm khô phun. Theo một khía cạnh, chất bảo vệ đông khô được thêm vào chế phẩm trước khi đông khô. Bước đông khô bao gồm làm lạnh chế phẩm lỏng, thường trong dụng cụ chứa sẽ được dùng để bảo quản, vận chuyển và phân phối chế phẩm (ví dụ, lọ, xy lanh (ví dụ, xy lanh gồm một hoặc hai ngăn), hoặc hộp (ví dụ, hộp gồm một hoặc hai ngăn) (Xem tài liệu: Gatlin and Nail, *Protein Protein Purification Engineering*, ed. Roger G. Harrison, Marcel Dekker Inc., 317-367 (1994) chẳng hạn). Khi chế phẩm được làm lạnh, áp suất khí quyển giảm và nhiệt độ được điều chỉnh để cho phép loại bỏ dung môi đã làm lạnh, ví dụ, bằng cách làm thăng hoa. Bước này trong quy trình đông khô đôi khi còn được gọi là làm khô sơ bộ. Nếu cần, nhiệt độ có thể được tăng lên sau đó để loại bỏ dung môi bất kỳ vẫn liên kết với chế phẩm khô bằng cách làm bay hơi. Bước này trong quy trình đông khô đôi khi còn được gọi là làm khô thứ cấp.

Khi chế phẩm đạt đến độ khô mong muốn, quy trình làm khô kết thúc và dụng cụ chứa được đậy kín. Chế phẩm rắn cuối đôi khi còn được gọi là “chế phẩm đông khô” hoặc “bánh”. Quy trình đông khô có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị thích hợp bất kỳ. Thiết bị đông khô thích hợp sẵn có từ một số nguồn thương mại (ví dụ, SP Scientific, Stone Ridge, NY).

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

Nhiệt độ và lượng chân không thích hợp để làm khô sơ bộ và thứ cấp có thể được xác định dễ dàng bởi chuyên gia trung bình trong lĩnh vực. Nhìn chung, chế phẩm được làm lạnh ở nhiệt độ khoảng -30°C hoặc thấp hơn, như -40°C hoặc -50°C . Tốc độ làm nguội có thể ảnh hưởng đến lượng và kích cỡ của tinh thể đá trong chất gian bào. Làm khô sơ bộ thường được thực hiện ở nhiệt độ ấm hơn khoảng 10°C , khoảng 20°C , khoảng 30°C , khoảng 40°C hoặc khoảng 50°C so với nhiệt độ làm lạnh. Theo một khía cạnh, các điều kiện làm khô sơ bộ có thể được đặt để giữ cho kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ ở dưới nhiệt độ chuyển trạng thái thủy tinh hoặc nhiệt độ xếp của chế phẩm. Ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ xếp, chất gian bào đã được làm lạnh ở trạng thái vô định hình có thể chảy (xếp), khiến cho các phân tử protein có thể không được bao quanh bởi chất gian bào cứng và rắn, và các phân tử protein có thể không ổn định trong chất gian bào đã bị xếp. Ngoài ra, có thể khó làm khô hoàn toàn chế phẩm nếu xảy ra xếp. Lượng ẩm cao hơn tạo ra trong chế phẩm có thể dẫn đến tốc độ thoái hóa protein cao hơn và quãng thời gian mà sản phẩm đông khô có thể được bảo quản trước khi chất lượng của nó giảm đến mức không chấp nhận được là giảm. Theo một khía cạnh, nhiệt độ của kệ và áp suất khoang được chọn lọc để duy trì nhiệt độ sản phẩm thấp hơn nhiệt độ xếp trong quá trình làm khô sơ bộ. Nhiệt độ chuyển trạng thái thủy tinh của chế phẩm đã làm lạnh có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết

trong lĩnh vực, ví dụ, bằng phương pháp phân tích nhiệt lượng bằng tia quét vi sai (DSC). Nhiệt độ xẹp có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, ví dụ phương pháp soi kính hiển vi đông khô, phương pháp chụp bằng tia X theo lớp cổ kết quang học. Bước làm khô có thể loại bỏ ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70% dung môi hoặc nhiều hơn. Theo một khía cạnh, bước làm khô sơ bộ loại bỏ nhiều hơn 80% dung môi ra khỏi chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

Kích cỡ lọ có thể được chọn dựa trên diện tích bề mặt sẽ được tiếp xúc với kệ và với chân không trong quá trình đông khô. Thời gian làm khô tỷ lệ tuyến tính với chiều cao bánh, do vậy kích cỡ lọ có thể được chọn dựa trên chiều cao bánh mà được xác định là hợp lý. Lọ có đường kính lớn so với thể tích có thể tạo ra mức tiếp xúc cao với kệ để truyền nhiệt hữu hiệu trong chu trình đông khô. Dung dịch kháng thể loãng trong thể tích lớn chất lỏng sẽ cần nhiều thời gian hơn để làm khô. Sự cân xứng giữa kích cỡ lọ và thể tích chế phẩm cần phải được tính đến, do lọ lớn hơn có thể tốn chi phí hơn để bảo quản và vận chuyển và có khoảng không lớn hơn tỷ lệ bào chế, và có thể bộc lộ tỷ lệ chế phẩm cao do sự giảm độ ẩm khi bảo quản trong thời gian dài. Đối với liều lượng 165mg, kích cỡ lọ chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể là 3ml, 5ml hoặc 10ml. Theo một khía cạnh, kích cỡ lọ là 5ml đối với dung dịch 160mg/ml.

Nguyên tắc để chọn kích cỡ hộp hoặc xy lanh để đông khô tương tự với nguyên tắc để chọn kích cỡ lọ. Độ dày của chiều cao bánh lọc cũng sẽ làm tăng thời gian làm khô khi chiều cao tăng. Đường kính và kích cỡ của xy lanh hoặc hộp cần phải cân bằng với thể tích cuối của chế phẩm. Đường kính lớn hơn có thể làm tăng tỷ lệ hấp thu ẩm trong bánh đông khô, vì vậy làm tăng tác dụng thoái biến của độ ẩm trong quá trình bảo quản. Đối với liều lượng 165mg, thể tích chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể là 1ml hoặc 2ml. Theo một khía cạnh, kích cỡ xy lanh hoặc hộp lớn hơn 1ml đối với dung dịch 160mg/ml.

Sau khi đông khô, lọ, xy lanh, hoặc hộp có thể được đậy kín, ví dụ, được nút, trong chân không. Theo cách khác, khí, ví dụ, không khí khô hoặc nitơ, có thể được đưa vào dụng cụ chứa trước khi đậy kín. Khi quan tâm đến sự oxy hoá, khí được đưa vào khoang đông khô có thể bao gồm khí làm chậm hoặc ngăn ngừa sự oxy hoá sản phẩm đông khô. Theo một khía cạnh, các khí này là khí không được oxy hóa, ví dụ, nitơ, hoặc khí trơ, ví dụ, heli, neon, argon, krypton hoặc xenon. Theo một khía cạnh khác, khí này là nitơ hoặc argon.

Điều trị bằng chế phẩm kháng thể

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn ở vật chủ bao gồm bước cho đối tượng sử dụng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ nêu trong bản mô tả với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn, ví dụ, ở người. Đối tượng người có thể là người trưởng thành (ví dụ, 18 tuổi hoặc lớn hơn), thanh thiếu niên, hoặc trẻ em. Đối tượng người có thể là người 65 tuổi hoặc già hơn. Trái với các phác đồ liều điều trị khác, đối tượng người 65 tuổi hoặc già hơn không cần sự thay đổi bất kỳ về phác đồ liều nêu trong bản mô tả, và có thể được cho dùng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ thông thường nêu trong bản mô tả.

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

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

Chất đối kháng TNF- α là chất ức chế hoạt tính sinh học của TNF- α , và tốt hơn là gắn kết TNF- α , như kháng thể đơn dòng, ví dụ, REMICADE (infliximab), HUMIRA (adalimumab), CIMZIA (certolizumab pegol), SIMPONI (golimumab) hoặc

protein dung hợp thụ thể tuần hoàn như ENBREL (etanercept) chẳng hạn. Đáp ứng không thỏa đáng với chất đối kháng TNF- α dùng để chỉ các dấu hiệu và các triệu chứng bệnh dai dẳng mặc dù đã trải qua ít nhất một phác đồ cảm ứng infliximab 5mg/kg qua đường tĩnh mạch trong 4 tuần, 2 liều cách nhau ít nhất 2 tuần; một liều 80mg adalimumab dùng qua đường dưới da, sau đó là một liều 40mg cách nhau ít nhất hai tuần; hoặc 400mg dưới da certolizumab pegol, 2 liều cách nhau ít nhất 2 tuần. Mất đáp ứng với chất đối kháng TNF- α dùng để chỉ sự tái phát của các triệu chứng trong quá trình duy trì liều sau khi thu được lợi ích lâm sàng trước đó. Sự không dung nạp chất đối kháng TNF- α bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở phản ứng liên quan đến tiêm truyền, demyelination, bệnh suy tim do xung huyết, và/hoặc nhiễm khuẩn.

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

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

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

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

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

Theo một phương án, bệnh có thể được điều trị như vậy bao gồm bệnh viêm ruột (IBD), như viêm loét đại tràng, bệnh Crohn, chứng viêm ruột hồi, bệnh ia chảy mỡ, bệnh ia chảy mỡ (bệnh Celiac), bệnh đường ruột liên quan đến bệnh khớp nhiễm khuẩn huyết thanh âm tính, bệnh viêm ruột kết kính hiển vi hoặc bệnh viêm ruột kết collagen, bệnh viêm dạ dày ưa eosin, hoặc bệnh pouchitis sau khi phẫu thuật đại trực tràng, và phẫu thuật nối thông hồi tràng-hậu môn. Theo một số phương án, bệnh viêm ruột là bệnh Crohn hoặc bệnh viêm loét đại tràng. Bệnh viêm loét đại tràng có thể ở mức độ viêm loét đại tràng từ vừa phải đến nghiêm trọng. Việc điều trị có thể làm lành niêm mạc ở các bệnh nhân bị viêm loét đại tràng ở mức độ từ vừa phải đến nghiêm

trọng. Việc điều trị cũng có thể làm giảm, loại bỏ, hoặc làm giảm và loại bỏ việc sử dụng corticosteroid bởi bệnh nhân.

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

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

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ức chế hiện tượng thâm nhiễm bạch cầu của mô niêm mạc. Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị ung thư (ví dụ, khối u dương tính $\alpha 4\beta 7$, như u lympho). Ví dụ khác về các bệnh viêm nhiễm liên quan đến niêm

mạc mô có thể được xử lý bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế bao gồm chứng viêm vú (tuyến vú) và hội chứng ruột dễ bị kích thích.

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

Chế phẩm theo sáng chế được dùng với lượng hữu hiệu ức chế việc gắn kết giữa integrin $\alpha 4\beta 7$ với phối tử của nó. Để điều trị, lượng hữu hiệu sẽ đủ để đạt được tác dụng trị liệu (bao gồm phòng ngừa) mong muốn (như lượng đủ để làm giảm hoặc ngăn ngừa việc gắn kết qua trung gian integrin $\alpha 4\beta 7$ và/hoặc việc truyền tín hiệu, bằng cách đó ức chế sự bám dính và thâm nhiễm bạch cầu và/hoặc đáp ứng tế bào có liên quan). Lượng hữu hiệu kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, ví dụ, hiệu giá hữu hiệu đủ để duy trì trạng thái bão hòa, ví dụ, trung hòa, của integrin $\alpha 4\beta 7$, có thể gây ra đáp ứng lâm sàng hoặc sự thuyên giảm bệnh viêm ruột. Lượng hữu hiệu của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể làm lành niêm mạc trong viêm loét đại tràng hoặc bệnh Crohn. Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng ở dạng liều đơn vị hoặc đa liều. Liều dùng có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực và có thể phụ thuộc, ví dụ, vào tuổi của cá thể, độ nhạy cảm, sự nhờn thuốc và tình trạng sức khỏe nói chung. Ví dụ về phương thức sử dụng bao gồm dùng tại chỗ như qua mũi hoặc dùng bằng cách hít hoặc dùng qua da, đường tiêu hoá, như qua ống xông hoặc thuốc đạn, và dùng ngoài đường tiêu hoá, như trong tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm dưới da, tiêm trong động mạch, trong màng bụng, hoặc dùng trong dịch kính. Các liều lượng thích hợp đối với các kháng thể có thể nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg thể trọng đến 10,0mg/kg thể trọng trong mỗi lần điều trị, ví dụ nằm trong khoảng từ 2mg/kg đến 7mg/kg, nằm trong khoảng từ 3mg/kg đến 6mg/kg, hoặc nằm trong khoảng từ 3,5mg/kg đến 5mg/kg. Theo các phương án cụ thể, liều lượng được dùng bằng khoảng 0,3mg/kg, khoảng 0,5mg/kg, khoảng 1mg/kg, khoảng 2mg/kg, khoảng 3mg/kg, khoảng 4mg/kg, khoảng 5mg/kg, khoảng 6mg/kg, khoảng 7mg/kg, khoảng 8mg/kg, khoảng 9mg/kg, hoặc khoảng 10mg/kg. Tổng liều lượng có thể bằng khoảng 22mg, khoảng 50mg, khoảng 72mg, khoảng 125mg, khoảng 165mg, hoặc khoảng 432mg. Tổng liều lượng có thể ít nhất là 77mg, ít nhất là 125mg hoặc ít nhất là 356mg. Theo một phương án, tổng liều lượng là 165mg. Theo một

phương án khác, tổng liều lượng là 108mg. Theo một phương án khác, tổng liều lượng là 216mg.

Việc tạo mẫu và mô phỏng (phần mềm BERKELEY MADONNA™, do University of California cung cấp) bằng cách sử dụng dữ liệu dược động học (PK) từ các nghiên cứu về tính sẵn có của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ theo thời gian sau khi sử dụng có thể quyết định phác đồ liều tiềm năng để tiêm dưới da hoặc tiêm bắp. Dữ liệu PK có thể được đánh giá cho phác đồ cảm ứng và phác đồ duy trì. Một phương pháp tạo mẫu khác là phân tích quần thể dược động học/dược lực học (NONMEM® - công cụ tạo mẫu hiệu quả kết hợp phi tuyến tính, do ICON plc, Dublin, Ireland cung cấp). Cả mức bộc lộ và mức thấp nhất trong huyết thanh có thể được phân tích.

Thông thường, sau khi đạt được trạng thái bão hòa đích, ví dụ, integrin $\alpha 4\beta 7$, thì nồng độ kháng thể trong máu có mối quan hệ tuyến tính với liều được dùng. Kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ được dùng bằng cách tiêm dưới da hoặc tiêm bắp có độ sinh khả dụng nằm trong khoảng từ 60% đến 90% độ sinh khả dụng của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ được dùng qua đường tĩnh mạch. Ví dụ về mối quan hệ này, nếu giả thiết một liều trong tĩnh mạch có độ sinh khả dụng là 100% và nhận thấy một liều dùng qua đường dưới da có độ sinh khả dụng là 69,5%, thì liều trong tĩnh mạch 300mg có thể tương ứng với liều 432mg dùng qua đường dưới da. Do đó, liều 150mg dùng qua đường tĩnh mạch có thể tương ứng với liều 216mg dùng qua đường dưới da ở độ sinh khả dụng tương đối là 69,5%. Tương tự, nếu nhận thấy liều dùng qua đường dưới da có độ sinh khả dụng là 75% và liều tiêm bắp có độ sinh khả dụng là 80%, thì để tương ứng với liều 300mg dùng qua đường tĩnh mạch, liều dùng qua đường dưới da có thể là 400mg và liều tiêm bắp có thể là 375mg. Các bảng 40 đến 43 trong các ví dụ minh họa các mối tương quan này và đưa ra các liều lượng và phác đồ liều hữu ích của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

Theo một số khía cạnh, phác đồ liều có hai giai đoạn, giai đoạn cảm ứng và giai đoạn duy trì. Trong giai đoạn cảm ứng, kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng theo cách nhanh chóng tạo ra lượng hữu hiệu kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó thích hợp cho các mục đích nhất định, như gây ra tính chống miễn dịch ở kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó hoặc gây ra đáp ứng lâm sàng và cải thiện các triệu chứng của bệnh viêm ruột. Bệnh nhân có thể áp dụng quy trình điều trị giai đoạn cảm ứng khi lần đầu tiên được điều trị bằng kháng thể

kháng $\alpha 4\beta 7$, khi được điều trị sau khi không điều trị trong thời gian dài, ví dụ, dài hơn ba tháng, dài hơn bốn tháng, dài hơn sáu tháng, dài hơn chín tháng, dài hơn một năm, dài hơn mười tám tháng hoặc dài hơn hai năm kể từ khi điều trị bằng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ hoặc trong suốt giai đoạn duy trì điều trị bằng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ nếu xuất hiện lại các triệu chứng bệnh viêm ruột, ví dụ, tái phát sau khi thuyên giảm bệnh. Theo một số phương án, phác đồ giai đoạn cảm ứng tạo ra nồng độ thấp nhất trong huyết thanh trung bình là cao hơn, ví dụ, nồng độ ngay trước liều lượng tiếp theo, so với nồng độ huyết thanh ở trạng thái ổn định trung bình được duy trì trong phác đồ duy trì.

Trong giai đoạn duy trì, kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng theo cách duy trì đáp ứng đạt được bằng cách điều trị cảm ứng bằng kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở mức ổn định. Phác đồ duy trì có thể ngăn ngừa hiện tượng tái phát các triệu chứng hoặc sự tái phát bệnh viêm ruột. Phác đồ duy trì có thể mang lại sự thuận tiện cho bệnh nhân, chẳng hạn như, phác đồ duy trì là phác đồ liều đơn giản hoặc yêu cầu việc điều trị kém thường xuyên hơn. Theo một số phương án, phác đồ duy trì có thể bao gồm bước sử dụng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, ví dụ, ở dạng chế phẩm nêu trong bản mô tả, theo cách định trước được chọn từ nhóm bao gồm liều lượng thấp, sử dụng không thường xuyên, tự sử dụng và kết hợp các cách này.

Theo một phương án, ví dụ, trong giai đoạn điều trị cảm ứng, phác đồ liều tạo ra lượng hữu hiệu kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên trong chế phẩm nêu trong bản mô tả dùng để làm thuyên giảm bệnh viêm ruột ở người bệnh. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ đủ để đạt được nồng độ trung bình thấp nhất của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ trong huyết thanh ở cuối giai đoạn cảm ứng nằm trong khoảng từ $5\mu\text{g/ml}$ đến $60\mu\text{g/ml}$, nằm trong khoảng từ $15\mu\text{g/ml}$ đến $45\mu\text{g/ml}$, nằm trong khoảng từ $20\mu\text{g/ml}$ đến $30\mu\text{g/ml}$, hoặc nằm trong khoảng từ $25\mu\text{g/ml}$ đến $35\mu\text{g/ml}$. Khoảng thời gian của giai đoạn cảm ứng có thể là khoảng bốn tuần, khoảng năm tuần, khoảng sáu tuần, khoảng bảy tuần, hoặc khoảng tám tuần điều trị. Theo một số phương án, phác đồ cảm ứng có thể sử dụng chế độ được chọn từ nhóm bao gồm liều cao, sử dụng thường xuyên, và tổ hợp gồm liều cao và sử dụng thường xuyên kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, ví dụ, ở dạng chế phẩm nêu trong bản mô tả. Liều cảm ứng có thể là một, hoặc nhiều hơn một liều, ví dụ, ít nhất hai liều. Trong toàn bộ giai đoạn cảm ứng, liều có thể được dùng

một lần mỗi ngày, hai ngày một lần, hai lần một tuần, một lần một tuần, mười ngày một lần, hai tuần một lần hoặc ba tuần một lần. Theo một số phương án, liều cảm ứng được dùng trong vòng hai tuần đầu tiên của quá trình điều trị bằng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một phương án, việc phân liều cảm ứng có thể là một lần vào lúc bắt đầu điều trị (ngày 0) và một lần vào khoảng hai tuần sau khi bắt đầu điều trị. Theo một phương án khác, giai đoạn cảm ứng kéo dài trong sáu tuần. Theo một phương án khác, giai đoạn cảm ứng kéo dài trong sáu tuần và một số lượng lớn liều cảm ứng được dùng trong hai tuần đầu tiên.

Theo một số phương án, ví dụ, khi bắt đầu điều trị bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột nghiêm trọng (ví dụ, ở các bệnh nhân không điều trị được bằng kháng TNF α), giai đoạn cảm ứng cần phải có khoảng thời gian dài hơn so với các bệnh nhân mắc bệnh ở mức độ nhẹ hoặc vừa phải. Theo một số phương án, giai đoạn cảm ứng đối với bệnh nhân mắc bệnh nghiêm trọng có thể kéo dài trong khoảng thời gian ít nhất 6 tuần, ít nhất 8 tuần, ít nhất 10 tuần, ít nhất 12 tuần hoặc ít nhất 14 tuần. Theo một phương án, phác đồ liều cảm ứng đối với bệnh nhân mắc bệnh nghiêm trọng có thể bao gồm một liều ở tuần 0 (bắt đầu điều trị), một liều ở tuần 2 và một liều ở tuần 6. Theo một phương án khác, phác đồ liều cảm ứng đối với bệnh nhân mắc bệnh nghiêm trọng có thể bao gồm một liều ở tuần 0 (bắt đầu điều trị), một liều ở tuần 2, một liều ở tuần 6 và một liều ở tuần 10.

Theo một phương án, ví dụ, trong giai đoạn duy trì điều trị, phác đồ liều duy trì nồng độ huyết thanh ở trạng thái ổn định trung bình, ví dụ, nồng độ bình ổn ngay trước liều lượng tiếp theo, nằm trong khoảng từ 5 μ g/ml đến 25 μ g/ml, từ 7 μ g/ml đến 20 μ g/ml, từ 5 μ g/ml đến 10 μ g/ml, từ khoảng 10 đến 20 μ g/ml, từ khoảng 15 μ g/ml đến 25 μ g/ml hoặc từ khoảng 9 μ g/ml đến 13 μ g/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một phương án khác, phác đồ liều ví dụ, trong giai đoạn duy trì của quá trình điều trị, duy trì nồng độ huyết thanh ở trạng thái ổn định trung bình nằm trong khoảng 20 μ g/ml đến 30 μ g/ml, nằm trong khoảng từ 20 μ g/ml đến 55 μ g/ml, nằm trong khoảng 30 μ g/ml đến 45 μ g/ml, nằm trong khoảng 45 μ g/ml đến 55 μ g/ml hoặc nằm trong khoảng 35 μ g/ml đến 40 μ g/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một phương án khác, phác đồ liều ví dụ, trong giai đoạn duy trì điều trị, duy trì nồng độ trung bình trong huyết thanh trong khoảng thời gian dài, ví dụ, tiếp xúc (ví dụ, diện tích dưới đường cong - nồng độ-thời

gian) nằm trong khoảng từ 15µg/ml đến 40µg/ml, nằm trong khoảng từ 10µg/ml đến 50µg/ml, nằm trong khoảng 18µg/ml đến 26µg/ml, hoặc nằm trong khoảng từ 22µg/ml đến 33µg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một phương án khác nữa, phác đồ liều ví dụ, trong quá trình điều trị duy trì, duy trì nồng độ trung bình trong huyết thanh trong khoảng thời gian dài, ví dụ, tiếp xúc (ví dụ, diện tích dưới đường cong - nồng độ-thời gian) từ khoảng 35µg/ml đến 90µg/ml, nằm trong khoảng từ 45µg/ml đến 75µg/ml, khoảng 52µg/ml đến 60µg/ml hoặc khoảng 50µg/ml đến 65µg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

Dạng liều cuối cùng có thể bao gồm liều toàn vẹn trong khoảng 0,5ml, trong khoảng 1ml, trong khoảng 1,5ml, trong khoảng 2ml, trong khoảng 2,5ml, trong khoảng 3ml chế phẩm kháng thể.

