



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

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

(11)



1-0051366

(51)^{2020.01} A61K 38/46; A61P 7/04; C07K 16/40; (13) B
A61K 39/395

(21) 1-2020-07324

(22) 14/06/2019

(86) PCT/FR2019/051456 14/06/2019

(87) WO2019/239080 19/12/2019

(30) 1855239 14/06/2018 FR

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/06/2021 399A

(73) LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES
BIOTECHNOLOGIES (FR)

Tour W - 102 Terrasse Boieldieu 19ème Étage - 92800 Puteaux - France

(72) PLANTIER, Jean-Luc (FR).

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

(54) DƯỢC PHẨM VÀ SẢN PHẨM KẾT HỢP CHỨA YẾU TỐ VII VÀ KHÁNG THỂ
ĐA ĐẶC HIỆU

(21) 1-2020-07324

(57) Sáng chế đề cập đến tổ hợp chứa yếu tố VII chuyển gen và kháng thể đa đặc hiệu được định hướng kháng lại yếu tố IX và yếu tố X, để dùng đồng thời hoặc tách biệt.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến được phẩm hữu ích để điều trị rối loạn đông máu, như bệnh ưa chảy máu A, đặc biệt là ở bệnh nhân có bệnh ưa chảy máu typ A nhờ sự phát triển của các kháng thể ức chế yếu tố VIII.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hiện tượng đông máu gồm có hai con đường, một con đường là nội sinh và con đường còn lại là ngoại sinh, dẫn đến con đường chung cuối cùng. Sự kết hợp của cả hai cơ chế này đảm bảo việc hình thành các cục máu rắn và mềm dẻo chịu được áp suất trong máu. Thông qua hoạt động của thrombin, fibrinogen trải qua các cải biến hóa học mà dẫn đến việc hình thành fibrin. Fibrin cần thiết cho sự hình thành các cục đông.

Con đường nội sinh chứa các yếu tố có trong dòng máu và quy trình đông máu bắt đầu trong chính mạch máu đó. Con đường ngoại sinh gồm các yếu tố mô thường không có trong dòng máu và được giải phóng khi tổn thương mạch.

Yếu tố VII là glycoprotein có trong con đường đông máu ngoại sinh. Để bắt đầu đợt đông máu, thì FVII phải được hoạt hóa thành FVIIa. Mỗi khi được hoạt hóa, thì FVIIa tạo phức với protein yếu tố mô (Tissue Factor-TF) kết hợp với hai phospholipit, mà được giải phóng khi tổn thương mạch. Một mình FVIIa (không tạo phức với yếu tố mô) cho thấy hoạt tính phân giải protein thấp. Sau đó phức hợp FVIIa-FT biến đổi yếu tố X thành yếu tố Xa khi có mặt các ion canxi. Phức hợp này cũng tác động đến sự hoạt hóa yếu tố FIX thành FIXa, từ đó xúc tác con đường nội sinh. Yếu tố IXa và yếu tố Xa, lần lượt, hoạt hóa yếu tố VII đã hoạt hóa.

Yếu tố IX và yếu tố X có trong con đường đông máu nội sinh. Yếu tố IX đã hoạt hóa khiến cho yếu tố X có thể được hoạt hóa thành yếu tố Xa.

Yếu tố Xa tạo phức với yếu tố FV đã hoạt hóa và prothrombinaza biến đổi prothrombin thành thrombin. Sau đó thrombin tác động đến fibrinogen để biến đổi

nó thành fibrin và cũng khiến cho FVIII và FV có thể được hoạt hóa lần lượt thành FVIIIa và FVa. Prothrombin, một phần, cho phép hoạt hóa yếu tố XIII thành FXIIIa, chịu trách nhiệm về sự đông đặc của cục fibrin, khi có mặt canxi có trong huyết tương theo cách tự nhiên.

Tuy nhiên, khi thiếu yếu tố đông máu, thì đợt đông máu bị ngắt quãng hoặc thiếu hụt và sau đó các tác giả sáng chế đề cập về sự đông máu bất thường.

Yếu tố VII đã hoạt hóa tác động khu trú khi có mặt yếu tố mô được giải phóng sau khi tổn thương mô gây chảy máu, ngay cả khi không có yếu tố VIII hoặc yếu tố IX. Đây là lý do vì sao yếu tố VII, tốt hơn nếu ở dạng được hoạt hóa, được sử dụng để điều trị một số rối loạn đông máu nhất định biểu hiện dưới dạng chảy máu.