Dạng liều cuối cùng để dùng trong tĩnh mạch có thể là nồng độ nằm trong khoảng từ 1,0mg/ml đến 1,4mg/ml, trong khoảng từ 1,0mg/ml đến 1,3mg/ml, trong khoảng từ 1,0mg/ml đến 1,2mg/ml, trong khoảng từ 1,0mg/ml đến 1,1mg/ml, trong khoảng từ 1,1mg/ml đến 1,4mg/ml, trong khoảng từ 1,1mg/ml đến 1,3mg/ml, trong khoảng từ 1,1mg/ml đến 1,2mg/ml, trong khoảng từ 1,2mg/ml đến 1,4mg/ml, trong khoảng từ 1,2mg/ml đến 1,3mg/ml, hoặc trong khoảng từ 1,3mg/ml đến 1,4mg/ml. Dạng liều cuối cùng có thể là khoảng 0,6mg/ml, 0,8mg/ml, 1,0mg/ml, 1,1mg/ml, khoảng 1,2mg/ml, khoảng 1,3mg/ml, khoảng 1,4mg/ml, khoảng 1,5mg/ml, khoảng 1,6mg/ml, khoảng 1,8mg/ml hoặc khoảng 2,0mg/ml.

Liều có thể được dùng mỗi tuần một lần, 2 tuần một lần, 3 tuần một lần, 4 tuần một lần, 6 tuần một lần, 8 tuần một lần hoặc 10 tuần một lần. Liều lượng cao hơn hoặc thường xuyên hơn, ví dụ, hai ngày một lần, mỗi tuần một lần, 2 tuần một lần, 3 tuần một lần hoặc 4 tuần một lần có thể là hữu hiệu để làm thuyên giảm bệnh hoặc để điều trị cho bệnh nhân mới, ví dụ, để gây ra sự dung nạp đối với kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Liều 2 tuần một lần, 3 tuần một lần, 4 tuần một lần, 5 tuần một lần, 6 tuần một lần, 8 tuần một lần hoặc 10 tuần một lần, có thể là hữu hiệu cho điều trị phòng ngừa, ví dụ, để duy trì sự thuyên giảm ở bệnh nhân mắc bệnh mạn tính. Theo một khía cạnh, phác đồ điều trị là điều trị ở ngày 0, khoảng tuần thứ 2, khoảng tuần thứ 6 và sau đó cứ 1 hoặc 2 tuần một lần. Theo một khía cạnh khác, phác đồ điều trị cảm ứng là điều trị hai ngày một lần với tổng số 6 lần điều trị.

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

Theo một số khía cạnh, thuyên giảm lâm sàng lâu bền, ví dụ, thuyên giảm lâm sàng được duy trì liên tục qua ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn lần thăm khám đồng thời với sự chăm sóc của bác sỹ điều trị trong vòng 6 tháng hoặc một năm sau khi bắt đầu điều trị, có thể đạt được bằng phác đồ liệu đã được tối ưu hóa.

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

Chế phẩm có thể được dùng dưới da bằng một hoặc nhiều liều tiêm. Ví dụ, thể tích của một liều tiêm có thể nằm trong khoảng từ 0,5ml đến 3ml. Theo một phương án, thể tích của một liều tiêm có thể nằm trong khoảng từ 0,6ml đến 1,1ml hoặc nằm trong khoảng từ 1ml đến 3ml. Theo một khía cạnh, thể tích của một liều tiêm bằng khoảng 1ml. Cỡ kim tiêm được dùng để tiêm chế phẩm dưới da có thể bằng khoảng 25, khoảng 26, khoảng 27, khoảng 28, khoảng 29 hoặc khoảng 30G.

Chế phẩm có thể được dùng trong cơ bằng một liều tiêm hoặc nhiều liều tiêm. Ví dụ, thể tích của một liều tiêm có thể nằm trong khoảng từ 0,5ml đến 5ml. Theo một phương án, thể tích của một liều tiêm có thể từ khoảng 2ml đến 5ml, khoảng 0,6ml đến 1,1ml hoặc khoảng 1ml đến 3ml. Theo một khía cạnh, thể tích của một liều tiêm bằng khoảng 1ml, khoảng 2ml, khoảng 3ml, khoảng 4ml, hoặc khoảng 5ml. Kim tiêm được sử dụng để dùng chế phẩm trong cơ có thể bằng khoảng 5/8", khoảng 7/8", khoảng 1", khoảng 1,25", khoảng 1,5", khoảng 2", hoặc khoảng 3". Cỡ của kim tiêm có thể nằm trong khoảng từ 20 đến 22G để dùng trong cơ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho người bệnh mắc bệnh viêm ruột, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột sử dụng globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có tính đặc hiệu gắn kết với integrin $\alpha 4\beta 7$ người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng cho bệnh nhân theo phác đồ liệu sau đây: (a) liều ban đầu

165mg globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng tiêm dưới da hai ngày một lần trong 6 liều; (b) tiếp theo là liều thứ bảy và các liều tiếp theo là 165mg globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng tiêm dưới da hai tuần một lần hoặc bốn tuần một lần nếu cần thiết; trong đó phác đồ liều gây ra đáp ứng lâm sàng và thuyên giảm lâm sàng ở bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột; và ngoài ra trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu gắn kết đối với phức hợp $\alpha 4\beta 7$, trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa ba vùng xác định hỗ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ và ba vùng xác định hỗ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của các trình tự axit amin được nêu dưới đây: chuỗi nhẹ: CDR1 SEQ ID NO:9, CDR2 SEQ ID NO:10, CDR3 SEQ ID NO:11; chuỗi nặng: CDR1 SEQ ID NO:12, CDR2 SEQ ID NO:13, CDR3 SEQ ID NO:14.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị người bệnh mắc bệnh viêm ruột, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột sử dụng globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có tính đặc hiệu gắn kết với integrin $\alpha 4\beta 7$ người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên chứa vùng gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc không phải từ người và ít nhất một phần của kháng thể có nguồn gốc từ người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng cho bệnh nhân theo phác đồ liều sau đây: (a) liều ban đầu dùng qua đường tĩnh mạch là 300mg globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó dưới dạng truyền qua đường tĩnh mạch; (b) sau đó là liều tiếp theo thứ hai trong tĩnh mạch là 300mg globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó dùng qua đường tĩnh mạch ở khoảng hai tuần sau liều ban đầu; (c) tiếp theo bắt đầu ở tuần thứ sáu bởi liều thứ ba và các liều tiếp theo là 165mg globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng tiêm dưới da mỗi tuần một lần, hai tuần một lần hoặc ba tuần một lần nếu cần thiết; trong đó phác đồ liều gây ra đáp ứng lâm sàng và thuyên giảm lâm sàng ở bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột; và ngoài ra trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu gắn kết đối

với phức hợp $\alpha 4\beta 7$, trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ và ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu dưới đây: chuỗi nhẹ: CDR1 SEQ ID NO:9, CDR2 SEQ ID NO:10, CDR3 SEQ ID NO:11; chuỗi nặng: CDR1 SEQ ID NO:12, CDR2 SEQ ID NO:13, CDR3 SEQ ID NO:14.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phác đồ liệu dùng để điều trị bệnh viêm ruột, trong đó phác đồ liệu này bao gồm bước cho bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột sử dụng globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có tính đặc hiệu gắn kết với integrin $\alpha 4\beta 7$ người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên chứa vùng gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc không phải từ người và ít nhất một phần của kháng thể có nguồn gốc từ người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng cho bệnh nhân theo phác đồ liệu dùng qua đường dưới da hoặc tiêm bắp duy trì nồng độ thấp nhất trong huyết thanh ở trạng thái ổn định trung bình trong khoảng từ $9\mu\text{g/ml}$ đến $13\mu\text{g/ml}$ kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó; trong đó phác đồ liệu gây ra đáp ứng lâm sàng và thuyên giảm lâm sàng ở bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột; và ngoài ra trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu gắn kết đối với phức hợp $\alpha 4\beta 7$, trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ và ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của axit amin trình tự được nêu dưới đây: chuỗi nhẹ: CDR1 SEQ ID NO:9, CDR2 SEQ ID NO:10, CDR3 SEQ ID NO:11; chuỗi nặng: CDR1 SEQ ID NO:12, CDR2 SEQ ID NO:13, CDR3 SEQ ID NO:14.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phác đồ liệu dùng để điều trị bệnh viêm ruột, trong đó phác đồ liệu này bao gồm các bước: cho bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột sử dụng globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có tính đặc hiệu gắn kết với integrin $\alpha 4\beta 7$ người, trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên chứa vùng gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc không phải từ người và ít nhất một phần của kháng thể có nguồn gốc từ người, trong đó globulin miễn dịch được làm

tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng cho bệnh nhân theo phác đồ liều dùng qua đường dưới da hoặc tiêm bắp duy trì nồng độ thấp nhất trong huyết thanh ở trạng thái ổn định trung bình từ khoảng 35µg/ml đến 40µg/ml kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó; trong đó phác đồ liều này gây ra đáp ứng lâm sàng và thuyên giảm lâm sàng ở bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột; và ngoài ra trong đó globulin miễn dịch được làm tương thích với người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu gắn kết đối với phức hợp $\alpha 4\beta 7$, trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ và ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi trên chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu dưới đây: chuỗi nhẹ: CDR1 SEQ ID NO:9, CDR2 SEQ ID NO:10, CDR3 SEQ ID NO:11; chuỗi nặng: CDR1 SEQ ID NO:12, CDR2 SEQ ID NO:13, CDR3 SEQ ID NO:14.

Theo một số phương án, phương pháp điều trị, liều hoặc phác đồ liều làm giảm khả năng bệnh nhân sẽ phát triển đáp ứng HAHA đối với kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Sự phát triển của HAHA, ví dụ, như được xác định bởi các kháng thể phản ứng với kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, có thể làm tăng sự thanh thải của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, ví dụ, làm giảm nồng độ của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ trong huyết thanh, ví dụ, làm giảm số lượng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ liên kết với integrin $\alpha 4\beta 7$, vì vậy khiến cho quá trình điều trị kém hiệu quả. Theo một số phương án, để ngăn ngừa HAHA, bệnh nhân có thể được điều trị bằng phác đồ cảm ứng được theo sau bởi phác đồ duy trì. Theo một số phương án, không có thời gian nghỉ giữa phác đồ cảm ứng và phác đồ duy trì. Theo một số phương án, phác đồ cảm ứng bao gồm sử dụng một số lượng lớn các liều kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ cho bệnh nhân. Để ngăn ngừa HAHA, bệnh nhân có thể được điều trị bằng liều ban đầu cao, ví dụ, ít nhất 1,5mg/kg, ít nhất 2mg/kg, ít nhất 2,5mg/kg, ít nhất 3mg/kg, ít nhất 5mg/kg, ít nhất 8mg/kg, ít nhất 10mg/kg hoặc khoảng 2 đến 6mg/kg, hoặc sử dụng thường xuyên ban đầu, ví dụ, khoảng mỗi tuần một lần, khoảng hai tuần một lần hoặc khoảng ba tuần một lần, liều tiêu chuẩn khi bắt đầu điều trị bằng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một số phương án, phương pháp điều trị duy trì ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% bệnh nhân âm tính HAHA. Theo các phương án khác, phương pháp điều trị duy trì các bệnh nhân âm tính HAHA trong ít nhất 6 tuần, ít nhất 10 tuần ít nhất 15 tuần, ít nhất sáu tháng, ít nhất 1 năm, ít nhất 2 năm, hoặc trong khoảng thời gian điều trị. Theo

một số phương án, các bệnh nhân, hoặc ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50% hoặc ít nhất 60% bệnh nhân phát triển HAHA duy trì hiệu giá thấp, ví dụ, ≤ 125 , kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một phương án, phương pháp điều trị duy trì ít nhất 70% bệnh nhân âm tính HAHA trong ít nhất 12 tuần sau khi bắt đầu điều trị bằng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

Chế phẩm có thể được dùng cho một cá thể (ví dụ như người) riêng rẽ hoặc cùng với một tác nhân khác. Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng trước, cùng hoặc sau khi dùng một tác nhân khác. Theo một phương án, nhiều hơn một chế phẩm ức chế integrin $\alpha 4\beta 7$ gắn kết vào các phối tử của nó được dùng. Theo phương án này, tác nhân, ví dụ, kháng thể đơn dòng, như kháng thể đơn dòng kháng MAdCAM hoặc kháng VCAM-1 có thể được dùng. Theo một phương án khác, tác nhân khác ức chế việc gắn kết của bạch cầu vào nội mô phối tử theo con đường khác với con đường $\alpha 4\beta 7$. Tác nhân như vậy có thể ức chế việc gắn kết, ví dụ của thụ thể 9 chemokin (motif C-C) (CCR9)-biểu hiện các tế bào lympho vào chemokin (TECK hoặc CCL25) được biểu hiện ở tuyến ức hoặc một tác nhân ngăn cản việc gắn kết của LFA-1 vào phân tử bám dính gian bào (ICAM). Ví dụ, kháng thể kháng TECK hoặc kháng CCR9 hoặc chất ức chế CCR9 phân tử nhỏ, như các chất ức chế được bộc lộ trong Công bố đơn PCT WO03/099773 hoặc WO04/046092, hoặc kháng thể kháng ICAM-1 hoặc oligonucleotit ngăn ngừa sự biểu hiện của ICAM, được dùng ngoài chế phẩm theo sáng chế. Theo một phương án khác nữa, một hoạt chất khác (ví dụ, hợp chất chống viêm, như sulfasalazin, azathioprin, 6-mercaptopurin, axit 5-aminosalixylic chứa chất chống viêm, một hợp chất chống viêm phi steroid khác, một hợp chất chống viêm steroid, hoặc kháng sinh thường được dùng để phòng trừ IBD (ví dụ như ciprofloxacin, metronidazol), hoặc một tác nhân sinh học khác (ví dụ như chất đối kháng TNF alpha) có thể được dùng cùng với chế phẩm theo sáng chế.

Theo một phương án, liều lượng của thuốc được dùng cùng có thể giảm theo thời gian trong quá trình điều trị bằng chế phẩm chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Ví dụ, bệnh nhân được xử lý bằng steroid (ví dụ như prednison, prednisolon) lúc bắt đầu, hoặc trước khi, điều trị bằng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ sẽ tham gia phác đồ giảm liều steroid bắt đầu ngay từ 6 tuần điều trị bằng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Liều steroid sẽ được giảm khoảng 25% trong vòng 4 đến 8 tuần giảm dần ban đầu, giảm đi khoảng 50% vào khoảng 8 đến 12 tuần và 75% vào khoảng 12 đến 16 tuần của giai

đoạn giảm dần trong quá trình điều trị bằng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một khía cạnh, vào khoảng 16 đến 24 tuần điều trị bằng kháng $\alpha 4\beta 7$ chế phẩm kháng thể, liều steroid có thể được ngừng. Theo một ví dụ khác, bệnh nhân được xử lý bằng hợp chất chống viêm, như 6-mercaptopurin vào lúc bắt đầu, hoặc trước khi, điều trị bằng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ sẽ tham gia phác đồ giảm liều hợp chất chống viêm tương tự với phác đồ giảm dần đối với liều steroid như đã nêu trên.

Theo một phương án, phương pháp này bao gồm cho bệnh nhân dùng chế phẩm theo sáng chế dưới da hoặc trong cơ với lượng hữu hiệu. Theo một phương án khác, chế phẩm có thể được bào chế để tự dùng.

Nếu chế phẩm ở dạng chất rắn, ví dụ, trạng thái khô, quy trình sử dụng có thể bao gồm bước chuyển chế phẩm sang trạng thái lỏng. Theo một khía cạnh, chế phẩm khô có thể được hoàn nguyên, ví dụ, bằng chất lỏng nêu trên, dùng để tiêm, ví dụ trong tĩnh mạch, tiêm bắp hoặc tiêm dưới da. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm rắn hoặc khô có thể được dùng khu trú, ví dụ, ở dạng miếng dán, kem, sol khí hoặc thuốc đạn.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên quan đến hiện tượng thâm nhiễm bạch cầu của mô biểu hiện phân tử MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1). Phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ theo sáng chế. Theo một phương án, bệnh này là bệnh gây ra do vật chủ chống lại mảnh ghép. Theo một số phương án, bệnh này là bệnh liên quan đến hiện tượng thâm nhiễm bạch cầu của mô do việc gắn kết của bạch cầu biểu hiện integrin $\alpha 4\beta 7$ vào nội mô có liên quan đến ruột biểu hiện phân tử MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1). Theo các phương án khác, bệnh là viêm dạ dày (ví dụ, viêm dạ dày ưa eosin hoặc viêm dạ dày tự miễn), viêm tụy, hoặc bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin. Theo các phương án khác nữa, bệnh này là viêm túi mật, viêm đường mật, hoặc viêm quanh ống mật.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh viêm ruột ở bệnh nhân. Theo một phương án, phương pháp bao gồm cho bệnh nhân dùng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ theo sáng chế dưới da với lượng hữu hiệu. Theo một số phương án, bệnh viêm ruột là viêm loét đại tràng hoặc bệnh Crohn. Theo các phương án khác, bệnh viêm ruột là bệnh ỉa chảy mỡ, bệnh đường ruột liên quan đến bệnh khớp nhiễm khuẩn huyết

thanh âm tính, bệnh viêm ruột kết kính hiển vi hoặc bệnh viêm ruột kết collagen, viêm dạ dày ruột (ví dụ, bệnh viêm dạ dày ưa eosin), hoặc pouchitis.

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

Vật phẩm sản xuất

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vật phẩm sản xuất chứa dược phẩm theo sáng chế và hướng dẫn sử dụng nó. Vật phẩm sản xuất bao gồm dụng cụ chứa. Các dụng cụ chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, ống (ví dụ, lọ hai ngăn, lọ chế phẩm lỏng cùng với hoặc không cùng với kim tiêm, lọ chế phẩm rắn cùng với hoặc không cùng với lọ hoàn nguyên chất lỏng cùng với hoặc không cùng với kim tiêm), xy lanh (như xy lanh hai ngăn, xy lanh nạp sẵn, bơm tiêm tự động), hộp, và ống nghiệm. Dụng cụ chứa có thể được tạo ra từ nhiều nguyên liệu khác nhau như thủy tinh, kim loại hoặc chất dẻo. Dụng cụ chứa mang chế phẩm và nhãn ở trên hoặc gắn liền với dụng cụ chứa có thể chỉ ra các hướng dẫn sử dụng. Theo một phương án khác, chế phẩm có thể được bào chế để tự dùng và/hoặc chứa các hướng dẫn để tự dùng. Theo một khía cạnh, dụng cụ chứa mang chế phẩm có thể là lọ dùng một lần. Theo một khía cạnh khác, dụng cụ chứa mang chế phẩm có thể là lọ dùng nhiều lần, cho phép dùng chế phẩm lặp lại (ví dụ, dùng từ 2 đến 6 lần), ví dụ, bằng cách sử dụng nhiều hơn một phần chế phẩm được hoàn nguyên. Sản phẩm có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác mong muốn trên quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm các chất đệm, chất pha loãng, các bộ lọc, kim, xy lanh và tờ rơi với hướng dẫn sử dụng khác như đã được lưu ý trên đây.

Theo một phương án, sản phẩm là xy lanh với kim tiêm. Cỡ kim tiêm có thể là 25 G, 26 G, 27 G, 29 G, 30 G. Kim tiêm thành mỏng, chẳng hạn, 19 G hoặc 23 G, hoặc lớn hơn, có thể có lợi cho tiêm chế phẩm với độ nhót cao. Theo một khía cạnh, cỡ kim tiêm là 27 G hoặc lớn hơn. Chiều dài kim có thể thích hợp để tiêm dưới da, và

có thể dài khoảng 1/2 inso (1,27cm), khoảng 5/8 inso (1,59cm) hoặc 1 inso (2,54cm). Theo một số phương án, xy lanh là xy lanh nạp sẵn.

Phát triển sản phẩm xy lanh nạp sẵn

Theo một số khía cạnh, có một số thuộc tính sản phẩm được mong muốn đối với sản phẩm protein (ví dụ, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$) trong xy lanh nạp sẵn (pre-filled syringe - PFS) (ví dụ, để dùng trong chế phẩm để phân phối dưới da hoặc trong cơ). Điều này có ích cho việc cân bằng một số thuộc tính để làm giảm bớt hiệu ứng cạnh tranh. Ví dụ, khi một thể tích tiêm thấp được mong muốn, chế phẩm với nồng độ protein cao có thể được ưu tiên. Tuy nhiên, trong trường hợp nồng độ protein cao, tỷ lệ hình thành tạp chất có thể cao (ví dụ, tạp chất được kết tụ đi lẫn vào trong chế phẩm từ xy lanh) và cần phải có các lực điều khiển bằng tay cao hơn để vận hành xy lanh. Kích cỡ kim tiêm nhỏ được sử dụng thuận tiện cho bệnh nhân ở vị trí tiêm, có thể đòi hỏi lực lớn hơn để vận hành xy lanh. Hiểu biết về độ ổn định và hiệu suất của sản phẩm bị ảnh hưởng bởi cả chế phẩm và các thông số xy lanh như nồng độ protein, độ pH, và đường kính trong của kim tiêm giúp phát triển sản phẩm protein (ví dụ, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ trong xy lanh nạp sẵn).

Theo một khía cạnh, phương pháp phát triển sản phẩm protein (ví dụ, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$) để dùng trong xy lanh nạp sẵn bao gồm việc thay đổi các thông số xy lanh và các thông số chế phẩm cùng với nhau, ví dụ, theo cách phối hợp hoặc đồng thời. Điều này có thể dẫn đến hiểu biết tốt hơn về khoảng độ ổn định protein và hiệu quả của sản phẩm có thể mong đợi từ sản phẩm protein trong xy lanh nạp sẵn nếu mỗi thông số được thay đổi riêng rẽ hoặc theo từng đợt.

Việc phát triển của xy lanh nạp sẵn sản phẩm (ví dụ, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$) liên quan đến hiểu biết rằng tại một số điểm, chế phẩm lỏng tiếp xúc với một số hợp phần của xy lanh nạp sẵn (Hình 15). Ví dụ, chế phẩm có thể tiếp xúc với lòng xy lanh, có thể làm từ thủy tinh (ví dụ, thủy tinh bosilicat loại I) hoặc chất dẻo (ví dụ, olefin polyme mạch vòng (cyclic olefin polymer - COP), olefin copolyme mạch vòng (cyclic olefin copolymer - COC), polypropylen hoặc polytetrafloetylen). Chế phẩm có thể tiếp xúc với xy lanh, pittông và/hoặc đầu bịt, có thể đàn hồi (ví dụ, làm từ nguyên liệu giống hoặc khác nhau (ví dụ, chất dẻo, như polyetylen, polystyren hoặc polypropylen hoặc vật liệu đàn hồi, như cao su (tự nhiên, tổng hợp, butyl) hoặc silicon)). Chế phẩm

có thể tiếp xúc với chất làm trơn được thêm vào bề mặt bên trong của lòng xy lanh để tạo điều kiện cho việc dịch chuyển pittông. Chất làm trơn có thể, ví dụ, dầu silicon, dầu khoáng hoặc glycerin. Theo một phương án, kim tiêm xy lanh được gắn vào có thể là kim tiêm hợp kim (ví dụ, kim tiêm bằng thép không gỉ và một chất bám dính được sử dụng để gắn kim tiêm tại chỗ). Một cân nhắc đối với sản phẩm protein trong xy lanh nạp sẵn là ở chỗ dung dịch protein lỏng tiếp xúc trực tiếp với một hoặc nhiều hợp phần trong xy lanh trong toàn bộ thời hạn sử dụng của sản phẩm. Cả chế phẩm và hợp phần xy lanh có thể có tác động đến độ ổn định của sản phẩm.

Các thông số chế phẩm có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của sản phẩm trong xy lanh nạp sẵn bao gồm nồng độ protein, độ pH, loại dung dịch đệm, nồng độ dung dịch đệm, độ bền ion, loại chất làm ổn định, và nồng độ chất làm ổn định. Ví dụ về các chất làm ổn định đối với chế phẩm protein bao gồm, ví dụ, muối ion, polysaccharit, axit amin, các chất chống oxy hoá, chất tạo chelat, và các chất hoạt động bề mặt như được mô tả trong các phần trên.

Các hợp phần trong xy lanh có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của sản phẩm trong xy lanh nạp sẵn bao gồm, ví dụ, chất làm trơn, kết cấu của pittông và đầu bít, và tạp chất. Lượng chất làm trơn (ví dụ, dầu silicon trong lòng xy lanh) có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của sản phẩm. Kết cấu của pittông và cữ chặn, có thể ảnh hưởng đến khả năng oxy đi qua các hợp phần này và làm cho oxy từ các hợp phần này đi vào sản phẩm protein (ví dụ, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$) cũng có thể ảnh hưởng đến độ ổn định sản phẩm. Một thông số khác của xy lanh có thể ảnh hưởng đến độ ổn định sản phẩm bao gồm loại và/hoặc lượng tạp chất (ví dụ, kim loại nặng (ví dụ, vonfram)) có thể ngấm vào chế phẩm (ví dụ, từ trong lòng xy lanh (ví dụ, lòng xy lanh bằng thủy tinh) và/hoặc kim tiêm (ví dụ, kim tiêm bằng thép không gỉ)). (Cũng xem tài liệu Ludwig et al. *J.Pharm. Sci.* 99:1721-1733 (2010); Nashed-Samuel et al., *American Pharmaceutical Review* Jan/Feb:74-80 (2011); Badkar et al. *AAPS PharmSciTech* 12:564-572)

Xy lanh nạp sẵn có thể được tiêm bằng tay hoặc được dùng cùng với dụng cụ tiêm tự động. Thử nghiệm chức năng của xy lanh nạp sẵn bao gồm xác định lực bật di chuyển từ trạng thái đứng yên sang trạng thái hoạt động, lực này cần để pittông bắt đầu chuyển động, và lực trượt, lực này được cần đến để tiêm toàn bộ hỗn hợp trong xy lanh ở tốc độ không đổi. Hiệu suất cơ học của xy lanh nạp sẵn có thể phụ thuộc vào

một số thông số chế phẩm và xy lanh như độ nhớt của chế phẩm và lượng chất làm trơn (ví dụ, dầu silicon) trong xy lanh.

Một số thuộc tính của sản phẩm protein trong xy lanh nạp sẵn và các yếu tố của chế phẩm hoặc xy lanh có thể ảnh hưởng đến các thuộc tính của sản phẩm được chỉ ra trên bảng 1. Nhiều thuộc tính của sản phẩm có thể là hàm phức hợp của một số thông số chế phẩm và xy lanh. Ví dụ, lực trượt xy lanh là hàm số của độ nhớt chế phẩm, mặc dù độ nhớt có thể phụ thuộc vào một số yếu tố chế phẩm, như nồng độ protein, nồng độ chất làm ổn định, và độ pH.

Bảng 1: Các thuộc tính sản phẩm của sản phẩm protein trong các xy lanh được nạp sẵn và các thông số chế phẩm và xy lanh có thể có ảnh hưởng đến các thuộc tính này

Thuộc tính sản phẩm	Các thông số của chế phẩm protein có thể ảnh hưởng đến thuộc tính sản phẩm	Các thông số xy lanh có thể ảnh hưởng đến thuộc tính sản phẩm
Áp suất thẩm thấu	Chất ổn định nồng độ, độ pH, nồng độ protein	Không
Độ nhớt	Chất ổn định nồng độ, độ pH, nồng độ protein	Không
Lực bật và lực trượt của xy lanh	Độ nhớt, nồng độ protein, nồng độ chất hoạt động bề mặt	Tốc độ tiêm, chiều dài kim tiêm, đường kính trong của kim tiêm, đường kính trong của lòng xy lanh, lượng dầu silicon, cấu tạo và hình dạng pittông
Tỷ lệ khử amit của protein	Nồng độ chất ổn định, độ pH, nồng độ protein	Không
Tỷ lệ oxy hoá của protein	Nồng độ chất ổn định/chất chống oxy hoá, độ pH, nồng độ protein, nồng độ chất hoạt động bề mặt, oxy hòa tan	Kết cấu pittông và đầu bịt (khả năng cho oxy đi qua), lượng tạp chất kim loại nặng, kích thước bột khí
Tỷ lệ tạo kết tụ hòa tan	Nồng độ chất ổn định, độ pH, nồng độ protein, nồng độ chất hoạt động bề mặt, oxy hòa tan trong dung dịch	Lượng dầu silicon, lượng tạp chất kim loại nặng, kích thước bột khí
Tỷ lệ tạo các hạt chứa protein có thể nhìn thấy và dưới mức nhìn thấy	Nồng độ chất ổn định, độ pH, nồng độ protein, nồng độ chất hoạt động bề mặt	Lượng dầu silicon, lượng tạp chất kim loại nặng, kích thước bột khí, diện tích bề mặt bên trong xy lanh

Theo một khía cạnh, chất hoạt động bề mặt, như polysorbat 20 hoặc polysorbat 80 có thể được bổ sung vào chế phẩm protein trong xy lanh nạp sẵn (ví dụ, để ngăn ngừa các phân tử protein khỏi bị hấp phụ và biến tính ở bề mặt phân cách chất lỏng/chất khí và/hoặc chất lỏng/chất làm trơn (ví dụ, dầu silicon)). Sự hấp phụ bề mặt và sự biến tính của các phân tử protein có thể là cơ chế để cấu tạo nên hạt nhân của các hạt chứa protein ở dưới mức nhìn thấy được và nhìn thấy được. Vì vậy, việc bổ sung chất hoạt động bề mặt vào xy lanh nạp sẵn, có thể làm giảm sự tạo thành các hạt ở dưới mức nhìn thấy được và nhìn thấy được trong các sản phẩm chứa trong xy lanh nạp sẵn. Theo một phương án, một lượng nhỏ chất hoạt động bề mặt có thể nhũ hóa chất làm trơn (ví dụ, các giọt dầu silicon trong dung dịch và bằng cách đó làm giảm sự tạo thành chất làm trơn ở dưới mức nhìn thấy được và chất làm trơn nhìn thấy được (ví dụ, các giọt dầu silicon)) (xem tài liệu của Ludwig và đồng tác giả, nêu trên). Theo một phương án khác, lượng chất hoạt động bề mặt trong chế phẩm được giảm đến mức tối thiểu, do tác động có hại tiềm năng của những lượng lớn chất hoạt động bề mặt lên chế phẩm protein. Tạp chất peroxit có mặt trong polysorbat có thể làm gia tăng sự oxy hoá protein (Wang and Wang *J. Pharm. Sci.* 91:2252-2264 (2002)). Lượng chất hoạt động bề mặt lớn có thể nhũ hóa một lượng đáng kể dầu silicon từ thành của xy lanh và dẫn đến sự gia tăng lực trượt chức năng sau một thời hạn sử dụng. Việc nghiên cứu phát triển sản phẩm cần phải được dự kiến để khảo sát ảnh hưởng của lượng chất hoạt động bề mặt khác nhau đến cả độ ổn định sản phẩm và hiệu suất xy lanh.

Các tương tác phức tạp giữa các thông số chế phẩm và xy lanh trong hệ protein/PFS đều tuân theo sự kiểm tra của các hệ này bằng cách áp dụng phương pháp Quality by Design (QbD) hoặc Design of Experiments (DOE). Các nghiên cứu có thể được dự kiến mà nó thay đổi đồng thời các thông số chế phẩm và xy lanh để hiểu rõ hơn về hệ phức hợp này. Điều này tạo ra phương pháp toàn diện để phát triển các sản phẩm xy lanh nạp sẵn. Bảng 2 là ví dụ về các thông số đầu vào và các lượng có thể đi vào một mẫu thí nghiệm của sản phẩm xy lanh nạp sẵn và ví dụ về thử nghiệm phân tích được sử dụng. Tùy thuộc vào kiểu mẫu thí nghiệm được sử dụng cho nghiên cứu QbD, số lượng các thử nghiệm có thể thay đổi từ 9 đối với mẫu sàng lọc đến 81 đối với mẫu chính thức tại các nhà máy (tất cả các tổ hợp có thể có). Số lượng các thử nghiệm càng nhiều thì số lượng các tương tác giữa các thông số sản phẩm có thể phân tích càng lớn. Phần mềm được thiết kế cho phương pháp phân tích này, ví dụ, phần

mềm phát hiện thông kê JMP® (Cary, NC), có thể có ích cho các nghiên cứu QbD. Phân tích này dẫn đến hiểu biết nhất định về việc các thông số chế phẩm và xy lanh tương tác như thế nào để tác động đến các thuộc tính của sản phẩm.

Bảng 2: Ví dụ về thiết kế thử nghiệm cho sản phẩm protein lỏng trong xy lanh nạp sẵn

Các thông số đầu vào chế phẩm	Lượng	Kiểm tra phân tích
Nồng độ protein	50mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml	- Độ ổn định protein bằng sắc ký loại trừ theo kích thước và sắc ký trao đổi ion - Lực bật và lực trượt theo thời gian bằng cách sử dụng thử nghiệm về lực - Sự tạo thành các hạt chứa protein ở dưới mức nhìn thấy và các giọt dầu silicon theo thời gian bằng cách sử dụng hình ảnh dòng qua kính hiển vi hoặc /máy đếm hạt điện tử
Độ pH	5,5, 6,5, 7,5	
Nồng độ chất hoạt động bề mặt	0,01%, 0,08%, 0,15%	
Lượng dầu silicon trong xy lanh	0,2mg, 0,5mg, 0,8mg/xy lanh	

Ví dụ về mẫu dự đoán có thể thu được từ ví dụ thí nghiệm được thể hiện trên Bảng 2 được đưa ra dưới đây, trong đó C_n là hằng số.

$$\text{Sự tạo kết tụ theo thời gian} = C_0 + C_1[\text{Nồng độ protein}] + C_2[\text{Nồng độ protein}]^2 + C_3[\text{độ pH}] + C_4[\text{Nồng độ chất hoạt động bề mặt}] + C_5[\text{Lượng chất làm trơn}]$$

Nhiều thông số xy lanh có thể ảnh hưởng đến độ ổn định và hiệu suất sản phẩm, vì vậy một phương án bao gồm mô tả các dung sai được cho phép đối với các thông số xy lanh ảnh hưởng đến độ ổn định và hiệu suất sản phẩm. Lượng chất làm trơn (ví dụ, dầu silicon) trong lòng xy lanh có thể thay đổi 50% đến 100% tùy thuộc mỗi xy lanh. Sự thay đổi lượng này có thể ảnh hưởng đến một số đặc tính sản phẩm như được thể hiện trong Bảng 1. Đường kính bên trong của lòng xy lanh có thể thay đổi tùy thuộc mỗi xy lanh làm ảnh hưởng đến lực bơm. Đối với xy lanh có kim tiêm được đóng cọc, đường kính bên trong kim tiêm có thể thay đổi tùy theo lô hoặc tùy theo nhà sản xuất, điều này sẽ ảnh hưởng đến lực bơm. Bằng cách áp dụng phương pháp QbD để xác định xem các thông số xy lanh có ảnh hưởng như thế nào đến hiệu suất, có thể thu được các mẫu dự kiến có thể được sử dụng để ước tính dung sai cho phép của các thông số xy lanh ảnh hưởng như thế nào đến hiệu suất sản phẩm. Các mẫu dự kiến thu được bằng cách áp dụng phương pháp QbD có thể được sử dụng để lựa chọn các thông

số chế phẩm và xy lanh đạt được các thuộc tính mong muốn của sản phẩm và để dự báo độ ổn định và hiệu suất của sản phẩm.

Xy lanh nạp sẵn ngoài chế phẩm protein có thể còn chứa nhũ tương silicon hoặc vonfram. Ví dụ về lượng silicon có thể có mặt trong xy lanh nạp sẵn nằm trong khoảng từ 0,3mg đến 0,8mg. Theo một khía cạnh, lượng silic có thể có mặt trong xy lanh nạp sẵn bằng khoảng 0,3mg, khoảng 0,4mg, khoảng 0,5mg, khoảng 0,6mg, khoảng 0,7mg, hoặc khoảng 0,8mg. Theo một khía cạnh khác, độ nhớt của chế phẩm sẽ nằm trong khoảng từ 2cP đến 60cP, tạo ra lực bơm từ 5N đến 80N ở tốc độ 200mm/phút. Theo một khía cạnh khác nữa, độ nhớt của chế phẩm sẽ nằm trong khoảng từ 4cP đến 27cP tạo ra lực bơm từ 10N đến 40N ở tốc độ 200mm/phút.

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

Quy trình bào chế được phẩm

Dung dịch chứa kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ được lọc thẩm tách trong hệ thống lọc tiếp tuyến để đạt được nồng độ cụ thể trong dung dịch đệm xitrat, histidin, arginin, tiếp theo được gom lại và trộn với dung dịch chứa polysorbat 80 trong dung dịch đệm xitrat, histidin, arginin. Dung dịch này được bảo quản ở -70°C trong các chai loại dung tích 2l hoặc 5l. Dung dịch này tiếp theo được rã đông và được lọc hai lần qua thiết bị lọc cỡ lỗ $0,2\mu\text{m}$. Khoảng 1,0ml được nạp vào xy lanh vô trùng và được đóng bằng pittông vô trùng (cử chặn). Chế phẩm được bảo quản và thuốc thành phẩm được vận chuyển trong xy lanh ở 2°C đến 8°C .

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Bào chế chế phẩm

Các yếu tố

Nồng độ tá dược

Sự hình thành kết tụ trong chế phẩm kháng thể được kiểm tra. Mẫu kết tụ SEC được phát triển từ dữ liệu thí nghiệm bao gồm nồng độ protein, pH, và tỷ lệ mol chất hoạt động bề mặt : protein được kiểm tra. Ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,5,

sự tạo thành kết tụ tương ứng với tỷ lệ mol polysorbat 80 so với protein nằm trong khoảng từ 0,7 đến 1,5. (Hình 6) Nhìn chung, ở các tỷ lệ PS80 : protein lớn hơn 1,5, tỷ lệ hình thành kết tụ tăng khi độ pH tăng. (Hình 7)

Thí nghiệm khảo sát sự hình thành kết tụ SEC với sự có mặt của không khí được thực hiện. Mười một chế phẩm khác nhau có thành phần khác nhau được đặt vào ống bosilicat và được đẩy bằng nút đàn hồi với khoảng không chứa không khí ở trên đỉnh. Một bộ chế phẩm giống hệt được tạo ra, và khoảng không chứa không khí ở trên đỉnh được thay bằng argon. Các mẫu này được để ổn định ở 40°C trong hai tuần. Tất cả các mẫu với khoảng không chứa không khí ở trên đầu tạo ra những lượng kết tụ lớn ở cuối mỗi thí nghiệm so với chế phẩm tương tự có chứa argon ở phần khoảng không ở trên đỉnh.

Bảng 3

Mẫu	Nồng độ protein (mg/ml)	Sucroza (%)	Histidin (mM)	Arginin (mM)	PS 80 (%)	Độ pH	Độ kết tụ của mẫu với khoảng không chứa không khí ở trên đỉnh (%)	Độ kết tụ của mẫu với khoảng không chứa argon ở trên đỉnh (%)
1	60	2	25	75	0,05	6,2	0,64	0,48
2	60	4	25	75	0,05	7	0,62	0,42
3	160	4	50	75	0,14	6,2	0,92	0,73
4	160	2	50	75	0,14	7	1,16	0,74
5	60	2	50	125	0,05	7	1,28	0,33
6	60	4	50	125	0,05	6,6	0,48	0,36
7	160	4	25	125	0,14	7	1,04	0,70
8	160	2	25	125	0,14	6,2	1,06	0,75
9	160	3	25	75	0,14	6,6	1,09	0,78
10	110	3	50	125	0,10	6,2	0,65	0,47
11	110	2	25	75	0,10	6,6	0,90	0,62

Dựa trên các thử nghiệm này, giả thuyết rằng kết tụ SEC tạo ra bởi sự oxy hoá hoặc bởi sự hình thành liên kết disulfua. Việc bổ sung các chất chống oxy hoá và/hoặc chất tạo chelat được khảo sát. Chế phẩm chứa 40mM Histidin, 90mM Arginin, và 160mg/ml protein với tỷ lệ mol giữa polysorbat 80 và protein bằng 1,5 ở độ pH 6,6 được bào chế. 25mM xitrat, 5mM xitrat, 5mM EDTA, 25mM xystein, hoặc 5mM xystein được thêm vào chế phẩm này. Cả 3 tá được bổ sung đều làm giảm mức độ hình thành kết tụ (Hình 8). Việc bổ sung các chất chống oxy hoá và/hoặc chất tạo chelat được xếp hạng theo thứ tự thực hiện như xitrat>EDTA>xystein. 5mM hoặc 25mM xitrat làm giảm sự hình thành kết tụ SEC so với chế phẩm đối chứng.

Một thí nghiệm được thực hiện để xác định ảnh hưởng của độ pH, nồng độ protein, nồng độ xitrat, nồng độ histidin và tỷ lệ mol giữa polysorbat 80 và protein. Độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,3, nồng độ protein nằm trong khoảng từ 60mg/ml đến 160mg/ml, nồng độ xitrat nằm trong khoảng từ 0mM đến 25mM, nồng độ histidin nằm trong khoảng từ 25mM đến 50mM, và tỷ lệ mol giữa polysorbat 80 và protein nằm trong khoảng từ 0,7 đến 1,5. Chế phẩm được nạp vào xy lanh 27G1/2” dài 1ml, (0,55 +/- 0,2mg silicon). Tất cả các chế phẩm chứa khoảng 125mM arginin.

Độ ổn định được kiểm tra ở 40°C trong hai tuần, bằng cách sử dụng CEX và SEC. Kết quả (Hình 9 và Bảng 4) chỉ ra sự giảm mức hình thành kết tụ khi có mặt 25mM xitrat trong chế phẩm, trong khi sự gia tăng về nồng độ protein làm tăng tỷ lệ hình thành kết tụ. Lượng monome chỉ ra xu hướng đối lập của mức hình thành kết tụ ở 25°C và 40°C, trong khi ở 5°C lượng monome về cơ bản không thay đổi trong khoảng thời gian lên tới 24 tháng (Bảng 5).

Một bộ chế phẩm khác có tỷ lệ mức hình thành kết tụ SEC với sự có mặt của 40mM đến 63mM xitrat nhưng không có histidin ở 40°C, 25°C, 5°C. Tỷ lệ hình thành kết tụ trong các chế phẩm này lớn hơn một chút so với chế phẩm chứa histidin ở 40°C. Tuy nhiên, ở 5°C, tỷ lệ hình thành kết tụ trong chế phẩm có chứa xitrat và không chứa histidin là tương đương với chế phẩm chứa xitrat và histidin (Bảng 6). Cũng ở 5°C, lượng monome về cơ bản không thay đổi trong khoảng thời gian lên tới 24 tháng (Bảng 7).

Bảng 4

Chế phẩm số	Nồng độ protein (mg/ ml)	Độ pH	Nồng độ histidin (mM)	Nồng độ xitrat (mM)	Nồng độ arginin (mM)	Tỷ lệ mol PS80: Protein	Mức kết tụ ban đầu (%)	Mức thay đổi lượng kết tụ sau 12 tháng ở 5°C	Mức thay đổi lượng kết tụ sau 24 tháng ở 5°C	Mức thay đổi lượng kết tụ sau 12 tháng ở 25°C	Mức thay đổi lượng kết tụ sau 1 tháng ở 40°C
1	62	6,4	50	25	125	0,7	0,4	0,1	0,1	0,7	0,2
2	60	6,4	50	0	125	1,5	0,4	0,5	1,1	1,5	0,4
3	157	6,4	50	25	125	1,5	0,4	0,2	0,3	1,3	0,5
4	161	6,3	50	0	125	0,7	0,4	0,6	0,7	2,5	0,8
5	60	6,2	50	25	125	1,5	0,4	0,2	0,2	0,5	0,2
6	110	6,0	50	0	125	0,7	0,4	0,4	0,6	1,7	0,7
7	162	6,2	50	25	125	0,7	0,4	0,3	0,3	1,1	0,5
8	160	6,0	50	0	125	1,5	0,4	0,4	0,6	2,2	0,9
9	169	6,3	25	25	125	0,7	0,5	--	0,3	--	0,6
10	158	6,3	25	25	123	1,0	0,5	--	--	--	0,6

Bảng 5

Chế phẩm số	Nồng độ protein (mg/ ml)	Độ pH	Nồng độ histidin (mM)	Nồng độ xitrat (mM)	Nồng độ arginin (mM)	Tỷ lệ mol PS80: Protein	Mức monome ban đầu (%)	Mức thay đổi lượng monome sau 12 tháng ở 5°C	Mức thay đổi lượng monome sau 24 tháng ở 5°C	Mức thay đổi lượng monome sau 12 tháng ở 25°C	Mức thay đổi lượng monome sau 1 tháng ở 40°C
1	62	6,4	50	25	125	0,7	98,3	0,4	0,1	-2,5	-1,3
2	60	6,4	50	0	125	1,5	98,3	-0,2	-1,0	-3,9	-2,0
3	157	6,4	50	25	125	1,5	98,2	0,2	0,0	-3,1	-1,6
4	161	6,3	50	0	125	0,7	98,2	0,0	-0,4	-4,5	-2,1
5	60	6,2	50	25	125	1,5	98,3	0,3	0,2	-2,2	-1,4
6	110	6,0	50	0	125	0,7	98,3	0,1	-0,3	-3,6	-2,1
7	162	6,2	50	25	125	0,7	98,3	0,2	-0,1	-2,8	-1,7
8	160	6,0	50	0	125	1,5	98,3	-0,1	-0,4	-4,2	-2,3
9	169	6,3	25	25	125	0,7	98,2	--	-0,1	--	-1,8
10	158	6,3	25	25	123	1,0	98,1	--	--	--	-1,7

Bảng 6

Chế phẩm số	Nồng độ protein (mg/ml)	Độ pH	Nồng độ histidin (mM)	Nồng độ xitrat (mM)	Nồng độ arginin (mM)	Tỷ lệ mol PS80: Protein	Mức kết tụ ban đầu (%)	Mức thay đổi lượng kết tụ sau 12 tháng ở 5°C	Mức thay đổi lượng kết tụ sau 24 tháng ở 5°C	Mức thay đổi lượng kết tụ sau 12 tháng ở 25°C	Mức thay đổi lượng kết tụ sau 1 tháng ở 40°C
11	160	6,3	0	40	125	0,7	0,5	--	0,4	--	0,9
12	165	6,3	0	40	125	1,5	0,6	0,3	--	--	0,9
13	62	6,2	0	40	125	1,5	0,5	--	--	1,7	0,4
14	170	6,1	0	40	125	1,5	0,5	--	--	--	0,9
15	165	6,5	0	63	125	1,5	0,5	--	--	--	1,0
16	160	6,3	0	40	125	1,0	0,6	0,3	--	--	0,9

Bảng 7

Chế phẩm số	Nồng độ protein (mg/ml)	Độ pH	Nồng độ histidin (mM)	Nồng độ xitrat (mM)	Nồng độ arginin (mM)	Tỷ lệ mol PS80: Protein	Mức monome ban đầu (%)	Mức thay đổi lượng monome sau 12 tháng ở 5°C	Mức thay đổi lượng monome sau 24 tháng ở 5°C	Mức thay đổi lượng monome sau 12 tháng ở 25°C	Mức thay đổi lượng monome sau 1 tháng ở 40°C
11	160	6,3	0	40	125	0,7	98,3	--	-0,3	--	-2,2
12	165	6,3	0	40	125	1,5	98,2	0,1	--	-3,4	-2,1
13	62	6,2	0	40	125	1,5	98,1	--	--	--	-1,4
14	170	6,1	0	40	125	1,5	98,1	--	--	--	-2,0
15	165	6,5	0	63	125	1,5	98,2	--	--	--	-2,3
16	160	6,3	0	40	125	1,0	98,2	0,1	--	--	-2,0

Độ pH

Một số thử nghiệm độ pH được thực hiện để xác định ảnh hưởng của độ pH lên quá trình thoái hóa của CEX ở 5°C. Chế phẩm kháng thể vedolizumab bao gồm 160mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, 125mM arginin, 50mM histidin, và 25mM xitrat. Một số trị số độ pH khác nhau, 6,3, 6,5, 6,7 và 6,9 được khảo sát độ ổn định ở 40°C, 25°C, và 5°C.

Các mẫu CEX ở 40°C cho thấy (Hình 10) độ pH ảnh hưởng nhiều nhất đến quá trình thoái hóa của CEX. Độ pH của chế phẩm chứa histidin giảm khi nhiệt độ tăng, tuy nhiên độ pH của chế phẩm xitrat đã thể hiện là không bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ (Hình 11). Chế phẩm histidin/xitrat được xác định là có độ ổn định cao ở độ pH bằng 6,8 ở 40°C sau 1 tuần, ở độ pH bằng 6,3-6,5 ở 25°C sau 6 tháng và ở độ pH bằng 6,3 đến 6,5 ở 5°C sau 6 tháng. Dựa trên các nghiên cứu khác, độ ổn định của chế phẩm tương tự nhau ở 25°C và 5°C khi độ pH nằm trong khoảng từ 6,2 đến 6,9 (các Bảng 8 và 9).