Vì vậy, yếu tố VII được sử dụng để điều trị cho các bệnh nhân có bệnh ưa chảy máu, biểu hiện sự thiếu hụt yếu tố VIII (bệnh ưa chảy máu typ A) hoặc yếu tố IX (bệnh ưa chảy máu typ B), cũng như các bệnh nhân biểu hiện các thiếu hụt yếu tố đông máu khác, ví dụ, thiếu hụt di truyền FVII. FVII cũng được khuyến nghị trong điều trị đột quy.

Một số bệnh nhân có bệnh ưa chảy máu phát triển các kháng thể mà ức chế yếu tố VIII được dùng, thường ở dạng đậm đặc, dưới dạng điều trị bệnh ưa chảy máu. Đây đồng thời là biến chứng phổ biến nhất khi điều trị bệnh ưa chảy máu.

Các kháng thể hai đặc hiệu hướng đích FIX hoặc FIXa và FX hoặc FXa, như emicizumab, được sử dụng để điều trị cho các bệnh nhân có bệnh ưa chảy máu A bằng các kháng thể kháng yếu tố VIII. Các kháng thể này thay thế FVIII về mặt chức năng bằng cách thúc đẩy sự hoạt hóa của FX bởi FIXa bằng cách đem hai phân tử này lại với nhau. Các kháng thể này có hiệu quả lâu dài.

Tổ hợp của FVIIa tái tổ hợp từ môi trường nuôi cấy tế bào (như Novoseven®, sản sinh trong tế bào BHK) với emicizumab (như ACE910 hoặc Hemlibra®) đã được thử nghiệm (R. HARTMANN, et al. *OR36 | Synergistic Effects of a Procoagulant Bispecific Antibody and FEIBA or Factor VIIA on Thrombin Generation (Haemophilia (2017), 23 (Suppl. 2), 11-27)*). Tổ hợp này chỉ cho thấy tác dụng cộng hợp đến việc điều trị các rối loạn đông máu.

Do đó, vẫn có nhu cầu về tổ hợp được phẩm cho phép theo dõi tốt hơn cho các bệnh nhân có bệnh ưa chảy máu A, và đặc biệt hơn là các bệnh nhân có kháng yếu tố VIII

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kết hợp yếu tố VII chuyển gen với kháng thể đa đặc hiệu được định hướng kháng lại yếu tố IX và yếu tố X.

Theo sáng chế, tổ hợp theo sáng chế của yếu tố VII thu được nhờ chuyển gen và các kháng thể được định hướng kháng lại yếu tố IX và yếu tố X mang lại tác dụng hiệp đồng trong điều trị các rối loạn đông máu, và đặc biệt là đối với điều trị cho các bệnh nhân có bệnh ưa chảy máu A bằng chất ức chế kháng FVIII và các bệnh nhân thiếu hụt FVII.

Do đó, một khía cạnh của sáng chế là được phẩm bao gồm:

- a. yếu tố VII chuyển gen, và
- b. kháng thể đa đặc hiệu, tốt hơn nếu là hai đặc hiệu, được định hướng kháng lại yếu tố IX và yếu tố X, như, ví dụ emicizumab.

Tốt hơn nếu, yếu tố VII này ở dạng yếu tố VII đã hoạt hóa (FVIIa).

Theo một phương án cụ thể, yếu tố IX này ở dạng yếu tố IX đã hoạt hóa (FIXa) và/hoặc yếu tố X này ở dạng yếu tố X đã hoạt hóa (FXa).

Tốt hơn nếu, yếu tố VII chuyển gen này là yếu tố VII ở người thu được từ quá trình sản xuất các tế bào biểu mô ở tuyến vú của động vật có vú chuyển gen không phải người, ví dụ, quá trình chuyển gen thỏ đối với yếu tố VII ở người.

Sáng chế cũng đề xuất sản phẩm kết hợp bao gồm:

- a. yếu tố VII chuyển gen, và
- b. kháng thể đa đặc hiệu được định hướng kháng lại yếu tố IX và yếu tố X, để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn đông máu, như bệnh ưa chảy máu A, cụ thể hơn là bệnh ưa chảy máu A với chất ức chế yếu tố VIII (FVIII).

Tốt hơn nếu, sản phẩm kết hợp này ở dạng dược phẩm chứa cả yếu tố VII chuyển gen và kháng thể này.