Bảng 8

Nồng độ protein (mg/ml)	Độ pH	Nồng độ histidin (mM)	Nồng độ độ xitrat (mM)	Nồng độ arginin (mM)	Tỷ lệ mol PS80: Protein	Mức loại axit ban đầu (%)	Mức loại bazơ ban đầu (%)	Mức dạng đồng chức năng chính ban đầu (%)	Mức khác biệt về diện tích tương đối theo thời gian ở 25°C					
									Mức thay đổi về axit CEX sau 6 tháng	Mức thay đổi về bazơ CEX sau 6 tháng	Mức thay đổi về bazơ CEX sau 12 tháng	Mức thay đổi về dạng đồng chức năng chính CEX sau 6 tháng	Mức thay đổi về dạng đồng chức năng chính CEX sau 12 tháng	Mức thay đổi về dạng đồng chức năng chính CEX sau 12 tháng
157	6,4	50	25	125	1,5	23,9	6,8	69,3	8,5	17,4	7,1	3,4	-15,6	-20,8
162	6,2	50	25	125	0,7	24,0	6,9	69,1	4,4	12,8	10,8	8,6	-15,2	-21,4
158	6,3	50	25	125	1,5	24,8	5,5	69,7	7,2	--	4,9	--	-14,4	--
160	6,4	42	25	125	1,5	24,9	5,5	69,7	9,5	--	1,0	--	-14,4	--
147	6,7	45	25	125	2,1	24,9	4,7	70,4	14,8	--	3,6	--	-16,5	--
147	6,9	45	25	125	2,2	25,0	4,9	70,1	14,5	--	3,2	--	-17,9	--
153	6,7	46	25	125	1,5	24,8	5,5	69,7	14,7	--	0,3	--	-17,3	--
154	6,9	46	25	125	1,5	24,9	5,3	69,8	19,7	--	0,5	--	-20,2	--
170	6,5	50	25	125	1,0	25,7	4,6	69,7	10,8	--	4,4	--	-15,2	--
170	6,5	50	25	125	1,5	25,7	4,6	69,7	11,1	--	5,2	--	-16,4	--
160	6,5	50	25	125	1,5	26,3	7,0	66,7	11,8	--	-2,6	--	-11,9	--

Bảng 9

Nồng độ protein (mg/ml)	Độ pH	Nồng độ histidin (mM)	Nồng độ xitrat (mM)	Nồng độ arginin (mM)	Tỷ lệ mol PS80:Protein	% chênh lệch diện tích tương đối theo thời gian ở 5°C				
						Mức thay đổi về axit CEX sau 6 tháng	Mức thay đổi về axit CEX sau 24 tháng	Mức thay đổi về bazơ CEX sau 6 tháng	Mức thay đổi về axit CEX sau 24 tháng	Mức thay đổi về dạng đồng chức năng chính CEX sau 24 tháng
157	6,4	50	25	125	1,5	0,2	0,6	2,3	-0,9	-2,5
162	6,2	50	25	125	0,7	-0,2	-0,7	4,3	2,2	-4,1
158	6,3	50	25	125	1,5	0,0	--	1,9	--	-1,9
160	6,4	42	25	125	1,5	0,1	--	1,7	--	-1,8
147	6,7	45	25	125	2,1	1,7	--	1,7	--	-3,4
147	6,9	45	25	125	2,2	1,6	--	1,1	--	-2,7
153	6,7	46	25	125	1,5	1,7	--	0,4	--	-2,1
154	6,9	46	25	125	1,5	2,1	--	0,4	--	-2,4
170	6,5	50	25	125	1,0	0,9	--	1,6	--	-2,5
170	6,5	50	25	125	1,5	0,8	--	1,6	--	-2,5
160	6,5	50	25	125	1,5	11,8	--	-2,6	--	-11,9

Ví dụ 2

Độ ổn định

Bốn chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ khác nhau được thử nghiệm về độ ổn định trong khoảng thời gian mười hai tháng. Các chế phẩm này có độ pH bằng 6,0 đến 6,2 thể hiện số kiểu chính ít hơn khoảng 1% đến 2% so với chế phẩm có độ pH bằng 6,3 đến 6,4 (Hình 12). Các chế phẩm có độ pH bằng 6,3 đến 6,4 có sự thay đổi về số kiểu bazơ hoặc kiểu chính ít hơn 1% so với các kiểu ở 5°C.

Mười chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ được thử nghiệm độ ổn định bởi SEC trong khoảng thời gian mười hai tháng (Bảng 10). Chế phẩm có nồng độ protein là 60mg/ml và chứa 25mM xitrat có sự thay đổi về mức kết tụ là 0,1% đến 0,2% sau 1 năm, trong khi chế phẩm chứa 160mg/ml protein và 25mM xitrat có sự gia tăng mức kết tụ từ 0,2% đến 0,3% sau 1 năm. Có sự gia tăng về mức kết tụ 0,4% đến 0,6% đối với chế phẩm chứa 60mg/ml, 110mg/ml, hoặc 160mg/ml protein và không chứa xitrat.

Bảng 10

Chế phẩm số	Nồng độ protein (mg/ml)	Độ pH	Nồng độ histidin (mM)	Nồng độ xitrat (mM)	Nồng độ arginin (mM)	Tỷ lệ mol PS80	Mức thay đổi về mức độ kết tụ ở 5°C sau 1 năm (%)
1	62	6,41	50	25	125	0,7	0,11
2	60	6,35	50	0	125	1,5	0,50
3	157	6,44	50	25	125	1,5	0,23
4	161	6,3	50	0	125	0,7	0,56
5	60	6,19	50	25	125	1,5	0,16
6	110	6,03	50	0	125	0,7	0,39
7	162	6,19	50	25	125	0,7	0,26
8	160	6	50	0	125	1,5	0,44
9	165	6,28	0	40	125	1,5	0,30
10	160	6,3	0	40	125	1,0	0,33

Ví dụ 3

Độ nhớt

Lực bơm cần để tiêm dược phẩm có liên quan đến độ nhớt của dược phẩm. Dược phẩm có độ pH thay đổi và nồng độ protein, arginin, histidin, xitrat, sucroza, và polysorbat 80 thay đổi được bào chế. Độ nhớt của các dược phẩm này được kiểm tra. Mẫu thống kê có Ln (độ nhớt) được xây dựng. Mẫu này cho thấy độ nhớt bị ảnh hưởng chủ yếu bởi nồng độ protein và độ pH (Hình 13). Sucroza, histidin và arginin cũng có thể có ảnh hưởng thứ yếu đến độ nhớt. Trong một số chế phẩm protein, natri clorua được thêm vào để làm giảm độ nhớt của chế phẩm. Tuy nhiên, đã biết rằng ảnh hưởng của natri clorua đến độ nhớt phụ thuộc vào protein và chế phẩm.

Natri clorua được thêm vào chế phẩm chứa 140mg/ml vedolizumab, 125mM arginin, 25mM histidin, 25mM xitrat, và polysorbat 80 ở tỷ lệ mol polysorbat 80 so với protein là 1,5, và độ pH là 6,4. NaCl không hề ảnh hưởng đến độ nhớt của chế phẩm.

Ảnh hưởng của độ nhớt đến lực bơm của các xy lanh khác nhau được thử nghiệm được chỉ ra trên Hình 16A và Hình 16B.

Ví dụ 4

Các phương pháp

Sắc ký trao đổi cation (CEX)

Gradien phosphat/natri clorua trên cột trao đổi cation yếu được sử dụng trong hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao để phân tách các loại chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ mang điện tích và xác định thành phần điện tích của kháng thể loài. Rửa giải các dạng đồng chức năng có tính axit trước dạng đồng chức năng chính và rửa giải các dạng đồng chức năng có tính bazơ sau dạng đồng chức năng chính.

Dữ liệu về độ ổn định của chế phẩm vedolizumab thu được bằng cách sử dụng thử nghiệm CEX cho biết tỷ lệ % dạng đồng chức năng chính cao hơn 55,0%.

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

cIEF được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống cIEF phát hiện toàn bộ cột iCE280 (do Convergent Biosciences, Toronto, Ontario cung cấp). Việc lựa chọn chất

điện ly lưỡng tính có thể được đề nghị bởi nhà sản xuất hoặc có thể là hỗn hợp gồm các chất điện ly lưỡng tính hiện có trên thị trường. Một phương pháp kết hợp có thể sử dụng là hỗn hợp gồm 3 đến 10 và 5 đến 8 PHARMALYTE™ (do GE Healthcare, Piscataway, NJ cung cấp).

Dữ liệu về độ ổn định của chế phẩm vedolizumab thu được bằng cách áp dụng thử nghiệm cIEF cho thấy tỷ lệ % của dạng đồng chức năng chính là khoảng 53%, tỷ lệ % của loại có tính axit là khoảng 42% và tỷ lệ % của loại có tính bazơ là khoảng 5%.

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

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

Dữ liệu về độ ổn định của chế phẩm vedolizumab thu được bằng cách sử dụng thử nghiệm SEC cho thấy tỷ lệ % monome là 99,0%, tỷ lệ % kết tụ <0,5% và tỷ lệ % các chất có khối lượng phân tử thấp <1,0%.

Thử nghiệm SDS-PAGE

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

Hiệu quả gắn kết

Tế bào HuT78 (u lympho tế bào T ở người, American Type Culture Collection, Manassas, VA) được tạo hỗn dịch trong 1% BSA trong PBS, 0,01% natri azit được tiếp xúc với các dịch pha loãng tuần tự chứa kháng thể thử nghiệm sơ cấp. Sau khi ủ

trên đá, tế bào được rửa và được xử lý bằng kháng thể thứ cấp được gắn nhãn huỳnh quang. Sau khi rửa tiếp, tế bào được cố định và được tạo hỗn dịch trong chất phản ứng FACS để phân tích theo phương pháp đếm tế bào trong dòng chảy (Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ); xem Patent Mỹ số 7,147,851.

Độ ẩm xác định theo Karl Fischer

Chế phẩm được chuẩn độ bằng metanol để xác định độ ẩm theo phương pháp so màu của Karl Fischer.

Ví dụ 5

Tác động của silicon ở các sản phẩm xy lanh đã được nạp sẵn chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$

Chế phẩm tiêm dưới da chứa 60mg/ml đến 160mg/ml protein kháng $\alpha 4\beta 7$ trong dung dịch đệm chứa L-Histidin, L-Arginin Hydroclorua, Xitrat và Polysorbat 80 được sử dụng để nghiên cứu tác động của silicon đến độ ổn định của chế phẩm protein và các thuộc tính chứa/đậy kín. Nghiên cứu được thực hiện với thể tích nạp là 0,5ml.

Các thông số bao gồm nồng độ protein, tỷ lệ mol giữa polysorbat 80 và protein, và lượng silicon được phun lên lòng xy lanh được khảo sát. Phạm vi của mỗi thông số đầu vào được thể hiện trong Bảng 11.

Bảng 11. Phạm vi thông số đầu vào

Các thông số	Thấp	Cao
Nồng độ protein (mg/ml)	100	160
Tỷ lệ polysorbat 80:protein	0	2
Lượng silicon (mg)	0,4	0,8

Thử nghiệm này được áp dụng để xác định bộ chế phẩm nghiên cứu. Số lượng chế phẩm hợp lý nằm trong khoảng từ 6 đến 8 chế phẩm. Ví dụ về các chế phẩm thử nghiệm được chỉ ra trong Bảng 12.

Bảng 12

Vận hành	Nồng độ protein (mg/ml)	Tỷ lệ PS80:protein	Nồng độ PS80 (%)	Lượng silicon (mg)
1	100	1	0,087	0,8
2	100	2	0,174	0,8
3	160	0	0	0,8
4	160	2	0,279	0,4
5	100	0	0	0,4
6	160	2	0,279	0,8
7	100	1	0,087	0,4
8	160	0	0	0,4
9	100	0	0	0
10	100	2	0,174	0
11	160	0	0	0
12	160	2	0,279	0

Một số mẫu đối chứng có thể được thêm vào bộ chế phẩm và được thử nghiệm ở một số thời điểm lựa chọn.

Các chế phẩm này được đánh giá độ ổn định ở một số nhiệt độ khác nhau (ví dụ, 5°C, 25°C/độ ẩm tương đối 60%, 40°C/độ ẩm tương đối 75%) và được gom tại các thời điểm khác nhau (ví dụ, 0 tuần, 1 tuần, 2 tuần, 4 tuần, 8 tuần, 12 tuần, 6 tháng, và 12 tháng) để kiểm tra. Các mẫu đối chứng được thử nghiệm ở 0 tuần, 12 tuần, 6 tháng và 12 tháng.

Các thử nghiệm được thực hiện ở mỗi thời điểm ổn định bao gồm SEC, CEX, Instron, MFI, và định lượng silicon. 1 xy lanh được dùng cho thử nghiệm Instron, với nguyên liệu đẩy ra được sử dụng cho thử nghiệm SEC, CEX, xác định lực bơm và chụp ảnh dòng chảy trên kính hiển vi (MFI), và định lượng silicon.

Ví dụ 6

Phân tích các hợp phần của xy lanh đã nạp sẵn chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$

Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của các nhà sản xuất xy lanh khác nhau, nguyên liệu đàn hồi dùng cho pittông (cữ chặn), và lượng PS80 trong chế phẩm đến các đặc tính cơ học của hệ thống và độ ổn định của chế phẩm.

Kế hoạch thí nghiệm được tạo ra nhằm khảo sát 3 nhà sản xuất xy lanh khác nhau, 2 loại nguyên liệu làm pittông (cữ chặn) khác nhau, và 2 tỷ lệ mol giữa PS80 và protein khác nhau. Phần còn lại của chế phẩm được giữ không đổi ở 170mg/ml protein, 125mM arginin, 50mM histidin, 25mM xitrat, và độ pH bằng 6,5. Kích cỡ kim tiêm trên các xy lanh nạp sẵn này là có thành mỏng 27G ½' hoặc 29G ½''. Các thử nghiệm được thực hiện như được mô tả chi tiết trong Bảng 15.

Các thông số đầu vào của kế hoạch thí nghiệm cho phần hoạt động của thí nghiệm được chỉ ra dưới đây trong Bảng 13, trong khi các hằng số được chỉ ra trên Bảng 14. Các kế hoạch thí nghiệm được tạo ra bằng cách sử dụng các thông số đầu vào như được chỉ ra trong Bảng 13.

Danh sách các thử nghiệm được chỉ ra trong Bảng 10.

Bảng 13. Các biến số DOE và giá trị của nó trong chế phẩm có hoạt tính

Biến	Giá trị		
Tỷ lệ mol PS80: Protein	1,0	1,5	
Nhà sản xuất xy lanh	A	B	C
Loại pittông (cữ chặn)	4432	Được phủ 4023	

Bảng 14. Các hằng số đối với chế phẩm hoạt tính

Hằng số	Trị số
Nồng độ protein (mg/ml)	170
Nồng độ arginin (mM)	125
Nồng độ histidin (mM)	50
Nồng độ xitrat (mM)	25
Độ pH	6,5

Bảng 15. Các chi tiết về thử nghiệm

Lần vận hành	Loại xy lanh	Pittông (cỡ chặn)	PS80
1	C	4432	1
2	B	4432	1
3	A	4023	1
4	C	4023	1
5	B	4023	1
6	A	4023	1,5
7	C	4023	1,5
8	B	4023	1,5

Chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ ở dạng cô đặc được pha bằng polysorbat 80 và pha loãng xuống đến nồng độ 170mg/ml. Thành phần của chế phẩm ban đầu được chỉ ra trong Bảng 16 dưới đây.

Bảng 16. Chi tiết về dung dịch đậm chế phẩm ban đầu

Protein (mg/ml)	Tổng lượng His (mM)	Tổng lượng Xitrat (mM)	Arg (mM)	Độ pH
183	50	25	125	6,48

Để pha loãng nguyên liệu đến thành phần chế phẩm mong muốn, dung dịch gốc chứa PS80 trong 25mM Xitrat, 50mM Histidin, 125mM Arginin, độ pH 6,48 được tạo ra.

Bảng 17. Chi tiết về dung dịch gốc

Tá dược	Nồng độ
PS 80 (%)	5

Sơ đồ pha loãng đối với chế phẩm được mô tả chi tiết trong Bảng 18.

Bảng 18. Chi tiết về sơ đồ pha loãng

Chế phẩm ban đầu (ul)	PS80 trong dung dịch đệm His/Arg/Xitrat (ul)	Dung dịch đệm chứa 50mM Histidin, 125mM Arginin, 25mM Xitrat có độ pH 6,48	Tổng thể tích (ul)
27868,9	890,8	1240,3	30000,0
18579,2	890,8	530,0	20000,0

Việc pha trộn được thực hiện dựa trên sơ đồ pha loãng, và chế phẩm ban đầu cần phải được cân, trong khi các dung dịch gốc khác có thể được định lượng thể tích bằng cách hút bằng pipet. Các chế phẩm được lọc. Chia chế phẩm thành nhiều phần nhỏ có dung tích 0,5ml vào càng nhiều xy lanh loại dài 1ml càng tốt. Xy lanh này được nút bằng một cơ cấu nút với bóng khí 2mm đến 4mm. Ở mỗi thời điểm, có một xy lanh được bảo quản với kim tiêm hướng xuống và một xy lanh được bảo quản với kim tiêm nằm ngang. Các xy lanh phụ được bảo quản với kim tiêm hướng xuống.

Xy lanh được kiểm tra ở 5°C, 25°C và 40°C vào tuần thứ 2 và sau một tháng. Thử nghiệm phân tích (dạng bề ngoài, Instron, độ pH, độ thấm thấu, mật độ, độ nhớt, SEC, CEX, và Brightwell) được thực hiện ban đầu và lặp lại sau đó ở 2 tuần ở 25°C và 40°C và ở 4 tuần ở 25°C.

Ví dụ 7

Phân tích nút đẩy của dụng cụ chứa dùng để tiêm dưới da được sử dụng trong xy lanh kim tiêm thành mỏng cỡ 27 G được nạp sẵn chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$

Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của các mẫu xy lanh khác nhau với kim tiêm thành mỏng cỡ 27G và các nhà sản xuất pittông (cỡ chặn) khác nhau và các mẫu đến các đặc tính cơ học của hệ thống và độ ổn định của chế phẩm theo thời gian.

Nghiên cứu này khảo sát độ ổn định của chế phẩm lỏng tiêm dưới da kháng $\alpha 4\beta 7$ trong xy lanh đã được nạp sẵn và các đặc tính cơ học của xy lanh bị ảnh hưởng như thế nào bởi các nhà sản xuất xy lanh và mẫu pittông (cỡ chặn) dùng cho xy lanh với kim tiêm 27GTW. Dữ liệu thu được từ nghiên cứu này có thể xác định các hợp phần dụng cụ chứa/nút dùng cho chế phẩm lỏng kháng $\alpha 4\beta 7$ dùng để tiêm dưới da.

Các thông số đầu vào dự kiến cho thí nghiệm được chỉ ra dưới đây trong Bảng 19, trong khi các hằng số được chỉ ra trong Bảng 20. Kế hoạch thí nghiệm được tạo ra bằng cách sử dụng các thông số đầu vào được chỉ ra trong Bảng 19.

Danh mục các thử nghiệm cần được thực hiện được chỉ ra trong Bảng 21.

Bảng 19. Các biến số DOE và giá trị với chế phẩm có hoạt tính

Biến số	Trị số			
Nhà sản xuất xy lanh	A	B	C	
Loại pittông (cũ chặn)	4432	4023 được phủ	D	E

Bảng 20. Hằng số đối với chế phẩm có hoạt tính

Hằng số	Trị số
Nồng độ protein (mg/ml)	160
Nồng độ arginin (mM)	125
Nồng độ histidin (mM)	50
Nồng độ xitrat (mM)	25
PS80 (%)	0,2
Độ pH	6,5

Bảng 21. Chi tiết thí nghiệm

Lần vận hành	Xy lanh	Pittông (cũ chặn)
1	B	D
2	B	4432
3	A	4432
4	B	4023 được phủ
5	A	D
6	C	4023 được phủ
7	A	4023 được phủ
8	C	D
9	C	4432
10	C	E

Chế phẩm kháng $\alpha 4\beta 7$ dạng cô đặc được pha với polysorbat 80 và được pha loãng đến hàm lượng 160mg/ml. Thành phần của chế phẩm ban đầu được chỉ ra trong Bảng 22 dưới đây.

Bảng 22. Chi tiết dung dịch đậm chế phẩm ban đầu

Protein (mg/ml)	Tổng lượng His (mM)	Tổng lượng Xitrat (mM)	Arg (mM)	Độ pH
180	50	25	125	6,3

Để pha loãng nguyên liệu đến thành phần chế phẩm mong muốn, dung dịch gốc chứa PS80 trong 25mM Xitrat, 50mM Histidin và 125mM Arginin, độ pH=6,3 được điều chế.

Bảng 23. Chi tiết về dung dịch gốc

Tá dược	Nồng độ
PS 80 (%) trong dung dịch đậm His/Arg/ Xitrat có độ pH=6,3	1,68

Dịch pha loãng chế phẩm được thể hiện cụ thể trong Bảng 24.

Bảng 24. Chi tiết pha loãng

Chế phẩm ban đầu trong dung dịch đậm Xitrat His Arg (ml)	PS80 trong dung dịch đậm His/Arg/Xitrat (ml)	Tổng thể tích (ml)
78	10 (1,68%)	88

Việc pha trộn được thực hiện dựa trên sơ đồ pha loãng, và chế phẩm ban đầu cần phải được cân, trong khi các dung dịch gốc khác có thể được định lượng thể tích bằng cách hút bằng pipet. Các chế phẩm được lọc. Chia chế phẩm thành nhiều phần nhỏ có dung tích 0,5ml vào càng nhiều xy lanh dài loại 1ml càng tốt. Xy lanh này được chặn bằng cữ chặn với bóng khí 2mm đến 4mm. Tại mỗi thời điểm, có một xy lanh được bảo quản với kim tiêm hướng xuống dưới (vị trí thẳng đứng).

Các xy lanh được kiểm tra ở 5°C, 25°C/độ ẩm tương đối 60%, và 40°C/độ ẩm tương đối 75% ở 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng, 9 tháng (tùy ý), 12 tháng, 18 tháng và 24 tháng.

Chế phẩm lỏng được kiểm tra phân tích (nồng độ, độ thẩm thấu, độ pH, Instron, MFI, SEC, và/hoặc CEX) tại thời điểm 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng, 9 tháng, 12 tháng, 18 tháng, 24 tháng (5°C); 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng, 9 tháng, 12 tháng, 18 tháng (25°C); 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng, 9 tháng, 12 tháng (40°C); và 1 tháng, 3 tháng (40°C).

Ví dụ 8

Phân tích chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ dùng qua đường dưới da trong xy lanh đã được nạp sẵn làm từ chất dẻo

Nghiên cứu này được đề xuất nhằm nghiên cứu việc sử dụng xy lanh nhựa làm hệ thống dụng cụ chứa/nút đẩy đối với chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ để dùng qua đường dưới da. Độ ổn định của chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ để dùng qua đường dưới da trong các xy lanh đã được nạp sẵn làm từ chất dẻo thích hợp được nghiên cứu. Dữ liệu thu được từ nghiên cứu này giúp đánh giá khả năng sử dụng xy lanh nhựa cho chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ ở dạng lỏng để dùng qua đường dưới da.

Các mẫu thử nghiệm về độ ổn định được chuẩn bị như được chỉ ra dưới đây. Các thử nghiệm độ ổn định được thực hiện trong các điều kiện bảo quản là 40°C/độ ẩm tương đối 75%, 25°C/độ ẩm tương đối 60%, và 5°C.

Hai loại xy lanh nhựa và một loại xy lanh thủy tinh (đối chứng) trong Bảng 25 được thử nghiệm với chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ ở dạng lỏng dùng để tiêm dưới da được chỉ ra trong Bảng 26. Bảng 27 chỉ ra chi tiết về mỗi bộ mẫu được kiểm tra trong thí nghiệm.