Theo cách khác, yếu tố VII chuyển gen và kháng thể này ở dạng các chế phẩm tách biệt, thích hợp để dùng đồng thời hoặc tách biệt (ví dụ tuần tự) cho bệnh nhân.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất kit bao gồm:

- Vật chứa chứa yếu tố FVII chuyển gen ; và
- Một vật chứa khác chứa kháng thể được định hướng kháng lại yếu tố IX và yếu tố X.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Đánh giá tác dụng tạo đông máu hiệp đồng của tổ hợp Sevenfact™ + Hemlibra® đến mẻ 1 của huyết tương của bệnh ưa chảy máu A sau khi cảm ứng bằng TF/PL. (A) Đánh giá tác dụng tạo đông máu hiệp đồng đến ETP, (B) Đánh giá tác dụng tạo đông máu hiệp đồng đến đỉnh tạo thrombin, (C) Đánh giá tác dụng tạo đông máu hiệp đồng đến vận tốc.

Fig.2: Đánh giá tác dụng tạo đông máu hiệp đồng của tổ hợp Sevenfact™ + Hemlibra® đến mẻ 2 của huyết tương của bệnh ưa chảy máu A sau khi cảm ứng bằng TF/PL. (A) Đánh giá tác dụng tạo đông máu hiệp đồng đến ETP, (B) Đánh giá tác dụng tạo đông máu hiệp đồng đến đỉnh tạo thrombin, (C) Đánh giá tác dụng tạo đông máu hiệp đồng đến vận tốc.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa chung

Hiện tượng đông máu gồm một đợt các phản ứng enzym liên quan đến các yếu tố đông máu có mặt ở dạng proenzyme mà, khi có mặt một số đồng yếu tố nhất định, được biến đổi bằng các phân tách phân giải protein thành dạng "được hoạt hóa" của chúng. Dạng được hoạt hóa của từng yếu tố có mặt ở dạng tiền chất bất hoạt được ký hiệu bằng chữ cái a. Vì vậy, FVIIa tạo ra, *in vivo*, từ quá trình phân tách zymogen bởi các proteaza khác nhau (FIXa, FXa, FVIIa) thành hai chuỗi nối bởi cầu disulfua.

Thuật ngữ "sự điều trị" hoặc "điều trị" dùng để chỉ chung cho sự cải thiện, phòng ngừa, hoặc đảo ngược tình trạng bệnh hoặc rối loạn, hoặc ít nhất là triệu chứng, ví dụ, làm chậm sự tiến triển của bệnh hoặc làm ổn định triệu chứng. Việc trì hoãn sự khởi phát của bệnh hoặc rối loạn, hoặc ít nhất là triệu chứng, cũng nằm trong phạm vi của thuật ngữ này.

Thuật ngữ "sự ngăn ngừa" hoặc "ngăn ngừa" dùng để chỉ sự làm giảm nguy cơ phát triển hoặc mắc một bệnh hoặc rối loạn cụ thể.

Trong sáng chế này, "bệnh nhân" hoặc "đối tượng" có nghĩa là động vật có vú bất kỳ, và đặc biệt hơn là người, nam hoặc nữ, ở bất kỳ độ tuổi nào, bao gồm cả trẻ em.

Thuật ngữ "được phẩm" dùng để chỉ các chế phẩm cho phép hoạt tính sinh học của các thành phần hoạt tính và không chứa thành phần bổ sung bất kỳ gây độc cho đối tượng sử dụng được phẩm này.

Yếu tố VII chuyển gen

Thuật ngữ "yếu tố VII" hoặc "FVII" bao gồm các polypeptit chứa trình tự 1-406 của yếu tố VII ở người loại đại (như được mô tả trong Patent Mỹ số 4,784,950) hoặc FVII có nguồn gốc từ một loài khác (ví dụ, bò, lợn, chó, chuột). Yếu tố này cũng bao gồm các biến thể alen tự nhiên của yếu tố VII mà có thể tồn tại, ở dạng hoặc mức độ glycosyl hóa bất kỳ hoặc cải biến sau dịch mã khác. Vì vậy, thuật ngữ "yếu tố VII" còn bao gồm các biến thể FVII có hoạt tính sinh học bằng hoặc tốt hơn so với hoạt tính của loại đại, các biến thể này đặc biệt bao gồm các polypeptit khác với FVII loại đại bằng cách cài xen, làm khuyết hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin.

Trừ khi có quy định khác, trong phần mô tả này, thuật ngữ "yếu tố VII" sẽ dùng để chỉ FVII chưa được phân tách (zymogen) hoặc yếu tố VII đã được hoạt hóa (FVIIa)

Do đó, FVIIa gồm có chuỗi nhẹ có 152 axit amin có phân tử lượng bằng khoảng 20 kDa và chuỗi nặng có 254 axit amin có phân tử lượng bằng khoảng 30 kDa được liên kết với nhau bằng một cầu disulfua (Cys135-Cys262).

"Yếu tố VII tái tổ hợp" có nghĩa là yếu tố VII bất kỳ thu được từ quá trình thiết kế di truyền và thu được từ sự biểu hiện của gen tương ứng trong vi sinh vật, thực vật hoặc thực vật chuyển gen bất kỳ. Vi sinh vật có nghĩa là hệ vi khuẩn, nấm, virus hoặc tế bào bất kỳ. Yếu tố VII tái tổ hợp cũng có thể được sản sinh ra từ các tế bào nhân thực trong môi trường nuôi cấy, như tế bào thực vật hoặc tế bào động vật có vú, ví dụ, tế bào động vật hoặc tế bào người.

"Yếu tố VII chuyển gen" có nghĩa là yếu tố VII tái tổ hợp bất kỳ thu được từ quá trình chuyển gen động vật đối với yếu tố VII.

"Động vật chuyển gen" có nghĩa là động vật không phải người bất kỳ có cải biến ở hệ gen của nó được dự định là khiến cho protein đang quan tâm có thể được biểu hiện (ở đây là yếu tố VII). Cải biến hệ gen này có thể là kết quả của việc làm thay đổi, cải biến hoặc cài xen của một gen. Cải biến này có thể là do các tác nhân làm thay đổi hoặc tác nhân gây đột biến thường được sử dụng hoặc thậm chí được thực hiện bằng phương pháp gây đột biến trực tiếp. Cải biến hệ gen này cũng có thể là kết quả của việc cài xen hoặc thay thế một gen hoặc nhiều gen ở dạng loại đại hoặc đột biến của chúng. Động vật chuyển gen có thể được chọn, theo cách không giới hạn, từ thỏ, dê, bò, lạc đà, chuột đuôi cụt (hamster), chuột nhắt, chuột cống, ngựa, lợn nái, lạc đà một bướu, cừu hoặc lạc đà không bướu. Theo một phương án cụ thể, động vật mà không biểu hiện $\alpha 1,3$ -galactosyltransferaza có thể được chọn.

Cụm từ "hoạt tính sinh học của yếu tố VIIa" có nghĩa là khả năng của FVIIa trong việc tạo ra ra thrombin, ví dụ, trên bề mặt của các tiểu cầu được hoạt hóa. Hoạt tính của yếu tố VII có thể được đánh giá theo các cách khác nhau. Hoạt tính sinh học của FVIIa có thể được định lượng, ví dụ, bằng cách xác định khả năng của chế phẩm FVII trong việc thúc đẩy đông cục máu bằng cách sử dụng huyết tương thiếu hụt FVII và thromboplastin, như được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 5,997,864. Trong thử nghiệm này, hoạt tính sinh học được đánh giá so với mẫu đối chứng và được chuyển hóa thành "các đơn vị FVII" bằng cách so sánh với huyết thanh người tiêu chuẩn gom thành khối chứa hoạt tính yếu tố VII với lượng 1 đơn vị/mL. Theo cách khác, hoạt tính sinh học của yếu tố VII có thể được định lượng bằng cách (i) xác định khả năng của yếu tố VIIa trong việc sản sinh ra yếu tố Xa trong hệ chứa yếu tố mô (TF) bao quanh bởi màng lipid và yếu tố X (Persson et al. J. Biol. Chem. 272: 19919-19924,

1997); (ii) xác định sự thủy phân của yếu tố X trong hệ chứa nước; (iii) xác định liên kết vật lý của FVIIa với TF bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (Persson, FEBS letts, 413:359-363, 1997), (iv) xác định sự thủy phân của cơ chất tổng hợp hoặc (v) xác định việc tạo ra thrombin trong hệ *in-vitro* không phụ thuộc vào TF.

Theo một phương án được ưu tiên, FVII mô tả ở đây là polypeptit có trình tự peptit có thể là trình tự peptit của FVII tự nhiên ở người, tức là, trình tự có mặt ở người không có các rối loạn liên quan đến FVII. Kỹ thuật này được mô tả trong tài liệu EP 0 200 421.

Thuận lợi là, trình tự FVII dùng trong sáng chế là SEQ ID NO: 1.