Bảng 25. Xy lanh nhựa

		Mẫu số 1 xy lanh nhựa 1	Mẫu số 2 xy lanh nhựa 2	Mẫu số 3 Xy lanh thủy tinh (Đối chứng)
Xy lanh	Nhà cung cấp	F	B	A
	Hộp phần	Xy lanh: polyme Kim tiêm: 27G(TW) Vỏ bảo vệ kim tiêm dạng cứng	Xy lanh: polyme Kim tiêm: 26G(RW) đầu bịt dạng khóa Luer	Xy lanh: Glass Kim tiêm: 27G(TW) Vỏ bảo vệ kim tiêm dạng cứng
	Phủ silicon	Tùy ý	Không tùy ý	Không tùy ý

Pittông	Nhà cung cấp	F	F	←
	Mô tả sản phẩm	1ml nguyên liệu A	1ml nguyên liệu B	←
	Phủ silicon	Không	có	←

Bảng 26. Chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ dùng để tiêm dưới da (độ pH=6,5)

Chế phẩm	Thành phần
Kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$	160mg/ml
Arginin	125mM
Histidin	50mM
Xitrat	25mM
PS80 (Tỷ lệ mol protein)	1,5 (0,2% khối lượng/thể tích)

Bảng 27. Chi tiết về mẫu

12	Nhà cung cấp xy lanh nhựa	Protein (Phân tử lượng: 150000)		Phân tử lượng (Trung bình 174,20) (mM)	His (Phân tử lượng: 155,15) (mM)	Xitrat (Phân tử lượng: 210,14) (mM)	PS 80 (Phân tử lượng: 1309,68)		Độ pH
		(mg/ml)	(mM)				(khối lượng/thể tích %)	Tỷ lệ mol protein	
1	F	160	1,067	125	50	25	0,21	1,5	6,5
2	B	160	1,067	125	50	25	0,21	1,5	6,5
3 (Tiếp)	A	160	1,067	125	50	25	0,21	1,5	6,5

Chế phẩm kháng $\alpha 4\beta 7$ ở dạng lỏng để dùng qua đường dưới da đã được bào chế trước đây được sử dụng cho nghiên cứu này. Các chế phẩm được lọc. Việc lấy mẫu dung dịch đã lọc để kiểm tra chất lượng thử nghiệm giống như mẫu “trước khi nạp” (dạng bên ngoài, MFI, DLS). Chia chế phẩm thành từng phần nhỏ có dung tích 0,5ml vào xy lanh nhựa có dung tích 1ml. Xy lanh được chặn bằng thiết bị chặn chân không. Xy lanh được bảo quản với kim tiêm hướng xuống dưới.

Bước kiểm tra ban đầu được thực hiện để đo độ pH, độ thẩm thấu, mật độ, độ nhớt, và nồng độ protein. Thử nghiệm phân tích (dạng bên ngoài, SEC (kết tụ,

monome, phân tử lượng thấp), CEX (axit, chính, bazơ), lực trượt, MFI, DLS, và/hoặc khối lượng) được thực hiện sau 1 tuần ở 40°C, 2 tuần ở 40°C, 1 tháng ở 5°C, 25°C và 40°C, 3 tháng ở 5°C và 25°C, 6 tháng ở 5°C và 25°C, 9 tháng ở 5°C và 25°C, và 12 tháng ở 5°C và 25°C.

Các mẫu được lấy ở thời điểm 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng, 9 tháng và 12 tháng ở 5°C và 25°C. Các mẫu được lấy ở 1 tuần, 2 tuần và 1 tháng ở 40°C.

Ví dụ 9

Các mẫu được phân tích dạng bên ngoài, lực bơm, SEC, CEX, và hình ảnh dòng chảy qua kính hiển vi ở 5°C và 25°C tại các thời điểm khác nhau có thể bao gồm 0 tháng, 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng, và 12 tháng. Độ ổn định của chế phẩm như được xác định bởi SEC và CEX là giống với độ ổn định của chế phẩm được thảo luận trong Ví dụ 1 và 2. Để nghiên cứu lực bơm, lực trượt được xác định (Bảng 28). Mẫu thống kê đã xác định rằng yếu tố đáng kể duy nhất ảnh hưởng đến lực trượt là nhà sản xuất xy lanh, trong đó A có lực trượt cao hơn B, lực trượt này lớn hơn C (Hình 17). Sự thay đổi về lực trượt của xy lanh sau 12 tháng ở 5°C và 6 tháng ở 25°C nhỏ hơn 10N, nhưng hầu hết nhỏ hơn 5N.

Bảng 28

Lần vận hành	Nhà sản xuất xy lanh	Kích cỡ kim tiêm	Loại pittông (cử chặn)	Tỷ lệ mol PS80:Protein	Lực trượt ban đầu (N)
1	C	27G	D	1	19,2
2	B	27G	D	1	22,9
3	A	29GTW	E	1	25,0
4	C	27G	E	1	18,5
5	B	27G	E	1	22,7
6	A	29GTW	E	1,5	28,8
7	C	27G	E	1,5	18,7
8	B	27G	E	1,5	23,7

Ví dụ 10

Phân tích các hợp phần trong xy lanh đã nạp sẵn được dùng trong xy lanh có kim tiêm thành mỏng cỡ 27 G được nạp chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$

Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của các nhà sản xuất xy lanh khác nhau với kim tiêm thành mỏng cỡ 27G và các nhà sản xuất pittông (cữ chặn) khác nhau và các nguyên liệu đàn hồi đến các đặc tính cơ học của hệ xy lanh nạp sẵn và độ ổn định của chế phẩm theo thời gian.

Ba nhà sản xuất xy lanh khác nhau và 4 mẫu pittông (cữ chặn) khác nhau được thử nghiệm với kim tiêm thành mỏng cỡ 27G ½” và chế phẩm chứa 160mg/ml protein, 125mM arginin, 50mM histidin, 25mM xitrat, 0,2% PS80, ở độ pH bằng 6,5. Tất cả các mẫu được tạo ra và được thử nghiệm như được chỉ ra trong Bảng 29.

Bảng 29. Chi tiết thí nghiệm

Lần vận hành	Xy lanh	Pittông (cữ chặn)
1	B	F
2	B	D
3	A	D
4	B	E
5	A	F
6	C	E
7	A	E
8	C	F
9	C	D
10	C	G

Các mẫu được phân tích dạng bên ngoài, lực bơm, SEC, CEX, và hình ảnh dòng chảy trên kính hiển vi ở 5°C, 25°C, và 40°C tại các thời điểm khác nhau có thể bao gồm 0 tháng, 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng, và 12 tháng. Độ ổn định của chế phẩm như được xác định bởi SEC và CEX tương tự với độ ổn định được thảo luận trong ví dụ 1 và 2. Để nghiên cứu lực bơm, lực xẹp và lực trượt được xác định. Kết quả tại thời điểm ban đầu được chỉ ra trong Bảng 30.

Bảng 30

Lần vận hành	Nhà sản xuất xy lạnh	Loại pittông (cữ chặn)	Lực trượt ban đầu (N)	Lực xếp ban đầu (N)	Lực xếp ở 12 tháng ở 5°C (N)	Lực xếp ở 12 tháng ở 25°C (N)	Lực xếp ở 12 tháng ở 40°C (N)
1	B	F	12,0	4,0	3,8	12,9	28,7
2	B	D	11,9	3,9	4,6	12,4	36,0
3	A	D	7,0	4,0	6,5	5,1	6,4
4	B	E	13,9	4,5	4,7	5,8	17,2
5	A	F	5,7	4,1	3,0	17,5	23,9
6	C	E	6,7	4,1	5,0	5,8	11,4
7	A	E	7,9	7,6	4,3	10,4	6,1
8	C	F	6,3	4,2	4,1	15,0	33,3
9	C	D	5,9	4,8	3,9	4,4	10,0
10	C	G	7,2	4,6	6,1	9,8	13,0

Mẫu thống kê chỉ ra rằng các nhà sản xuất xy lạnh A và C có lực trượt giống nhau và thấp hơn so với nhà sản xuất B, trong khi pittông (cữ chặn) E có lực trượt cao hơn một chút so với các pittông (cữ chặn) khác.

Thông thường, lực xếp ban đầu giữa tất cả các mẫu được thử nghiệm là giống nhau.

Sau 12 tháng ở 5°C, 25°C, và 40°C, lực trượt không thay đổi đáng kể. Tuy nhiên, lực xếp đối với xy lạnh có pittông (cữ chặn) F tăng sau 12 tháng ở 25°C và 40°C.

Ví dụ 11

Phân tích chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ trong xy lạnh đã nạp sẵn

Nghiên cứu này xác định ảnh hưởng của việc thay đổi các mức nồng độ protein, nồng độ polysorbat 80, nồng độ xitrat, và độ pH đến chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ở dạng xy lạnh đã nạp sẵn.

Phân kế hoạch thí nghiệm được tạo ra trên phần mềm JMP với thừa số phân đoạn gồm hai mức nồng độ protein (từ 60mg/ml đến 160mg/ml), độ pH (từ 6,0 đến

6,3), tỷ lệ mol polysorbat 80:protein (từ 0,723 đến 1,5), và nồng độ xitrat (từ 0mM đến 25mM). Các chế phẩm này có trị số nồng độ Histidin (50mM) và Arginin (125mM) không đổi (các chế phẩm 1 đến 8). Các biến thể của các chế phẩm này với 25mM Histidin được thêm vào (chế phẩm 9 và chế phẩm 10).

Một bộ các chế phẩm khác được phát triển để khảo sát chế phẩm không chứa histidin và chỉ chứa xitrat đóng vai trò làm chất đệm (các chế phẩm 11 đến 16). Các mức của các thông số đầu vào đối với tất cả các chế phẩm được khảo sát được chỉ ra trong Bảng 31. Các hằng số được sử dụng đối với tất cả các chế phẩm được chỉ ra trong Bảng 32.

Bảng 31. Các biến số DOE và giá trị

Biến số	Trị số danh nghĩa	
	Thấp	Cao
Nồng độ protein (mg/ml)	60	160
Độ pH	6,0	6,3
Tỷ lệ mol PS80: Protein	0,723	1,5
Nồng độ xitrat (mM)	0	40
Nồng độ histidin (mM)	0	50

Bảng 32. Hằng số

Hằng số	Giá trị
Nồng độ arginin (mM)	125

Bảng 33 liệt kê các chế phẩm cần thử nghiệm.

Bảng 33. Chi tiết chế phẩm

Chế phẩm số	Protein (mg/ml)	Protein (mM)	His (mM)	Arg (mM)	PS 80%	Độ pH	Tỷ lệ mol PS80: Protein	Chất chống oxy hoá	Nồng độ chất chống oxy hoá (mM)
1	60	0,400	50	125	0,038	6,3	0,723	axit xitric	25
2	60	0,400	50	125	0,079	6,3	1,5	axit	0

								xitric	
3	157	1,047	50	125	0,206	6,3	1,5	axit xitric	25
4	160	1,067	50	125	0,101	6,3	0,723	axit xitric	0
5	60	0,400	50	125	0,079	6,0	1,5	axit xitric	25
6	110	0,733	50	125	0,069	6,0	0,723	axit xitric	0
7	160	1,067	50	125	0,101	6,0	0,723	axit xitric	25
8	160	1,067	50	125	0,210	6,0	1,5	axit xitric	0
9*	160	1,067	25	125	0,101	6,0	0,723	axit xitric	25
10*	160	1,067	25	125	0,140	6,0	1	axit xitric	25
11	160	1,067	0	125	0,101	6,3	0,723	axit xitric	40
12	160	1,067	0	125	0,210	6,3	1,5	axit xitric	40
13	60	0,400	0	125	0,079	6,3	1,5	axit xitric	40
14*	160	1,067	0	125	0,210	6,1	1,5	axit xitric	40
15*	160	1,067	0	125	0,210	6,6	1,5	axit xitric	40
16*	160	1,067	0	125	0,140	6,3	1	axit xitric	40

Mỗi chế phẩm được tạo ra từ một chế phẩm gốc ban đầu chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ và được pha loãng bằng các dung dịch gốc tá được khác nhau. Để đạt được thể tích pha loãng hợp lý, dung dịch gốc chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ được sử dụng được chỉ ra trong Bảng 34. Hai lần vận hành TFF khác nhau được thực hiện để đạt được chế phẩm TFF 1 và 2. Một phần của TFF 1 được sử dụng trong thẩm tách để đạt được chế phẩm được gắn nhãn “thẩm tách”.

Bảng 34. Chi tiết dung dịch đệm chế phẩm ban đầu

Chế phẩm ban đầu	Protein (mg/ml)	Tổng lượng His (mM)	Tổng lượng Xitrat (mM)	Arg (mM)	Độ pH
TFF 1	192,1	50	0	125	6,1
TFF 2	206,1	0	40	125	6,3
Thẩm tách	169,65	25	25	125	6,0

Để pha loãng nguyên liệu đến thành phần chế phẩm mong muốn, dung dịch gốc của mỗi tá được trong nước được bào chế ở các nồng độ được nêu cụ thể trong Bảng 35.

Bảng 35. Chi tiết dung dịch gốc

Tá được	Nồng độ
Histidin (mM)	220
Arginin hydroclorua (mM)	625
PS 80 (%)	2,5
Histidin hydroclorua (mM)	600
axit xitric (mM) (độ pH=6,3)	1500
axit xitric (mM) (độ pH=6,0)	1500
Xitrat (mM)	600
Natri Xitrat (mM)	800

Sơ đồ pha loãng chế phẩm được chỉ ra cụ thể trong Bảng 36 và 37.

Bảng 36. Chi tiết dịch pha loãng

	Chế phẩm ban đầu (ul)	Chế phẩm ban đầu (mg)	His (ul)	His*HCl (ul)	Arg (ul)	Dung dịch xitrat (ul)	PS80 (uL)	WFI (ul)
1	4685,06	4961,01	1612,2	268,4	2063,0	250	227,3	5894,0
2	4685,06	4961,01	1612,2	268,4	2063,0	0	471,6	5899,7
3	12259,2	12981,31	724,1	0,0	548,2	250,0	1234,0	0,0
4	12493,49	13229,36	696,7	0,0	501,3	0	606,2	702,4
5	4685,06	4961,01	1002,8	491,9	2063,0	250	471,6	6035,7
6	8589,28	9095,18	545,0	334,4	1282,1	0	416,7	3832,4

7	12493,49	13229,36	87,2	176,9	501,3	250	606,2	884,9
8	12493,49	13229,36	87,2	176,9	501,3	0	1257,6	483,5
9	12260,8	12941,30	38,2	16,8	147,8	12,3	525,3	0,0
10	12260,8	12941,30	38,2	16,8	147,8	12,3	726,6	0,0

Bảng 37. Chi tiết dịch pha loãng

	Chế phẩm ban đầu (ul)	Chế phẩm ban đầu (mg)	Xitrat (ul)	Xitrat Na (ul)	Arg (ul)	PS80 (ul)	WFI (ul)
11	9315,87	9944,69	8,3	128,0	536,8	484,9	1526,1
12	9315,87	9944,69	8,3	128,0	536,8	1006,1	1005,0
13	3493,45	3729,26	30,5	402,5	1701,3	377,3	5995,0
14	5822,42	6215,43	22,0	67,4	335,5	628,8	623,9
15	5822,42	6215,43	0,0	300,0	335,5	628,8	413,3
16	5822,42	6215,43	5,2	80,0	335,5	419,2	837,7

Việc điều chế được thực hiện dựa trên sơ đồ pha loãng, và chế phẩm ban đầu được cân, trong khi các dung dịch gốc khác được định lượng thể tích bằng cách hút bằng pipet. Các chế phẩm được lọc. Chế phẩm được chia thành các phần nhỏ có dung tích 0,5ml vào càng nhiều xy lanh có dài loại 1ml càng tốt. Xy lanh được chặn bằng thiết bị chặn. Xy lanh được bảo quản với kim tiêm hướng xuống dưới.

Chế phẩm lỏng được kiểm tra phân tích (dạng bên ngoài, độ pH, độ thẩm thấu, mật độ, DLS, SEC, CEX, và/hoặc Brightwell) vào ban đầu, và ở 1 tuần ở 40°C, 2 tuần ở 40°C, 1 tháng ở 25°C và 40°C, 2 tháng, 5°C và 25°C, 3 tháng, 5°C và 25°C, 6 tháng, 5°C và 25°C, 9 tháng, 5°C và 25°C, và 12 tháng, 5°C và 25°C.

Việc rút chế phẩm cụ thể theo Bảng 38 cũng được thực hiện.

Bảng 38: Những lần rút chế phẩm cụ thể

Chế phẩm	Nhiệt độ	1 Tuần	2 Tuần	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	Lâu hơn
1	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
2	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
3	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1

4	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
5	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
6	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
7	5	--	--	--	X	X	X	X	X	0
8	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
9	5	--	--	--	--	--	--	--	--	3
10	5	--	--	--	X	X	X	--	X	0
11	5	--	--	--	--	--	--	--	--	5
12	5	--	--	--	X	--	--	--	--	4
13	5	--	--	--	--	--	--	--	--	5
14	5	--	--	--	X	--	--	--	--	1
15	5	--	--	--	--	--	--	--	--	2
16	5	--	--	--	X	--	--	--	--	1
1	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
2	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
3	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
4	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
5	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
6	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
7	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
8	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
9	25	--	--	X	--	--	--	--	--	3
10	25	--	--	X	X	--	X	--	--	0
11	25	--	--	X	--	--	--	--	--	5
12	25	--	--	X	X	--	--	--	--	4
13	25	--	--	X	--	--	--	--	--	6
14	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
15	25	--	--	X	--	--	--	--	--	2
16	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
1	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
2	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
3	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
4	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
5	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
6	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
7	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
8	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1

9	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
10	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
11	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
12	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
13	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
14	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
15	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
16	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0

Ví dụ 12

Chế phẩm chứa 160mg/ml protein, 50mM histidin, 25mM xitrat, 125mM arginin ở độ pH=6,5 được kiểm tra độ ổn định trong cả xy lanh thủy tinh và hai xy lanh nhựa COP khác nhau. Ở 5°C và 25°C sau 12 tháng, lượng kết tụ và monome giữa xy lanh nhựa và xy lanh thủy tinh được so sánh với nhau.

Bảng 39

Chế phẩm số	Tỷ lệ mol PS80:Protein	Nguyên liệu làm xy lanh	Sự thay đổi kết tụ SEC sau 12 tháng ở 5°C (%)	Sự thay đổi kết tụ SEC sau 12 tháng ở 25°C (%)	Lượng monome sau 12 tháng ở 5°C (%)	Lượng monome sau 12 tháng ở 25°C (%)
1	1,5	Nhà sản xuất COP 1	0,2	1,0	98,3	96,8
2	1,5	Nhà sản xuất COP 2	0,2	1,6	98,3	96,9
3	1,5	Thủy tinh	0,2	1,4	98,4	96,8
4	1	Thủy tinh	0,2	1,6	98,3	96,8

Ví dụ 13: Độ sinh khả dụng của Vedolizumab được dùng bằng cách tiêm dưới da và tiêm bắp

Nghiên cứu giai đoạn I về độ sinh khả dụng của vedolizumab được dùng bằng cách tiêm dưới da và tiêm bắp cho các đối tượng nam giới khỏe mạnh được thực hiện. Tổng số 42 đàn ông khỏe mạnh tham gia vào nghiên cứu này. Các đối tượng được chia thành ba nhóm (dùng qua đường dưới da, tiêm bắp, và dùng qua đường tĩnh mạch), mỗi nhóm gồm 14 đối tượng. Các đối tượng được cho dùng 180mg vedolizumab mỗi

ngày. Liều dùng này được hoàn nguyên từ chế phẩm đông khô chứa 60mg/ml kháng thể trong 50mM histidin, 125mM arginin, 0,06% polysorbat 80, 10% sucroza, ở độ pH=6,3. Để dùng cho đối tượng tiêm bắp và tiêm dưới da, liều này được chia thành hai liều tiêm, mỗi liều 1,5ml. Lấy mẫu máu để xác định nồng độ vedolizumab trong huyết tương và độ sinh khả dụng của vedolizumab trong mỗi nhóm đối tượng được xác định.

Không có trường hợp bất lợi nghiêm trọng hoặc nhiễm khuẩn đáng kể, bất thường đáng kể trong lâm sàng, bảng liệt kê các RAMP dương tính khách quan/chủ quan, cũng như các phát hiện ECG đáng kể trong lâm sàng được báo cáo.

Việc tạo mẫu và mô phỏng PK/PD được thực hiện để xác định liều dùng và phác đồ của các liều ngoài mạch mà tạo ra sự tiếp xúc tương tự như các liều dùng qua đường tĩnh mạch để duy trì nồng độ mong muốn trong huyết thanh ở mức thấp nhất.

Profin hấp thụ (Hình 18) cho thấy nồng độ của các liều tiêm bắp và tiêm dưới da thường trùng nhau. Không có sự khác biệt tổng thể rõ rệt trong các profin hấp thụ của các đường dùng này. Độ sinh khả dụng tuyệt đối của vedolizumab sau khi tiêm dưới da (SC) là khoảng 75% và sau khi tiêm đường tĩnh mạch là khoảng 80%.

Ví dụ 14. Tạo mẫu phác đồ liều dùng qua đường dưới da

Việc tạo mẫu và mô phỏng PK/PD được thực hiện để xác định liều dùng và phác đồ của các liều ngoài mạch tạo ra sự tiếp xúc tương tự như các liều trong tĩnh mạch để duy trì nồng độ trong huyết thanh ở mức thấp nhất.

Một bộ dữ liệu kết hợp cuối cùng (dữ liệu dùng qua đường tĩnh mạch, dùng qua đường dưới da và dùng qua đường bắp) thể hiện hai mẫu tuyến tính riêng biệt được biểu hiện bằng các thông số độ thanh thải (CL) và thể tích phân bố trung tâm (V2), thể tích phân bố ngoại biên (V3), đường dùng ngoài mạch phụ thuộc vào hằng số tỷ lệ hấp thụ (KA) và độ sinh khả dụng tương đối (so với dùng trong tĩnh mạch) của các liều ngoài mạch (F). Các điều kiện dùng qua đường tĩnh mạch bao gồm CL, V2 và V3 với thể trọng là đồng biến duy nhất ảnh hưởng đến CL và V3 do tác dụng tương quan.

Tính chấp nhận được và có thể đoán trước được của mẫu được chứng minh nhờ việc đánh giá các thông số khởi động, kiểm tra khả năng dự đoán bằng mắt thường và độ tin cậy của đồ thị. Phân tích mẫu cho thấy thể trọng là thông số dự báo PK của vedolizumab với tính biến thiên PK được cho là do đối tượng và hợp phần đối tượng.

Khi mẫu được chứng minh là thích hợp để mô phỏng, thực hiện mô phỏng để đánh giá ảnh hưởng của đường dùng (tĩnh mạch, bắp hoặc dưới da), và đánh giá ảnh hưởng của tần suất của liều dùng (hằng tuần, 2 tuần một lần, 4 tuần một lần, và 8 tuần một lần) ở nồng độ thấp nhất ở trạng thái ổn định. Dựa trên các trị số này và độ sinh khả dụng tương đối của vedolizumab sau khi dùng qua đường tĩnh mạch và dưới da ($F=69,5\%$), các liều dùng được chọn để đạt được nồng độ thấp nhất tương tự ở các liều dùng qua đường tĩnh mạch.

Các liều dùng và phác đồ được tạo mẫu mô phỏng để phù hợp với phác đồ cảm ứng và phác đồ duy trì trong tĩnh mạch. Các mục tiêu đồng thời là diện tích tiếp xúc (diện tích bên dưới đường cong nồng độ thuốc trong huyết thanh theo thời gian (area under serum drug concentration-time curve - AUC)) và nồng độ thuốc thấp nhất. Các bảng 40 đến 43 đưa ra kết quả của việc mô phỏng.