"Tính hiệp đồng" hoặc "tác dụng hiệp đồng" có nghĩa là, tốt hơn là, tác dụng của sự kết hợp hai sản phẩm lớn hơn so với hai lần tổng các tác dụng của từng sản phẩm được dùng tách biệt. Theo sáng chế, tác dụng hiệp đồng đạt được khi sử dụng FVIIa chuyển gen kết hợp với kháng thể đa đặc hiệu được định hướng kháng lại yếu tố IX và yếu tố X cho phép thu được tác dụng lớn hơn so với 2 lần tổng của tác dụng đạt được với một mình FVIIa chuyển gen và tác dụng đạt được với một mình kháng thể đa đặc hiệu được định hướng kháng lại yếu tố IX và yếu tố X, đến ít nhất một thông số tạo ra thrombin. Thông số tạo ra thrombin này được chọn từ chiều cao đỉnh, vận tốc hoặc điện thế thrombin nội sinh (endogenous thrombin potential-ETP).

Theo một phương án cụ thể, FVIIa được dùng ở nồng độ thấp hơn hoặc bằng 105nM, tốt hơn nếu thấp hơn 100nM.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể đa đặc hiệu được định hướng kháng lại yếu tố IX và yếu tố X được dùng ở nồng độ thấp hơn 600nM, tốt hơn nếu thấp hơn 550nM, tốt hơn nếu thấp hơn 500nM, tốt hơn nếu thấp hơn 450nM, tốt hơn nếu thấp hơn 400nM, tốt hơn nếu thấp hơn 350nM, tốt hơn nếu thấp hơn 325nM.

Theo một phương án cụ thể, thu được yếu tố VII từ sữa của động vật chuyển gen.

Phương pháp sản xuất protein tái tổ hợp trong sữa của động vật chuyển gen có thể bao gồm các bước sau: phân tử ADN tổng hợp chứa gen mã hóa protein đang quan tâm (ví dụ, ở đây là FVII ở người), gen này dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu

của protein tiết ra tự nhiên trong sữa, được kết hợp vào phôi của động vật có vú không phải người. Sau đó phôi này được cấy trong động vật có vú cái cùng loài. Một khi động vật có vú thu được từ phôi này được cho phát triển đủ, thì gây ra sự tiết sữa ở động vật có vú này, và sữa sẽ được thu gom sau đó. Sữa này chứa FVII đang quan tâm được tiết ra bởi động vật chuyển gen.

Một ví dụ về quá trình tạo ra protein trong sữa của động vật có vú cái không phải người được nêu ra trong đơn châu Âu số EP0527063, phương pháp nêu trong tài liệu này có thể được sử dụng lặp lại để sản xuất ra yếu tố VII theo sáng chế.

Việc tiết ra yếu tố VII bởi tuyến vú, cho phép nó được tiết vào sữa của động vật chuyển gen, bao gồm việc kiểm soát sự biểu hiện của yếu tố VII theo cách phụ thuộc vào mô. Các phương pháp kiểm soát như vậy đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Việc biểu hiện được kiểm soát thông qua các trình tự mà cho phép biểu hiện protein đối với một mô cụ thể. Các trình tự này cụ thể là trình tự gen khởi đầu WAP, beta-casein và beta-lactoglobulin và các trình tự peptit tín hiệu; danh sách này không bị giới hạn.

Theo một phương án được ưu tiên, yếu tố VII theo sáng chế được sản sinh ra trong sữa của thỏ chuyển gen.

Theo cách đặc biệt thuận lợi, việc biểu hiện ở tuyến vú của thỏ được thực hiện dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu beta casein đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Cụ thể, plasmit chứa gen khởi đầu beta casein được tạo ra bằng cách đưa trình tự chứa gen khởi đầu beta casein vào, plasmit này được tạo ra để có thể nhận gen lạ nằm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu này. Gen mã hóa FVII ở người được kết hợp và nằm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu beta casein. Plasmit chứa gen khởi đầu này và trình tự mã hóa protein đang quan tâm được phân hủy bởi các enzym giới hạn để giải phóng mảnh ADN chứa gen khởi đầu beta casein và trình tự FVII ở người. Sau khi tinh chế, các mảnh này được đưa bằng cách vi tiêm vào tiền nhân đực của phôi thỏ loại đại. Sau đó các phôi này được nuôi cấy trước khi chuyển vào vòi trứng chuẩn bị bằng hormon của con cái loại đại. Khi các con cái này sinh con, thì đời con là cái được đánh giá bằng PCR để xác định các con chuyển gen. Số lượng bản sao của gen chuyển và tính toàn vẹn của nó được phát hiện ra bởi kỹ thuật

Southern từ ADN chiết từ thỏ chuyển gen nhỏ đã thu được. Nồng độ của FVII người biểu hiện trong sữa của đời con chuyển gen cái được đánh giá thông qua thử nghiệm enzym miễn dịch.

Theo một phương án cụ thể, thu được yếu tố VII hữu ích theo sáng chế bằng phương pháp bao gồm các bước sau:

(a) cài xen trình tự ADN chứa gen mã hóa yếu tố VII vào phôi động vật có vú không phải người, gen này nằm dưới sự kiểm soát phiên mã của gen khởi đầu beta casein,

(b) chuyển các phôi thu được trong bước a) vào vòi trứng của các động vật có vú cái không phải người sao cho nó phát triển thành động vật có vú không phải người trưởng thành.

(c) cảm ứng sự tiết sữa ở động vật có vú không phải người trưởng thành thu được trong bước b) thuộc giống cái hoặc ở đời con là cái của động vật có vú không phải người này trong đó gen này và gen khởi đầu có mặt trong hệ gen của động vật.

(d) thu gom sữa từ động vật có vú không phải người này, và

(e) tinh chế FVII có trong sữa đã được thu gom.

FVII hữu ích ở đây có điểm đẳng điện gần như đồng nhất.

"Điểm đẳng điện" hoặc "pI" có nghĩa là độ pH mà điện tích nguyên tố thực của phân tử yếu tố VII hoặc yếu tố VIIa bằng không, tức là, độ pH mà tại đó phân tử này trung tính về điện (dạng ion lưỡng tính). Điểm đẳng điện của yếu tố VII theo sáng chế có thể được đo bằng cách thực hiện kỹ thuật đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực như tập trung đẳng điện ("isoelectric focusing-IEF"). Kỹ thuật điện di này tách các protein trên cơ sở điểm đẳng điện của chúng. Kỹ thuật này bao gồm bước dịch chuyển, cảm ứng bởi dòng điện đồng đều, các protein ở gradien độ pH cho đến khi chúng đạt độ pH tương đương với điểm đẳng điện riêng của chúng, tại thời điểm đó chúng ngừng dịch chuyển do điện tích thực của chúng bằng không. Gel IEF được sử dụng để xác định điểm đẳng điện của protein đã nêu.

"Gần như đồng nhất" có nghĩa là ít nhất 90%, tốt hơn nếu ít nhất 95% các phân tử yếu tố VII của chế phẩm có điểm đẳng điện có chênh lệch đơn vị pH nhỏ hơn hoặc bằng 1,2. Theo một phương án khác của sáng chế, ít nhất là 50%, tốt hơn nếu ít nhất 55%, tốt hơn nếu là 60% các phân tử yếu tố VII chuyển gen của chế phẩm có điểm đẳng điện có chênh lệch đơn vị pH nhỏ hơn 1, tốt hơn nếu nhỏ hơn 0,5. Theo một phương án khác của sáng chế, ít nhất là 50%, tốt hơn nếu ít nhất là 55%, tốt hơn nếu là 60% các phân tử yếu tố VII của chế phẩm có điểm đẳng điện có chênh lệch đơn vị pH bằng 0,4.

"Dạng N-glycan" có nghĩa là tất cả các dạng N-glycan có ở hai vị trí N-glycosyl hóa của yếu tố VII theo sáng chế. Các dạng N-glycan này được gọi là điện tích một nếu tổng điện tích của chúng bằng 1. Theo sáng chế, "điện tích" có nghĩa là nhóm phosphat, nhóm sulfat, hoặc phân tử axit sialic. Vì vậy, các dạng N-glycan này được gọi là điện tích một nếu chúng chỉ chứa một nhóm phosphat hoặc một nhóm sulfat hoặc một phân tử axit sialic. Trái ngược với thuật ngữ "điện tích một", thuật ngữ "điện tích hai" có nghĩa là tổng điện tích được mang bởi các dạng N-glycan bằng 2, tức là, chúng có điện tích hai được chọn từ nhóm phosphat, nhóm sulfat và/hoặc phân tử axit sialic. Nói cách khác, dạng N-glycan điện tích hai có một phân tử axit sialic và một nhóm phosphat, hoặc một phân tử axit sialic và một nhóm sulfat, hoặc hai phân tử axit sialic, hoặc hai nhóm phosphat, hoặc hai nhóm sulfat, hoặc nhóm phosphat và nhóm sulfat. Thuật ngữ "điện tích ba" có nghĩa là tổng điện tích được mang bởi các dạng N-glycan bằng 3, tức là, chúng có ba điện tích được chọn từ nhóm phosphat, nhóm sulfat và/hoặc phân tử axit sialic. Nói cách khác, dạng N-glycan điện tích ba có một phân tử axit sialic, một nhóm phosphat và một nhóm sulfat, hoặc hai phân tử axit sialic và một nhóm phosphat, hoặc hai phân tử axit sialic và một nhóm sulfat, hoặc một phân tử axit sialic và hai nhóm phosphat, hoặc một nhóm axit sialic và hai nhóm sulfat, hoặc một nhóm phosphat và hai nhóm sulfat, hoặc một nhóm sulfat và hai nhóm phosphat hoặc ba phân tử axit sialic, hoặc ba nhóm phosphat, hoặc ba nhóm sulfat. Thuật ngữ "trung tính" có nghĩa là dạng N-glycan không chứa điện tích bất kỳ.