Bảng 40. Phác đồ cảm ứng phù hợp với AUC khi dùng qua đường tĩnh mạch ở tuần 0 đến 6

Đường dùng	Liều	Tần suất
tĩnh mạch	300mg	Tuần 0 & 2
dưới da	485mg	Tuần 0 & 2
dưới da	160mg	Hai ngày một lần (6 liều)
dưới da	>160mg	Hằng tuần (6 liều)

Bảng 41. Liều cảm ứng phù hợp với nồng độ thấp nhất khi dùng qua đường tĩnh mạch, tuần 0 đến 6

Đường dùng	Liều	Tần suất
tĩnh mạch	300mg	Tuần 0 & 2
dưới da	>160mg	Tuần 0 & 2
dưới da	100mg	Hằng tuần (6 liều)
dưới da	160mg	Hai ngày một lần (trong 2 tuần)

Bảng 42. Duy trì phác đồ phù hợp với khi dùng liều tĩnh mạch 300mg 4 tuần một lần

Tần suất	Đường dùng	Liều phù hợp với nồng độ thấp nhất ở trạng thái ổn định trung bình khi dùng qua đường tĩnh mạch trong 4 tuần	Liều phù hợp với AUC khi dùng qua đường tĩnh mạch 4 tuần
4 tuần một lần	tĩnh mạch	300	300
	bắp	432	432
	dưới da	432	432
2 tuần một lần	tĩnh mạch	115	150
	bắp	165	216
	dưới da	165	216
Hằng tuần	tĩnh mạch	50	75
	IM	72	108
	dưới da	72	108

Bảng 43. Duy trì phác đồ liều phù hợp với việc dùng liều qua đường tĩnh mạch 300mg 8 tuần một lần

Tần suất	Đường dùng	Liều phù hợp với nồng độ thấp nhất ở trạng thái ổn định khi dùng qua đường tĩnh mạch trong 8 tuần	Liều phù hợp với AUC khi dùng qua đường tĩnh mạch trong 8 tuần
8 tuần một lần	tĩnh mạch	300	300
	bắp	432	432
	dưới da	432	432
4 tuần một lần	tĩnh mạch	90	150
	bắp	125	216
	dưới da	125	216
2 tuần một lần	tĩnh mạch	35	75
	bắp	50	108
	dưới da	50	108
Hằng tuần	tĩnh mạch	15	37,5
	bắp	22	54
	dưới da	22	54

Ví dụ 15: Nghiên cứu đa liều giai đoạn 2a

Nghiên cứu đa liều ở giai đoạn 2a có thể đánh giá tính an toàn, khả năng dung nạp và trạng thái ổn định PK của vedolizumab sau khi dùng đa liều vedolizumab bằng cách tiêm dưới da và để đánh giá độ sinh khả dụng tương đối của phác đồ tiêm dưới da so với phác đồ trong tĩnh mạch. Sự phát triển của HAMA và việc làm mất tác dụng của HAMA và ảnh hưởng của việc dùng đa liều vedolizumab lên PD sau khi tiêm dưới da có thể được đánh giá.

Các bệnh nhân viêm loét đại tràng có một phần điểm Mayo bằng 1 đến 12 và các bệnh nhân mắc bệnh Crohn có CDAI lớn hơn 150 có thể được bao hàm trong nghiên cứu này. Nhóm bệnh nhân có thể nhận phác đồ cảm ứng vedolizumab (300mg) được dùng qua đường tĩnh mạch ở tuần 0 và tuần 2, theo sau là phác đồ duy trì trong số:

Vedolizumab (300mg) được dùng qua đường tĩnh mạch 4 tuần một lần ở tuần 6 đến 22

Vedolizumab (300mg) được dùng qua đường tĩnh mạch 8 tuần một lần ở tuần 6 đến 22

Vedolizumab (108mg) được dùng qua đường dưới da hằng tuần ở tuần 6 đến 22

Vedolizumab (108mg) được dùng qua đường dưới da 2 tuần một ngày ở tuần 6 đến 22

Vedolizumab (165mg) được dùng qua đường dưới da 3 tuần một lần ở tuần 6 đến 22.

Các mẫu có thể được gom lại trước khi phân liều vào ngày 1, và sau đó được phân liều lại vào ngày 1 (12 giờ), 2, 3, 5, 8, 15, 29, 43, 127, 127 (12 giờ), 128, 129, 131, 134, 141, và 155 để đánh giá PK và PD.

Ví dụ 16: Sử dụng Vedolizumab trong lâm sàng trong thời gian dài để điều trị IBD

Nghiên cứu mở rộng về tính an toàn nhãn mở giai đoạn 2 được thực hiện để đánh giá dược động học (PK), dược lực học (PD), tính an toàn, và hiệu quả của vedolizumab trong thời gian dài. Các bệnh nhân ở lứa tuổi từ 18 đến 75 tuổi, và đã từng tham gia vào nghiên cứu PK/PD/tính an toàn trước đó ở các bệnh nhân viêm loét

đại tràng hoặc có các triệu chứng IBD trong ít nhất 2 tháng được sàng lọc bằng cách nội soi và/hoặc mô bệnh học và/hoặc X quang trong vòng 36 tháng.

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

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

Kết quả PK

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

Kết quả PD

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

Điểm số Mayo riêng phần

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

Chỉ số hoạt tính bệnh Crohn

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

IBDQ

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

Protein có hoạt tính phản ứng C

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

Các kết quả về độ an toàn khác

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

Kết luận

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

Ví dụ 17: Gây đáp ứng và duy trì đáp ứng và sự thuyên giảm bệnh ở các bệnh nhân bị viêm loét đại tràng hoạt động ở mức độ từ vừa phải đến nghiêm trọng

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

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

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

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

Tóm tắt về các đáp ứng trong các nghiên cứu gây đáp ứng và duy trì đáp ứng được đưa ra trong các Bảng 44 đến 47. Tỷ lệ các bệnh nhân được điều trị bằng vedolizumab đạt được đáp ứng lâm sàng, sự thuyên giảm bệnh, và làm lành niêm mạc ở thời điểm 6 tuần lớn hơn đáng kể so với bệnh nhân dùng giả được (Bảng 44). 39% nhóm được dự định điều trị trong giai đoạn cảm ứng không có khả năng kháng TNFα trước đó. Tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và tỷ lệ thuyên giảm bệnh ở các bệnh nhân sử dụng vedolizumab cao hơn các bệnh nhân sử dụng giả được trong đó có cả các bệnh nhân thất bại trong điều trị bằng kháng TNF trước đó và các bệnh nhân không tiếp xúc với kháng TNF trước đó. Trong các phân tích sơ bộ cho đến tuần thứ 6, tỷ lệ các trường hợp bất lợi (adverse event - AE), trường hợp bất lợi nghiêm trọng, và các trường hợp

bất lợi dẫn đến việc ngừng nghiên cứu ở nhóm giả dược cao hơn nhóm vedolizumab. Tỷ lệ các bệnh nhân sử dụng vedolizumab đạt được sự thuyên giảm lâm sàng, làm lành niêm mạc, và thuyên giảm không sử dụng corticosteroid ở 52 tuần và đáp ứng bền và sự thuyên giảm bệnh cao hơn đáng kể so với các bệnh nhân sử dụng giả dược (Bảng 45). 32% nhóm nghiên cứu duy trì đáp ứng thất bại trong điều trị bằng kháng TNF α trước đó. Sự thuyên giảm lâm sàng và tỷ lệ đáp ứng lâm sàng bền ở vedolizumab là cao hơn đáng kể so với giả dược ở cả bệnh nhân thất bại trong điều trị bằng TNF và các bệnh nhân chưa từng sử dụng TNF. Trong nhóm an toàn (N=895) đối với các tuần 0 đến 52, tỷ lệ trường hợp bất lợi (AE), AE nghiêm trọng, và nhiễm khuẩn nghiêm trọng giữa các nhóm vedolizumab và giả dược là tương tự nhau. Không có sự gia tăng về tỷ lệ nhiễm khuẩn cơ hội hoặc nhiễm khuẩn ruột được quan sát ở nhóm vedolizumab.

Bảng 44: Kết quả nghiên cứu cảm ứng — Các điểm cuối chủ yếu và thứ yếu

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

Bảng 45: Kết quả nghiên cứu duy trì đáp ứng — Các điểm cuối chủ yếu và thứ yếu

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

Sự thuyên giảm không dùng corticosteroid (%)	13,9 n=72	31,4 n=70	45,2 N=73	17,6/2,3 31,4/3,3	0,0133 <0,0001
--	--------------	--------------	--------------	----------------------	-------------------

Bảng 46: Nghiên cứu gây đáp ứng: Đáp ứng lâm sàng và thuyên giảm ở 6 tuần ở các bệnh nhân thất bại trong điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α trước đó và các bệnh nhân không tiếp xúc với kháng TNF, nhóm ITT

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

Bảng 47: Thuyên giảm lâm sàng và đáp ứng lâm sàng bền ở 52 tuần: Các bệnh nhân thất bại trong điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α trước đó hoặc không tiếp xúc với chất đối kháng kháng TNF- α , nhóm ITT

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

					45,9
Các bệnh nhân không tiếp xúc với chất đối kháng kháng TNF- α (60%)					
	Giả được N=79	VDZ Q8wks N=72	VDZ Q4wks N=73	Chênh lệch Q8wks so với giả được Q4wks so với giả được	95% CI
Thuyên giảm lâm sàng (%)	19,0	45,8	47,9	26,8 29,0	12,4, 41,2 14,6, 43,3
Đáp ứng lâm sàng bền (%)	26,6	65,3	56,2	38,7 29,6	24,0, 53,4 14,6, 44,6

Ví dụ 18: Gây ra và duy trì đáp ứng và sự thuyên giảm ở các bệnh nhân mắc bệnh Crohn hoạt động ở mức độ vừa phải đến nghiêm trọng

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

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

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

Bất ngờ là, nghiên cứu này chỉ ra rằng các nhóm Q4 và Q8 tuân cho các kết quả rất giống nhau. Tóm tắt về các đáp ứng của các nghiên cứu gây và duy trì đáp ứng được đưa ra trong các bảng 48 đến 51. Tỷ lệ bệnh nhân được điều trị bằng vedolizumab đạt được sự thuyên giảm lâm sàng và đáp ứng gia tăng cao hơn đáng kể so với tỷ lệ các bệnh nhân dùng giả được (Bảng 48). Tỷ lệ thuyên giảm lâm sàng và đáp ứng gia tăng ở các bệnh nhân sử dụng vedolizumab cao hơn các bệnh nhân sử dụng giả được bao gồm cả các bệnh nhân thất bại trong điều trị bằng kháng TNF trước đó và các bệnh nhân không tiếp xúc với kháng TNF trước đó. Tỷ lệ các trường hợp bất

lợi (AE), AE nghiêm trọng, và nhiễm khuẩn nghiêm trọng giữa các nhóm vedolizumab và các nhóm giả dược là tương tự nhau. Không có sự gia tăng về nhiễm khuẩn cơ hội hoặc nhiễm khuẩn ruột được quan sát ở nhóm vedolizumab.

Bảng 48: Kết quả nghiên cứu gây đáp ứng — Các điểm cuối chủ yếu và thứ yếu

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

Bảng 49: Kết quả nghiên cứu duy trì đáp ứng — các điểm cuối chủ yếu và thứ yếu

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

Bảng 50: Thuyên giảm lâm sàng và đáp ứng gia tăng tại thời điểm 6 tuần ở các bệnh nhân thất bại trong điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF-α trước đó và không tiếp xúc với kháng TNF trước đó, nhóm ITT

Các bệnh nhân thất bại trong điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF-α trước đó (48%)				
Điểm cuối	Giả dược N=70	Vedolizumab N=105	Chênh lệch	95% CI
Thuyên giảm	4,3	10,5	6,2	(-9,1, 21,3)

lâm sàng (%)				
Đáp ứng gia tăng (%)	22,9	23,8	1,0	(-11,8, 13,7)
Các bệnh nhân không tiếp xúc với chất đối kháng kháng TNF- α trước đó (50%)				
	Giả dược N=76	Vedolizumab N=130109	Chênh lệch	95% CI
Thuyên giảm lâm sàng (%)	9,2	17,4	8,2	(-1,4, 17,9)
Đáp ứng gia tăng (%)	30,3	42,2	11,9	(-1,9, 25,8)

Bảng 51: Thuyên giảm lâm sàng và đáp ứng gia tăng tại thời điểm 52 tuần: Các bệnh nhân thất bại trong điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α trước đó hoặc không tiếp xúc với chất đối kháng kháng TNF- α trước đó, nhóm ITT

Các bệnh nhân thất bại trong điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α trước đó (51%)					
Điểm cuối	Giả dược N=78	VDZ Q8Wks N=82	VDZ Q4Wks N=77	Chênh lệch Q8wks so với giả dược Q4 wks so với giả dược	95% CI
Thuyên giảm lâm sàng (%)	12,8	28,0	27,3	15,2 14,5	(3,0, 27,5) (2,0, 26,9)
Đáp ứng gia tăng (%)	20,5	29,3	37,7	8,8 17,1	(-4,6, 22,1) (3,1, 31,2)
Các bệnh nhân không tiếp xúc với chất đối kháng kháng TNF- α trước đó (45%)					
	Giả dược N=71	VDZ Q8wks N=66	VDZ Q4wks N=71	Chênh lệch Q8wks so với giả dược Q4wks so với giả dược	95% CI
Thuyên giảm lâm sàng (%)	26,8	51,1	46,5	24,8 19,7	(8,9, 40,6) (4,2, 35,2)
Đáp ứng gia tăng (%)	38,0	60,6	53,5	22,6 15,5	(6,3, 38,9) (-0,7, 31,7)

Ví dụ 19: Gây đáp ứng và làm thuyên giảm ở các bệnh nhân mắc bệnh Crohn hoạt động ở mức độ từ vừa phải đến nghiêm trọng

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

Điểm cuối chủ yếu được chỉ định cho nghiên cứu này là sự thuyên giảm ở tuần 6 (%) trong nhóm thất bại trong điều trị bằng chất đối kháng TNF- α . Các điểm cuối thứ yếu được đánh giá (quy trình thử nghiệm sau đó) là: sự thuyên giảm ở tuần 6 (%) trong toàn bộ quần thể, sự thuyên giảm ở tuần 10 (%) trong nhóm thất bại trong điều trị bằng chất đối kháng TNF- α và toàn bộ quần thể (bằng cách sử dụng quy trình Hochberg), sự thuyên giảm duy trì ở tuần 6 và 10 (%) trong nhóm thất bại trong điều trị bằng chất đối kháng TNF- α và toàn bộ quần thể (bằng cách sử dụng quy trình Hochberg), và đáp ứng tăng cường ở tuần 6 (%) trong nhóm thất bại trong điều trị bằng chất đối kháng TNF- α .

Bảng 52: CDAI gốc

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

Bảng 53: Kết quả nghiên cứu gây đáp ứng: điểm cuối chủ yếu và thứ yếu

Điểm cuối	ITT TNF (N=315)				ITT tổng (N=416)			
	PLA N=157	VDZ V=158	Chênh lệch (RR)	Trị số P	PLA N=207	VDZ N=209	Chênh lệch (RR)	Trị số P
Sự thuyên giảm ở Wk6	12,1%	15,2 %	3,0% (1,2)	0,4332				

chủ yếu								
Sự thuyên giảm ở Wk6 thứ yếu lần thứ nhất					12,1%	19,1%	6,9% (1,6)	0,0478
Sự thuyên giảm ở Wk10 thứ yếu lần thứ hai	12,1%	26,6 %	14,4% (2,2)	0,0012	13%	28,7%	15,5 % (2,2)	<0,00 01
Sự thuyên giảm duy trì (ở cả Wk 6&10)	8,3 %	12,0%	3,7% (1,4)	0,2755	8,2%	15,3%	7% (1,9)	0,0249
Đáp ứng gia tăng (CDAI100)	22,3 %	39,2 %	16,9% (1,8)	0,0011				

Bảng 54: Kết quả ở các bệnh nhân chưa từng sử dụng chất đối kháng kháng TNF- α (n=101, 24% trong tổng số bệnh nhân)

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

Bảng 55: Kết quả nghiên cứu: Thuyên giảm lâm sàng ở tuần 6 và 10, Phân nhóm chủ yếu —Thất bại trong điều trị bằng Tx trước đây, Tổng ITT

Nhóm phụ	Biến số	Giả dược	VDZ	Chênh lệch	95% CI
Thất bại trong điều trị bằng kháng TNF trước đây (75% của ITT)	N	156	155		
	Thuyên giảm ở Wk6 (%)	12,8	14,8	2	(-5,7, 9,7)
	Thuyên giảm ở Wk10 (%)	12,8	26,5	13,6	(4,9, 22,3)
Thất bại trong điều trị bằng điều biến miễn dịch nhưng thành công trong việc	N	45	44		
	Thuyên giảm ở Wk 6 (%)	11,1	31,8	20,7	(-0,5, 39,7)
	Thuyên giảm	15,6	31,8	16,3	(-1,1,

điều trị bằng kháng TNF trước đây (21% ITT)	ở Wk10 (%)				33,6)
Chỉ thất bại trong điều trị bằng corticosteroid trước đây (3% ITT)	N	5	9		
	Thuyên giảm ở Wk6 (%)	0	33,3	33,3	(-23,9, 75,7)
	Thuyên giảm ở Wk10 (%)	0	44,4	44,4	(-13,4, 85,3)

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

Ví dụ 20: Độ ổn định

Các chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ khác nhau được thử nghiệm về độ ổn định trong khoảng thời gian từ 6 tháng đến 24 tháng ở 5°C (Bảng 6 và 7). Các chế phẩm có độ pH nằm trong khoảng 6,0 đến 6,2 có thoái hóa loài chính nhỏ hơn khoảng 4% sau 6 tháng và ở 24 tháng.

Các chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ khác nhau được thử nghiệm về độ ổn định bằng SEC trong khoảng thời gian lên tới 24 tháng (Bảng 4 và 5). Chế phẩm với nồng độ protein 60mg/ml và chứa 25mM xitrat có sự thay đổi về mức kết tụ 0,1% đến 0,2% sau 2 năm, trong khi chế phẩm chứa 160mg/ml protein và 25mM xitrat có sự gia tăng kết tụ khoảng 0,3% sau 2 năm. Có sự gia tăng 0,6% đến 1,1% kết tụ đối với chế phẩm chứa 60mg/ml, 110mg/ml, hoặc 160mg/ml protein mà không chứa xitrat. Đối với chế phẩm thử nghiệm chứa xitrat, nhưng không chứa histidin, sau 12 tháng và 24 tháng, kết tụ tăng khoảng 0,3% đến 0,4%.

Ví dụ 21: Xác định ảnh hưởng của vedolizumab đến tỷ lệ CD4:CD8

Các đối tượng khỏe mạnh ở lứa tuổi 18 đến 45 được điều trị bằng một liều đơn 450mg vedolizumab được hoàn nguyên từ chế phẩm đông khô chứa 10% sucroza và được pha loãng thành hệ dung dịch truyền chứa 0,9% nước muối. Dịch não tủy (Cerebrospinal fluid - CSF) được gom bằng cách chọc dò tủy sống trước (đường gốc) và 5 tuần sau liều đơn 450mg vedolizumab. Mỗi đối tượng đóng vai trò làm mẫu đối chứng của chính họ.

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

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

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

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

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

Vedolizumab không làm giảm đáng kể tỷ lệ CD4+ : CD8+ (Bảng 56). Không có vật chủ nào có tỷ lệ CD4+:CD8+ sau khi dùng thuốc < 1 ($p < 0,0001$ (thử nghiệm t 1-phiá)). Vedolizumab không làm giảm đáng kể số lượng các tế bào lympho T CD4+

hoặc CD8+ trong CSF. Ngoài ra, không có sự thay đổi đáng kể về tỷ lệ % các tế bào lympho T CD4+ và CD8+ trong CSF (Bảng 57). Ngoài ra, không quan sát thấy sự thay đổi đáng kể nào về WBC máu ngoại biên, các tế bào lympho T nhớ CD4+ và CD8+ (Bảng 58).

Bảng 56: Ảnh hưởng của việc điều trị đến tỷ lệ CD4+:CD8+ trong CSF (Nhóm có thể đánh giá, n=13)

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

CI=khoảng tin cậy

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

† Chênh lệch được định nghĩa là tỷ lệ ở tuần 5 trừ đi tỷ lệ đường gốc

Bảng 57: Ảnh hưởng của việc điều trị đến số lượng tế bào lympho CD4+ và CD8+ trong CSF (Nhóm có thể đánh giá, n=13)

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

Bảng 58: Số lượng lympho bào T nhớ máu ngoại biên (RO+) (Nhóm có thể đánh giá, n=13)

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

Tóm tắt

Vedolizumab không ảnh hưởng đến số lượng tế bào CD4+ và CD8+ trong CSF hoặc tỷ lệ CD4+:CD8+ ở những người tình nguyện khỏe mạnh sau khi dùng liều đơn 450mg. Không có đối tượng nào có tỷ lệ CD4+:CD8+ trong CSF sau khi dùng thuốc giảm đến nhỏ hơn 1. Không phát hiện thấy vedolizumab trong CSF. Ngoài ra, không quan sát thấy sự thay đổi nào trong WBC tổng hoặc tập hợp con lympho bào T nhớ CD4+ và CD8+ trong máu ngoại biên. Sự bão hòa ($\alpha\beta 7$) đích trong máu xảy ra ở tất cả các đối tượng ở thời điểm đánh giá điểm cuối. Lượng và tỷ lệ tế bào lympho CD4+ và CD8+ trong CSF là tương tự với lượng và tỷ lệ đã được báo cáo trước đây trong các tài liệu.

Kết quả này phù hợp với việc vedolizumab không có ảnh hưởng đến sự giám sát miễn dịch sinh lý ở CNS và sự viêm CNS bệnh lý ở khi.

Mặc dù sáng chế này được chỉ ra cụ thể và được mô tả có dựa trên các phương án ưu tiên của nó, chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng có thể thực hiện các thay đổi khác nhau về hình thức và chi tiết đối với các phương án này mà không đi chệch khỏi phạm vi của sáng chế được bao hàm bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Bảng 59: Trình tự

SEQ ID NO:	Trình tự được thể hiện	Mô tả
1	Hình 1	ADN mã hoá chuỗi nặng của globulin miễn dịch kháng $\alpha\beta 7$ đã được làm tương thích với người
2	Hình 1	Trình tự axit amin của chuỗi nặng của globulin miễn dịch kháng $\alpha\beta 7$ đã được làm tương thích với người
3	Hình 2	ADN mã hoá chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch kháng $\alpha\beta 7$ đã được làm tương thích với người
4	Hình 2	Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch kháng $\alpha\beta 7$ đã được làm tương thích với người
5	Hình 3	Chuỗi nhẹ trưởng thành tương thích với người của LDP-02
6	Hình 4	Vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa ở loài người
7	Hình 4	Vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa ở loài chuột
8	được viện dẫn ở trang 31 SYWMH	CDR1 của chuỗi nặng của kháng thể ACT-1 ở chuột nhắt

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm lỏng ổn định chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, xitrat, và ít nhất một axit amin tự do, trong đó kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa vùng quyết định bổ cứu 1 (CDR1) chứa SEQ ID NO:11, CDR2 chứa SEQ ID NO:12, và CDR3 chứa SEQ ID NO:13, và chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa CDR1 chứa SEQ ID NO:8, CDR2 chứa SEQ ID NO:9, và CDR3 chứa SEQ ID NO:10.
2. Dược phẩm lỏng ổn định theo điểm 1, trong đó tỷ lệ mol của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ so với xitrat là khoảng 1:4 đến khoảng 1:100.
3. Dược phẩm lỏng ổn định theo điểm 1 hoặc 2, trong đó axit amin tự do được chọn từ nhóm gồm histidin, alanin, arginin, glyxin, axit glutamic và các tổ hợp của chúng.
4. Dược phẩm lỏng ổn định theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dược phẩm này còn chứa thêm chất hoạt động bề mặt.
5. Dược phẩm lỏng ổn định theo điểm 4, trong đó tỷ lệ mol của xitrat so với chất hoạt động bề mặt là khoảng 3:1 đến khoảng 156:1.
6. Dược phẩm lỏng ổn định theo điểm 4 hoặc 5, trong đó chất hoạt động bề mặt là polysorbat 20, polysorbat 80, hoặc poloxame và các tổ hợp của chúng.
7. Dược phẩm lỏng ổn định theo điểm 6, trong đó chất hoạt động bề mặt là polysorbat 80 và nồng độ polysorbat 80 là 0,01% đến 0,5%.
8. Dược phẩm lỏng ổn định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó nồng độ xitrat là 5 mM đến 50 mM.
9. Dược phẩm lỏng ổn định chứa ít nhất khoảng 60 mg/ml đến khoảng 190 mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất chống oxy hóa hoặc chất tạo chelat, và ít nhất một axit amin tự do, trong đó kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa vùng quyết định bổ cứu 1 (CDR1) chứa SEQ ID NO:11, CDR2 chứa SEQ ID NO:12, và CDR3 chứa SEQ ID NO:13, và chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa CDR1 chứa SEQ ID NO:8, CDR2 chứa SEQ ID NO:9, và CDR3 chứa SEQ ID NO:10.
10. Dược phẩm lỏng ổn định chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất chống oxy hóa hoặc chất tạo chelat, và ít nhất một axit amin tự do, trong đó kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa vùng quyết định bổ cứu 1 (CDR1) chứa SEQ ID NO:11, CDR2 chứa SEQ ID NO:12, và CDR3 chứa SEQ ID NO:13, và chứa vùng

biến đổi của chuỗi nặng chứa CDR1 chứa SEQ ID NO:8, CDR2 chứa SEQ ID NO:9, và CDR3 chứa SEQ ID NO:10, và trong đó được phẩm này có độ pH là 6,1 đến 7,0.