Điện tích của các dạng N-glycan của yếu tố VII theo sáng chế có thể được đo bằng cách thực hiện phương pháp đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình

trong lĩnh vực, cụ thể là bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao với nhựa trao đổi anion kết hợp với phương pháp dò tìm bằng huỳnh quang (AEX-UPLC/FD). Phương pháp này cho phép tách các dạng N-glycan khác nhau theo điện tích biểu kiến của chúng (xem cụ thể trong tài liệu Hermentin et al, Glycobiology, vol. 6, no. 2, 1996). Trong ngữ cảnh phương pháp sắc ký trao đổi anion, nhựa tích điện dương được sử dụng làm pha tĩnh. Các nhựa tích điện dương này thường tạo thành từ polyme liên kết chéo hoặc gel, mà các nhóm tích điện dương được ghép lên trên đó. Theo một phương án thuận lợi của sáng chế, cột trao đổi anion yếu dạng aminopropyl được sử dụng.

Trong trường hợp chế phẩm yếu tố VII theo sáng chế, có vẻ là trong số tất cả các dạng N-glycan của yếu tố VII của chế phẩm, thì ít nhất 50% các dạng N-glycan, ít nhất 60% các dạng N-glycan, tốt hơn nếu ít nhất 65%, tốt hơn nếu ít nhất 70%, tốt hơn nếu ít nhất 75%, tốt hơn nếu ít nhất 80%, tốt hơn nếu ít nhất 85%, tốt hơn nếu ít nhất 90%, tốt hơn nếu ít nhất 95%, có điện tích một. Theo một phương án được ưu tiên, các phân tử yếu tố VII có các dạng N-glycan điện tích một biểu hiện nằm trong khoảng từ 50% đến 95% phân tử yếu tố VII của chế phẩm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 50% đến 90% phân tử yếu tố VII của chế phẩm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 50% đến 80% phân tử yếu tố VII của chế phẩm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 50% đến 75% phân tử yếu tố VII của chế phẩm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 50% đến 70% phân tử yếu tố VII của chế phẩm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 50 đến 65% phân tử yếu tố VII của chế phẩm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 50% đến 60% phân tử yếu tố VII của chế phẩm.

Điểm đẳng điện gần như đồng nhất của chế phẩm yếu tố VII của tổ hợp theo sáng chế thu được từ sự kết hợp các tính chất glycosyl hóa và γ -carboxyl hóa của các phân tử FVII gồm yếu tố đó.

Yếu tố VII chuyển gen hữu ích ở đây có các đặc tính của cải biến sau dịch mã. Cụ thể, các cải biến này là cải biến glycosyl hóa, như hai vị trí N-glycosyl hóa có lượng Gal α 1,3Gal bằng không hoặc rất thấp trong chế phẩm FVII, hoặc vẫn đủ thấp để không gây miễn dịch. Ngược lại, FVII mô tả ở đây không phải là FVII huyết tương, tức là, nó không phải là sản phẩm tinh chế từ huyết tương người hoặc động vật. Cụ thể hơn, FVII chuyển gen hữu ích ở đây có các cải biến sau dịch mã, cũng như hai O-

glycosyl hóa với các đơn vị glycan xác định được, γ -carboxyl hóa, và các cầu disulfua đặc hiệu.

FVIIa hữu ích ở đây có thể bao gồm một vài cải biến sau dịch mã: chín hoặc mười axit glutamic đầu tận cùng N đầu tiên được γ -carboxyl hóa, Asp₆₃ được hydroxyl hóa một phần, Ser₅₂ và Ser₆₀ được O-glycosyl hóa và lần lượt mang đơn vị glucoza (xyloza)₀₋₂ và fucoza, Asn₁₄₅ và Asn₃₂₂ được N-glycosyl hóa chủ yếu bởi các cấu trúc phức hai nhánh được monosialyl hóa.