11. Được phẩm lỏng ổn định theo điểm 9 hoặc 10, trong đó được phẩm này chứa khoảng 150 mg/ml đến khoảng 180 mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

12. Được phẩm lỏng ổn định theo điểm 9 hoặc 10, trong đó chất chống oxy hóa hoặc chất tạo chelat là xitrat hoặc EDTA.

13. Được phẩm lỏng ổn định theo điểm 12, trong đó chất chống oxy hóa hoặc chất tạo chelat là xitrat.

14. Được phẩm lỏng ổn định theo điểm 13, trong đó nồng độ xitrat là 5 mM đến 50 mM.

15. Được phẩm lỏng ổn định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 15, trong đó được phẩm này còn chứa thêm chất hoạt động bề mặt.

16. Được phẩm lỏng ổn định theo điểm 15, trong đó tỷ lệ mol chất hoạt động bề mặt so với kháng thể là từ khoảng 0,7:1 đến khoảng 2,0:1.

17. Được phẩm lỏng ổn định theo điểm 15, trong đó tỷ lệ mol của chất chống oxy hóa hoặc chất tạo chelat so với chất hoạt động bề mặt là khoảng 3:1 đến khoảng 156:1.

18. Được phẩm lỏng ổn định theo điểm 15, trong đó chất hoạt động bề mặt là polysorbat 20, polysorbat 80, poloxame và các tổ hợp của chúng.

19. Được phẩm lỏng ổn định theo điểm 18, trong đó chất hoạt động bề mặt là polysorbat 80 và nồng độ polysorbat 80 là 0,01% đến 0,5%.

20. Được phẩm lỏng ổn định theo điểm 9 hoặc 10, trong đó được phẩm này chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, xitrat, histidin, arginin, và polysorbat 80, trong đó kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa vùng quyết định bổ cứu 1 (CDR1) chứa SEQ ID NO:11, CDR2 chứa SEQ ID NO:12, và CDR3 chứa SEQ ID NO:13, và chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa CDR1 chứa SEQ ID NO:8, CDR2 chứa SEQ ID NO:9, và CDR3 chứa SEQ ID NO:10.

21. Được phẩm lỏng ổn định theo điểm 20, trong đó nồng độ kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ là ít nhất khoảng 140 mg/ml.

22. Dược phẩm lỏng ổn định theo điểm 20 hoặc 21, trong đó nồng độ histidin là 10 mM đến 75 mM.
23. Dược phẩm lỏng ổn định theo điểm 20 hoặc 21, trong đó nồng độ arginin là 50 mM đến 150 mM.
24. Dược phẩm lỏng ổn định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 20 đến 23, trong đó nồng độ xitrat là 5 mM đến 50 mM.
25. Dược phẩm lỏng ổn định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24, trong đó kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các axit amin 20-140 của SEQ ID NO: 2 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các axit amin 20-131 của SEQ ID NO: 4 hoặc các axit amin 21-132 của SEQ ID NO: 5.
26. Dược phẩm lỏng ổn định theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể là vedolizumab.
27. Vật phẩm sản xuất chứa dụng cụ chứa, dược phẩm lỏng ổn định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 26, và hướng dẫn sử dụng dược phẩm này.
28. Vật phẩm theo điểm 27, trong đó dược phẩm lỏng ổn định chứa 108 mg kháng thể.
29. Vật phẩm theo điểm 27, trong đó vật phẩm này là xy lanh đã nạp trước.

HÌNH 1A

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

```
gaatttcgagatc gatCTCA CCatgggatggagctgtatc atcctctcttcttggtagcaacagctacagggtgcactcccag
gfgCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTTAAGAAAGCCTGGGGCTTCAAGTGAA
GGTGCTCTGCAAGGGTTCTGGCTACACCTTCACCCAGCTACTGGATGCGAGAGATTGATCCTTC
TGAGGCAGGCGCTGGCCAACGTCTAGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTC
TGAGAGTAATACTAACTACAATCAAAATTCAAAGGACGCGTCACATTGACT
GTAGACATTTCGCTAGCACAGCCTACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGATCTG
AGGACACTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGGTTACGACGGATGGGACTA
TGCTATTGACTACTGGGTCAAGGCACCCCTGGTCAACCGTCAACCGTCAAGCCTCCA
CCAAAGGCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAACCGGTGA
CGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAAGCGCGTGCACACCTTCCCGGC
TGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAATCTTGTGACAAAATCAC
ACATGCCCCACCGTGCCCCAGCACCTGAACCTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCGGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAACGCTCCTCACCGTCTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGC
```

AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCT
 GCCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTACAGCTGACCTGCCCTG
 GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
 AGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGCTGCTGACTCCGACGGCTC
 CTTCTTCCTTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAtaatctagaca

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

MGW̄SCILFLVATATGVHS
 QVQLVQSGAEVKKP̄GASVKVSCKSGSYTFTSYWMHWRQAPGQRLEWIGEIDP
SESNTNYNQKF̄KGRVTLTVDISASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGWDY
 AIDYW̄GQGTLVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVTFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS
 PGK

HÌNH 1B

HÌNH 2

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

```
gaattctcgagatgatCTCACCatggatggagctgtaatcctctcttctgtagcaacagctacaggtgccactccgat
GTAGTGATGACTCAAAAGTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCCTGGAGAACCCAGC
TTCTATCTCTTGcAGGTCTAGTCAGAGTCTTGCAAAAGATTATGGGAACACCT
ATTTGTCTTGTAACCTGCAGAAAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTAT
GGGATTTCCAAcAGATTTTCTGGGTGCCAGACAGTTcAGTGGCAGTGGTT
CAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCTCGGAGTAGAGGCTGAGGACGTGGG
AGTGTAATTACTGCTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACGTTCCGGACAGGGG
ACCAAGTGGAGATCAAGCTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGcAGTTGAAATCTGGAActGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTATCCcAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGTGGATAACGCCCT
CCAATCGGGTAACTCCcAGGAGAGTGTCAcAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
CACCTACAGCCTCAGcAGcACCCTGACCCCTGAGCAAAAGcAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCCTGCcGAAGTcACCCATcAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTtagtctagagcagc
```

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

```
MGWSCIILFLVATATGVHS
DVVMTQSPLSLPVTPGPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYGI
SNRFSGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLOGTHQPYTFGQGTKVEI
RTVAAPSVFIFPPSPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

HÌNH 3

So sánh cặp đôi MLN02 mới - no sig		LDP-02-no sig.txt	
A	1	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ	50
B	1	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ	50
	51	LLIYGISNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGYYCLQGT HQP	100
	51	LLIYGISNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGYYCLQGT HQP	100
	101	YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK	150
	101	YTFGQGTKVEIKRADAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK	150
	151	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE	200
	151	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE	200
	201	VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219
	201	VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219

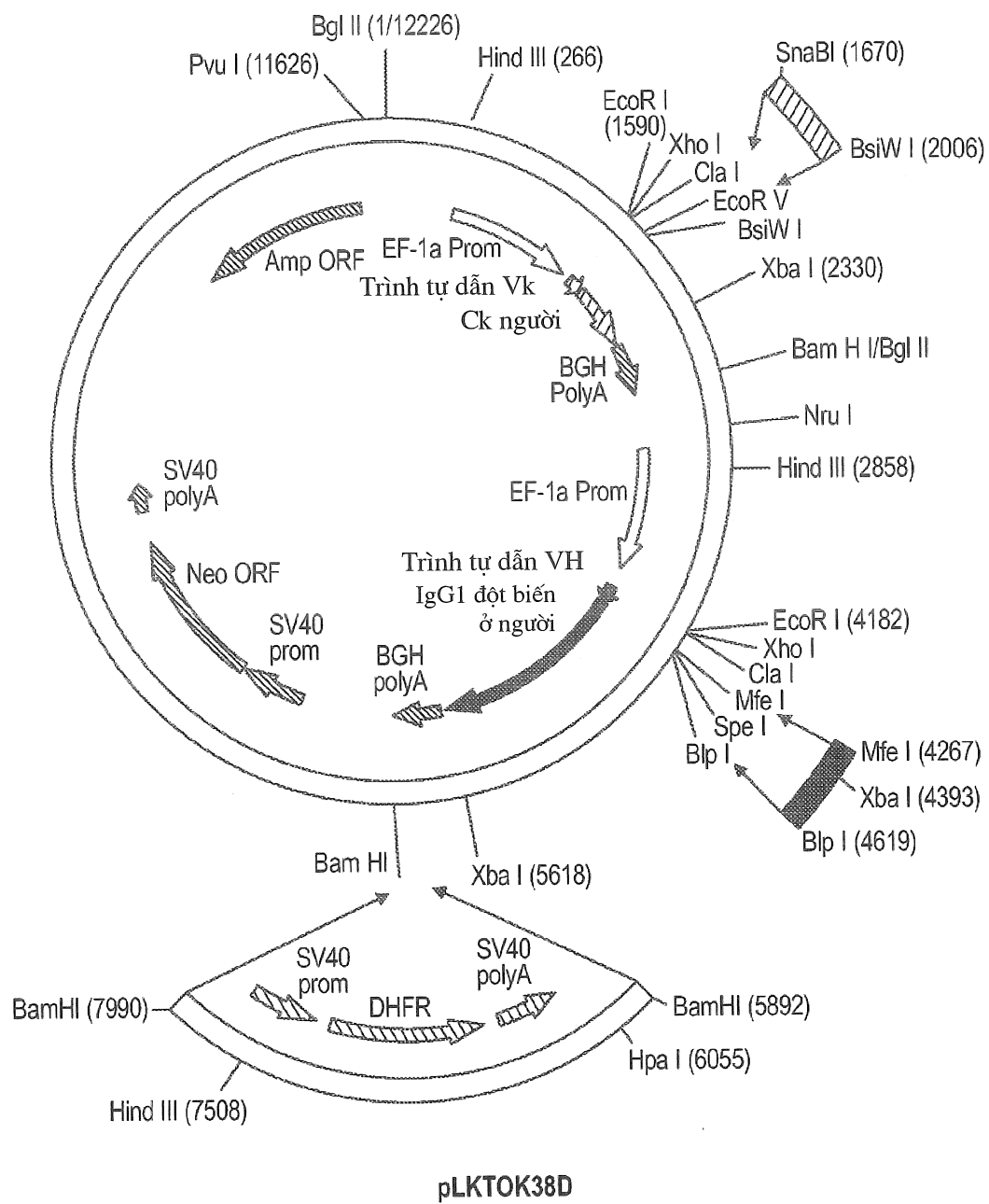
HÌNH 4

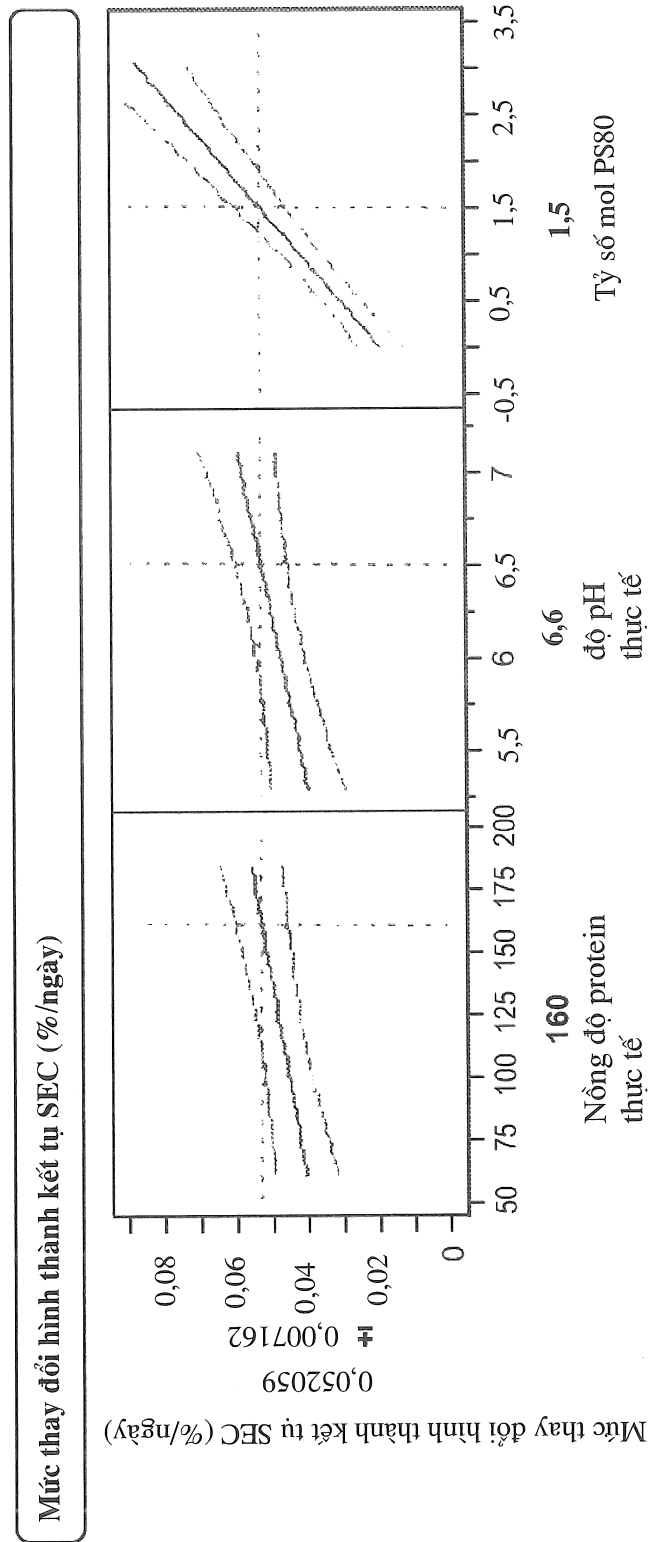
So sánh cặp đôi hàng số kappa ở người

MI: hàng số kappa ở loài gặm nhấm.txt

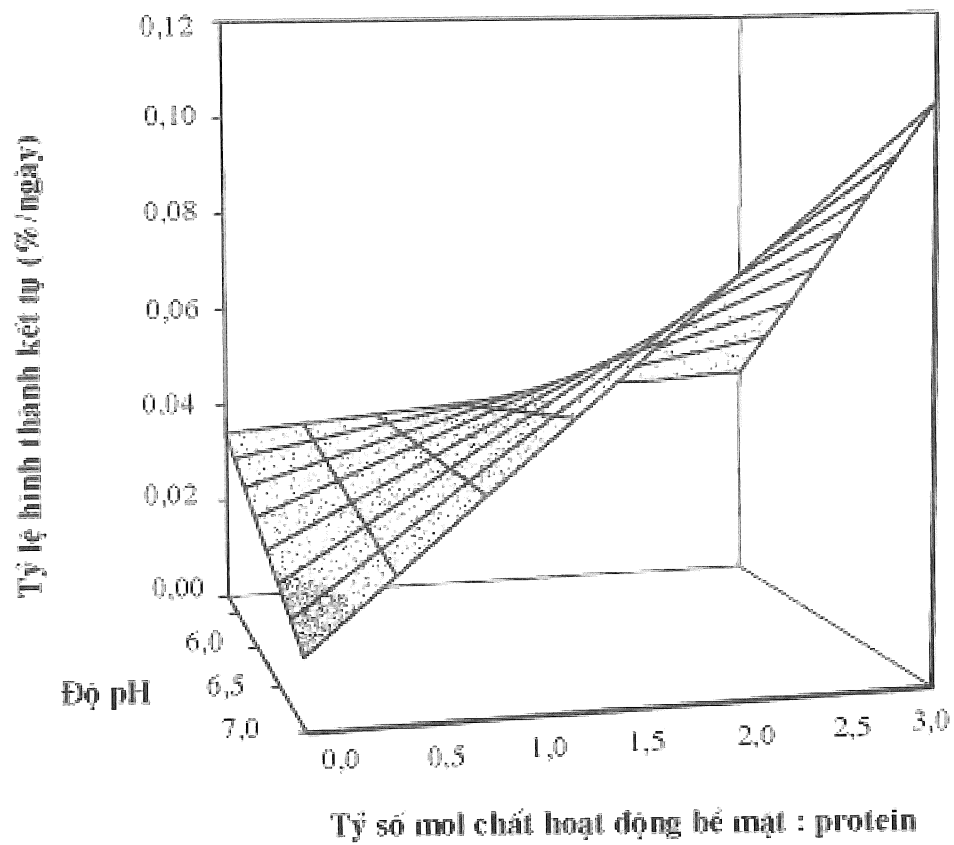
```
A 1 rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsg 50
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
B 1 radaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfypkdinvkwidgserqn 50
  .
  .
  .
51 nsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtk 100
  | | : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
51 gvlnswtddqdskdstysmsstltltkdeyerhnsytceathktstspivk 100

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

**HÌNH 5**



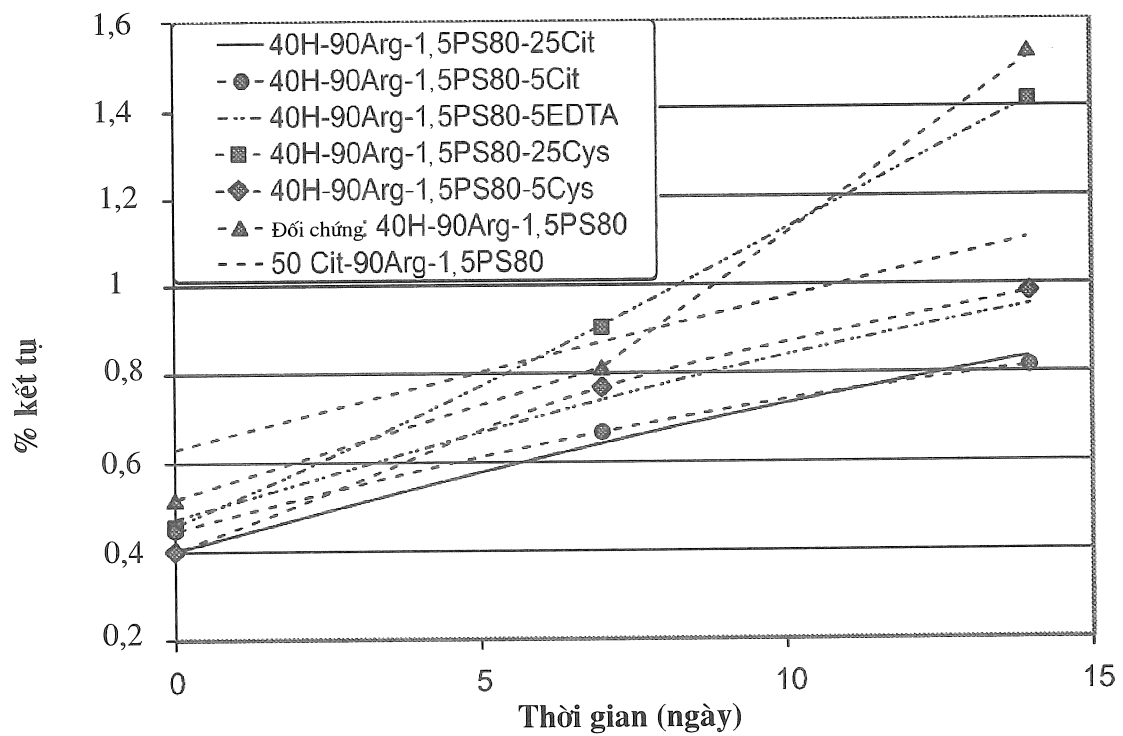
HÌNH 6



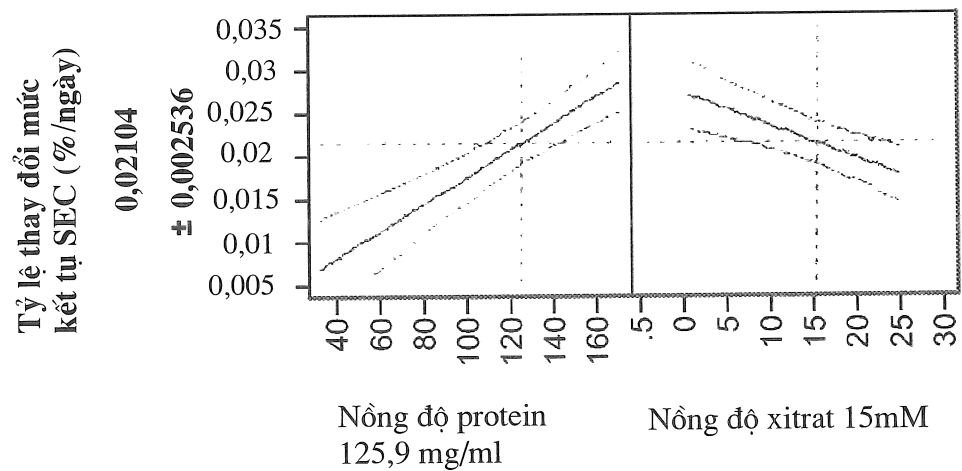
HÌNH 7

9/18

HÌNH 8



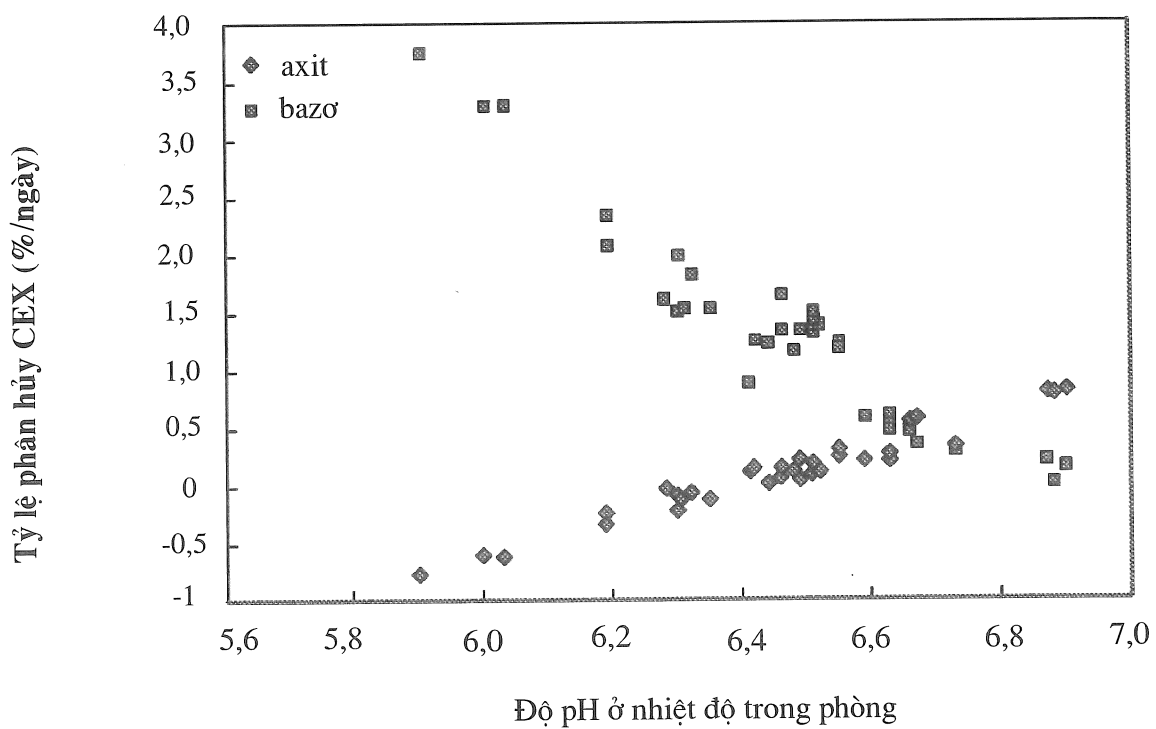
Profin dự báo



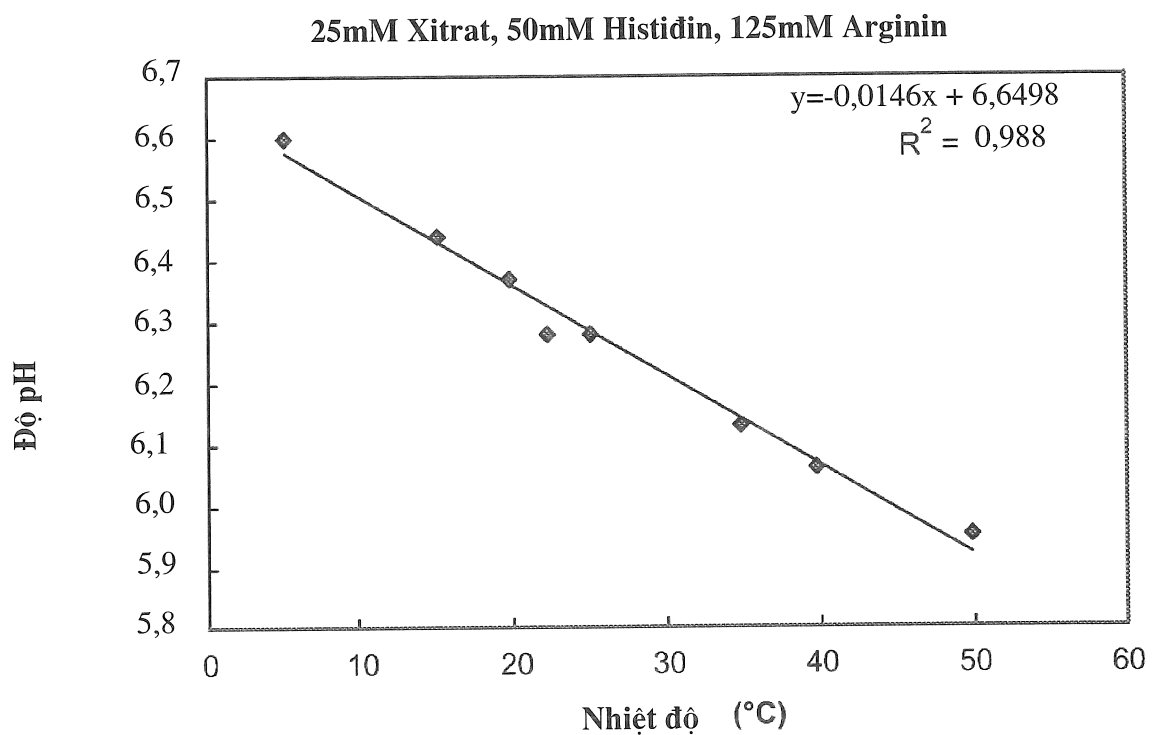
HÌNH 9

10/18

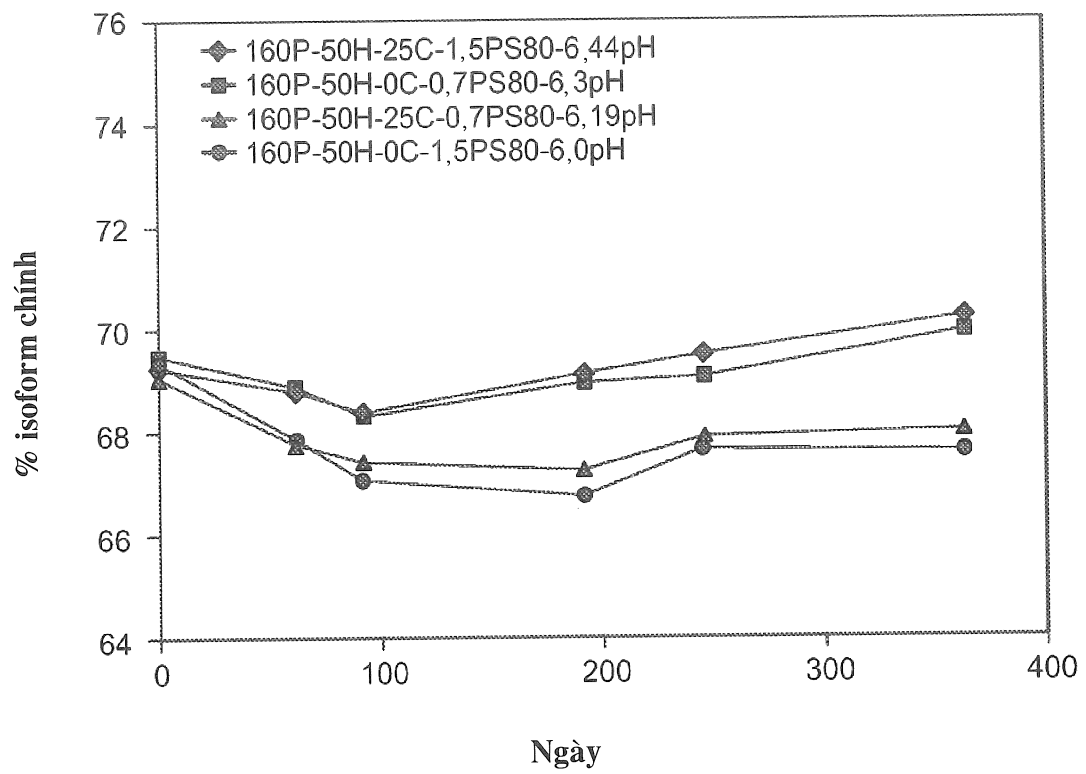
HÌNH 10



HÌNH 11

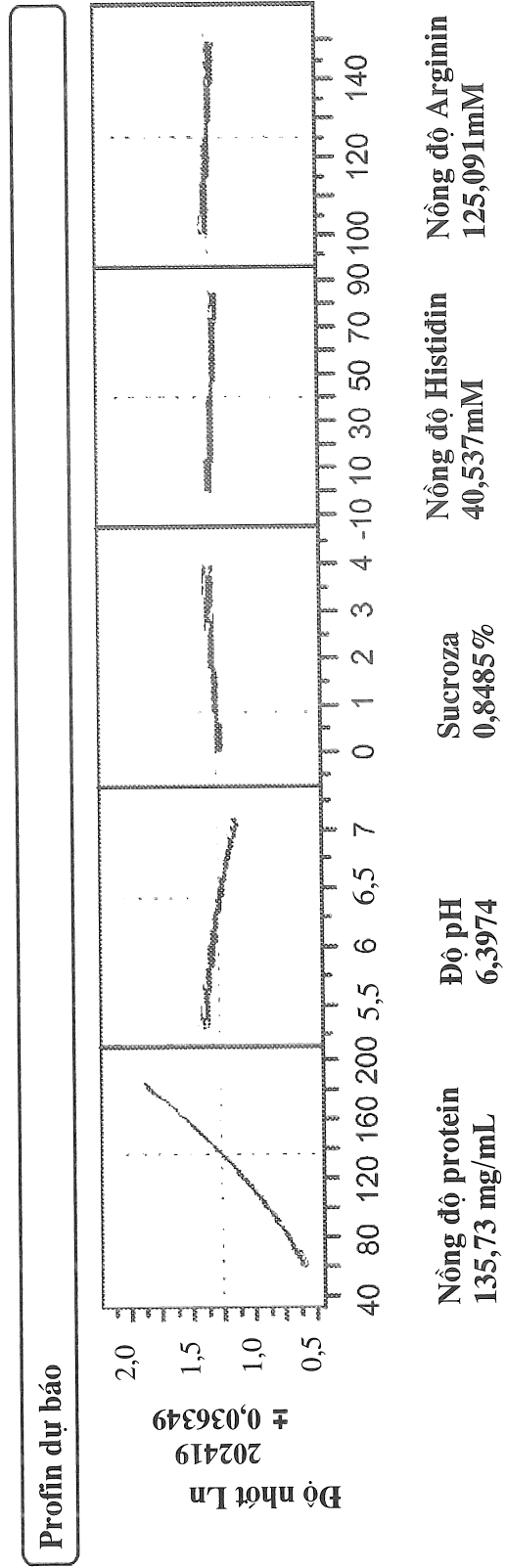


HÌNH 12



12/18

HÌNH 13



HÌNH 14A

**Vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa
từ kháng thể GM607'CI**

SEQ ID NO: 14

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

14/18

Vùng biến đổi chuỗi nặng từ kháng thể 21/28'CL

SEQ ID NO: 15

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

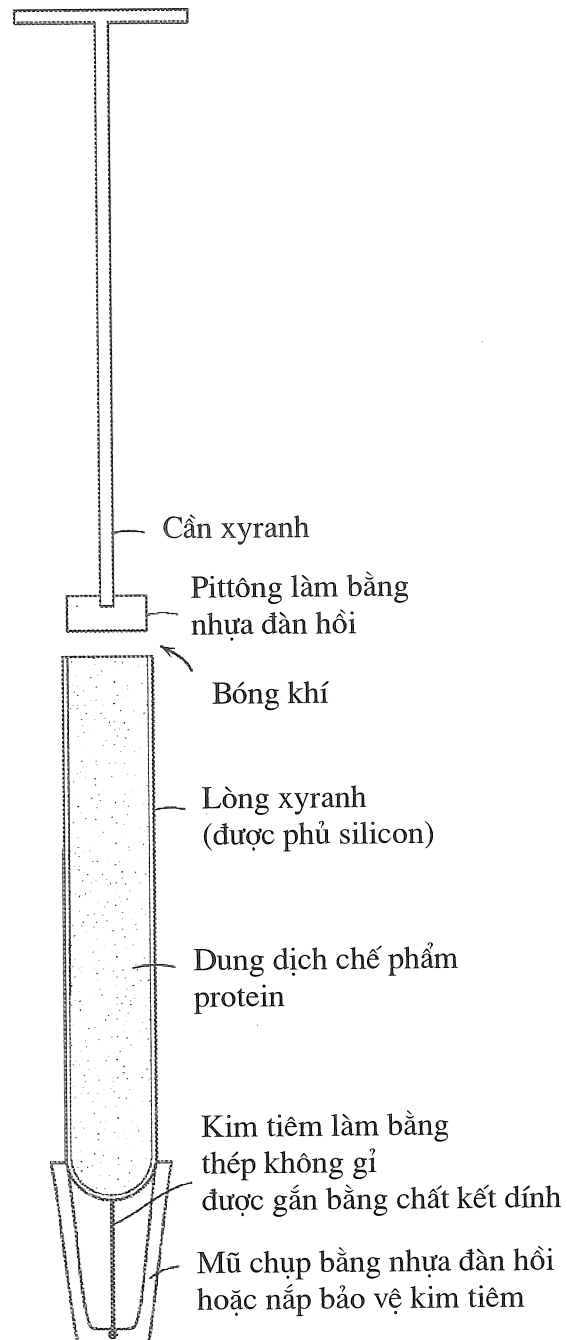
Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

HÌNH 14B

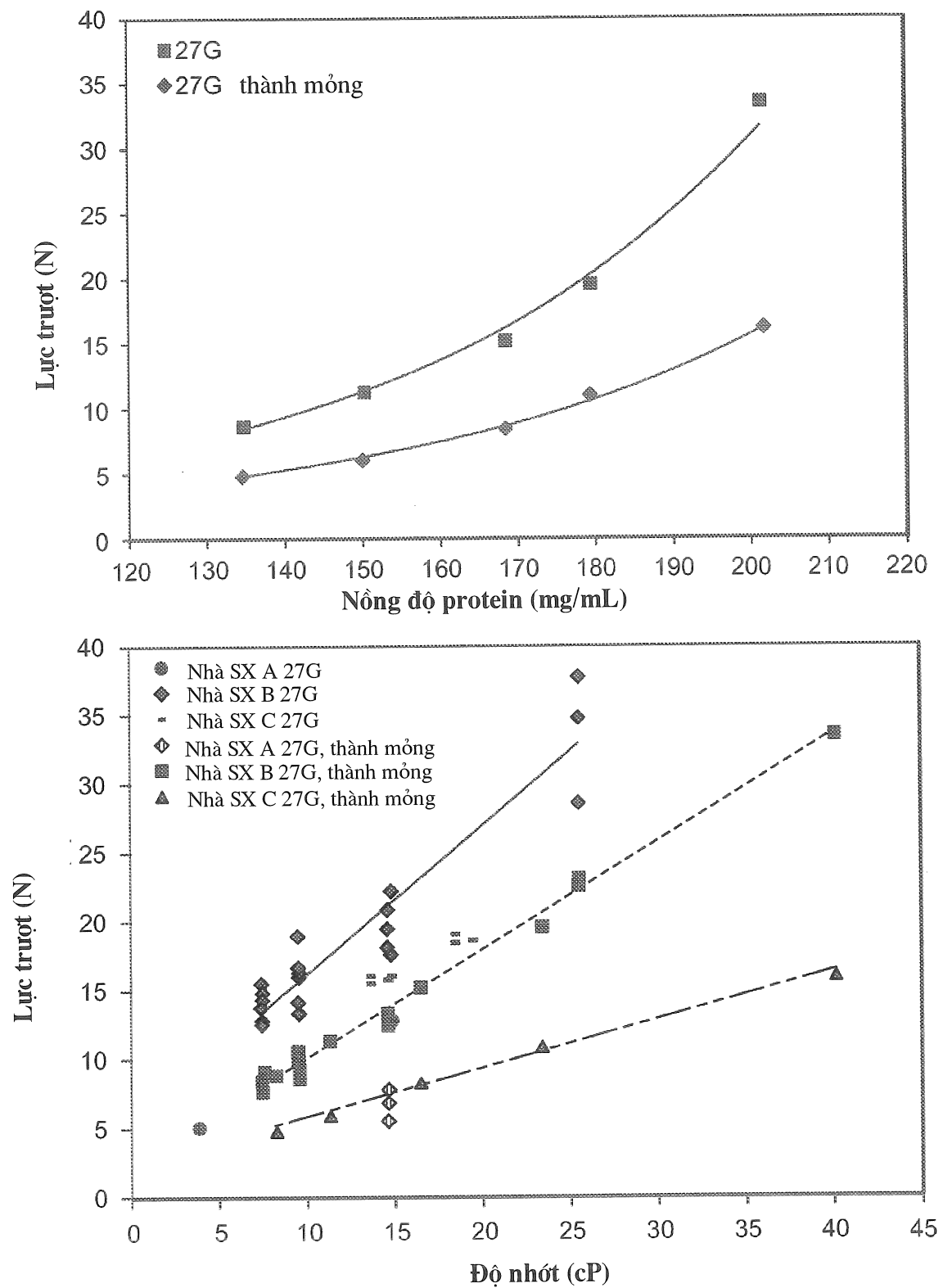
HÌNH 15

Hợp phần của sản phẩm protein trong xyranh nạp sẵn



16/18

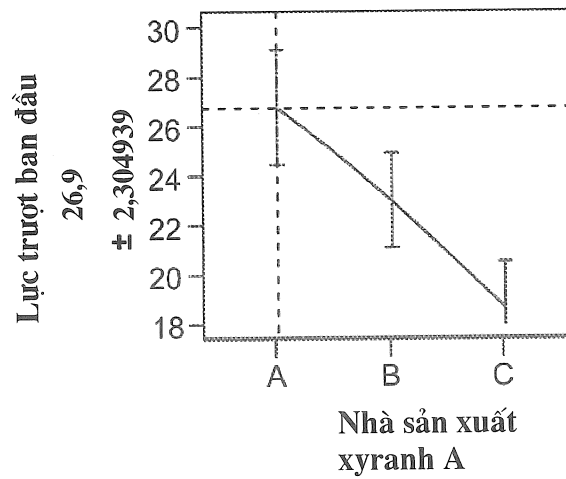
HÌNH 16



17/18

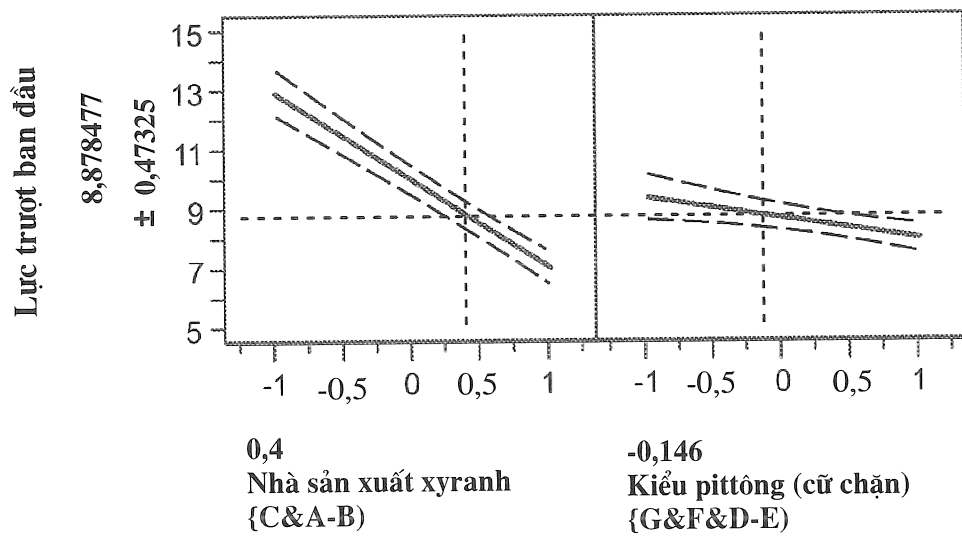
HÌNH 17A

Profin dự báo: lực trượt ban đầu

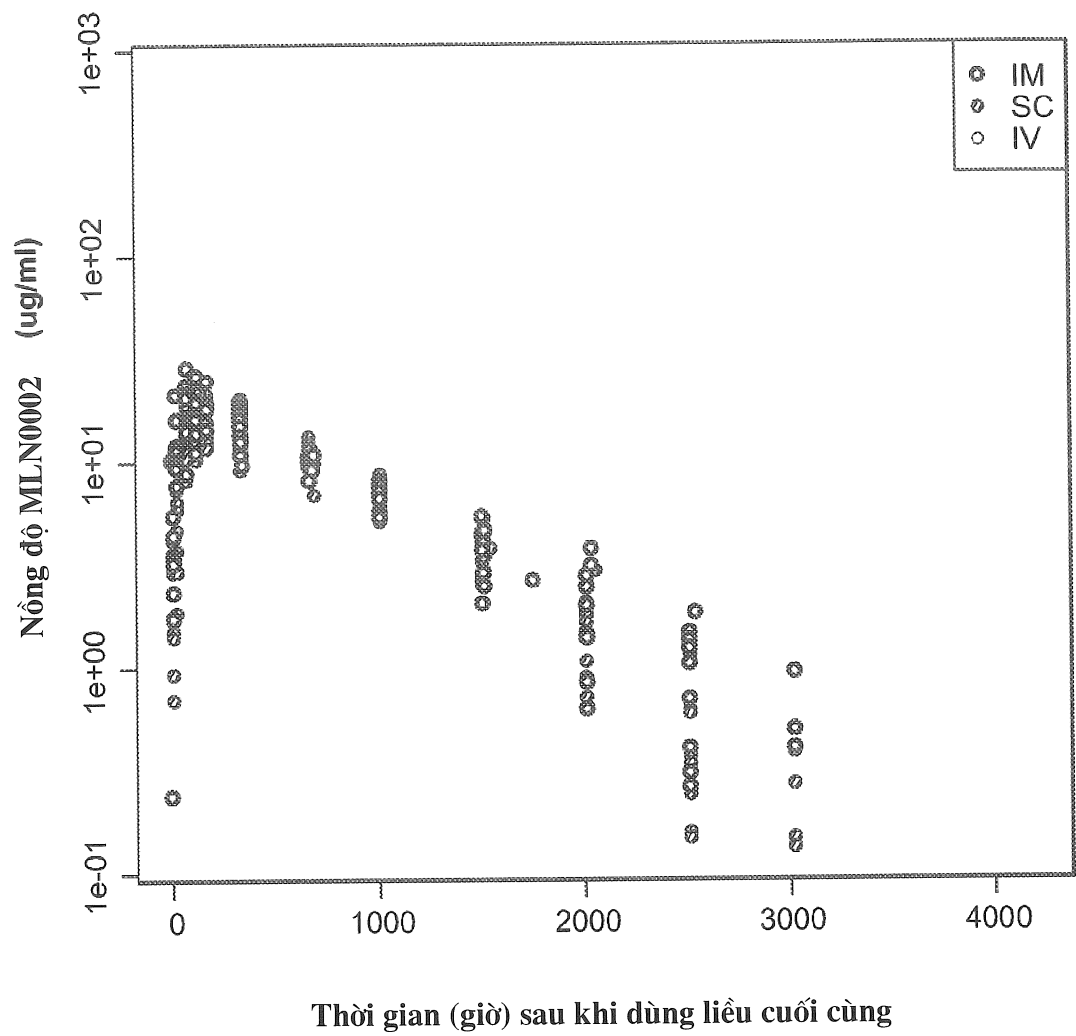


HÌNH 17B

Profin dự báo: lực trượt ban đầu



HÌNH 18



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> DƯỢC PHẨM LỎNG ỔN ĐỊNH CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG $\alpha 4\beta 7$ VÀ VẬT PHẨM CHỨA DƯỢC PHẨM NÀY

<130> 079259-0603

<140>

<141>

<150> 61/544,054

<151> 2011-10-06

<150> 61/481,522

<151> 2011-05-02

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1445

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

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

<400> 1

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa
60

cagctacagg tgtccactcc caggtgcaat tgggtgcagtc tggggctgag gttaagaagc
120

ctggggccttc agtgaaggtg tcctgcaagg gttctggcta caccttcacc agctactgga
180

tgcattgggt gaggcaggcg cctggccaac gtctagagtg gatcggagag attgatacctt
240

ctgagagtaa tactaactac aatcaaaaat tcaagggacg cgtcacattg actgtagaca
300

tttccgctag cacagcctac atggagctct ccagcctgag atctgaggac actgcggtct
360

actattgtgc aagaggggggt tacgacggat gggactatgc tattgactac tgggggtcaag
420

gcaccctgggt caccgtcagc tcagcctcca ccaagggcc atcgggtcttc cccctggcac
480

cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact
540

tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct
 600
 tccccggtgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct
 660
 ccagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca
 720
 aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc
 780
 cagcacctga actcgcgggg gcaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca
 840
 ccctcatgat ctcccgacc cctgaggta catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag
 900
 accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa
 960
 agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc
 1020
 accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag
 1080
 cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca
 1140
 ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca
 1200
 aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca
 1260
 actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc
 1320
 tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcagtctcc gtgatgcatg
 1380
 aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaataatcta
 1440
 gagca
 1445

<210> 2

<211> 470

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 2

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

Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys		
			20					25					30				
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe		
		35					40					45					
Thr	Ser	Tyr	Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu		
	50					55					60						
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	Glu	Ser	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn		
65					70					75					80		
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Ile	Ser	Ala	Ser		
				85					90					95			
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val		
			100					105					110				
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Gly	Trp	Asp	Tyr	Ala	Ile	Asp		
		115					120					125					
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
	130					135					140						
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
145					150					155					160		
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
				165					170					175			
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		
			180				185						190				
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val		
		195					200					205					
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn		
	210					215					220						
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro		
225					230					235					240		
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu		
				245					250					255			
Leu	Ala	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp		
			260					265					270				
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp		
		275					280					285					
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly		
	290					295					300						
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn		
305					310					315					320		
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp		
				325					330					335			

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 3

<211> 751

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 3

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa
60

cagctacagg tgtccactcc gatgtagtga tgactcaaag tccactctcc ctgcctgtca
120

cccctggaga accagcttct atctcttgca ggtctagtca gagtcttgca aagagttatg
180

ggaacaccta tttgtcttgg tacctgcaga agcctggcca gtctccacag ctctcatct
240

atgggatttc caacagattt tctgggggtgc cagacagggt cagtggcagt ggttcaggga
300

cagatttcac actcaagatc tcgagagtag aggctgagga cgtgggagtg tattactgct
360

tacaaggtac acatcagccg tacacgttcg gacaggggac caaggtggag atcaagcgta
420

cggtggctgc accatctgtc ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa
480

ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga
540

aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca
600

aggacagcac ctacagcctc agcagcacc tgaccctgag caaagcagac tacgagaaac
660

acaaagtcta cgctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct
720

tcaacagggg agagtgttag tctagagcag c
751

<210> 4

<211> 238

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả Trình tự nhân tạo:Polypeptit tổng hợp"

<400> 5

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

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

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

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 6
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Loài chuột

<400> 7
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 35 40 45
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 65 70 75 80
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 100 105

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

<400> 8
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5

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

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

Gly

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 111

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 14

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

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

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

<210> 15

<211> 119

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 15

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115