Thuận lợi là, ít nhất 80% các phân tử yếu tố VII chuyển gen hữu ích ở đây có sự γ -carboxyl hóa trên chín gốc axit glutamic. Theo một phương án khác, ít nhất 85% các phân tử này có sự γ -carboxyl hóa trên chín gốc axit glutamic. Theo một phương án khác, khoảng từ 85% đến 100%, tốt hơn nếu là từ 90% đến 100%, tốt hơn nếu là từ 95% đến 100% các phân tử này có sự γ -carboxyl hóa trên chín gốc axit glutamic. Thuận lợi là, mức độ γ -carboxyl hóa trên gốc axit glutamic 35 (Glu 35) của phân tử yếu tố VII của chế phẩm này thấp hơn 20%. Theo một phương án khác, mức độ γ -carboxyl hóa của gốc Glu35 là thấp hơn 15%, tốt hơn nếu thấp hơn 10%, tốt hơn nếu thấp hơn 5%.

Đơn vị Gal α 1,3Gal là cấu trúc gồm hai galactoza được liên kết ở α 1,3. Đơn vị này nằm ở cuối của nhánh oligosacarit của cấu trúc liên kết với N. Đơn vị này được biết đến vì tính tạo miễn dịch của nó. Do đó, tốt hơn là sản xuất ra FVII hoặc FVIIa có số lượng cấu trúc Gal α 1,3Gal bằng không hoặc thấp đến nỗi không thể phân biệt được với độ nhiễu cơ sở thu được từ các phép đo được thực hiện bằng các thiết bị phân tích hiện có sẵn. Sự biểu hiện này chỉ ra tất cả các FVII chuyển gen có lượng Gal α 1,3Gal gần với lượng Gal α 1,3Gal của FVII huyết tương một cách tương đương nhau. Thuận lợi là, lượng Gal α 1,3Gal của chế phẩm FVII mô tả ở đây không gây miễn dịch cho người. Ngoài ra, FVII hữu ích ở đây tốt hơn nếu chứa hai vị trí N-glycosyl hóa, ở vị trí 145 và 322, và hai vị trí O-glycosyl hóa, ở vị trí 52 và 60, giống như FVII ở người. Ở vị trí N-glycosyl hóa, các chuỗi oligosacarit được liên kết với asparagin (được liên kết với N). Ở vị trí O-glycosyl hóa, các chuỗi oligosacarit được liên kết với serin. Các đơn vị được liên kết với các axit amin này sẽ khác về từng protein của chế phẩm. Tuy nhiên, đối với toàn bộ chế phẩm, lượng mỗi đơn vị glycan hoặc thậm chí là mỗi đường có thể được định lượng.

Phần trăm của các glycan khác nhau nêu trong đơn sáng chế này không tính đến O-glycosyl hóa.

Tốt hơn nếu, chế phẩm FVII được đặc trưng ở chỗ, trong số tất cả các đơn vị glycan của FVII của chế phẩm này, ít nhất 40% là dạng glycan hai nhánh được monosialyl hóa. Theo một phương án khác, các dạng hai nhánh được monosialyl hóa này có mặt với lượng ít nhất là 50%. Theo một phương án khác, các dạng hai nhánh được monosialyl hóa này có mặt với lượng ít nhất là 60%, tốt hơn nếu ít nhất là 65%, tốt hơn nếu ít nhất là 70%.

Thuận lợi là, các dạng glycan hai nhánh được monosialyl hóa của FVII chiếm phần lớn. Chế phẩm FVII được đặc trưng ở chỗ ít nhất một số axit sialic của yếu tố VII gồm liên kết α 2-6.

Thuận lợi là, ít nhất 65% các axit sialic của FVII gồm liên kết α 2,6. Rất thuận lợi là, ít nhất 70%, thậm chí là 80% và, đặc biệt là, ít nhất 90% các axit sialic của FVII gồm liên kết α 2,6.

Theo cách đặc biệt được ưu tiên, tất cả các axit sialic đều gồm liên kết α 2,6, tức là, tất cả các axit sialic được liên kết với galactosa bằng liên kết α 2,6. Chế phẩm FVII mô tả ở đây cũng có thể chứa các axit sialic có liên kết α 2-3.

Theo các phương án theo sáng chế, khoảng từ 65% đến 100% các axit sialic của FVII gồm liên kết α 2,6. Tốt hơn nữa nếu, 70% hoặc khoảng từ 80% đến 100% các axit sialic của FVII gồm liên kết α 2,6.

Thuận lợi là, trong số các dạng glycan hai nhánh được monosialyl hóa của FVII, thì các dạng glycan chiếm ưu thế không được fucosyl hóa.

Tốt hơn nếu, các dạng glycan hai nhánh được monosialyl hóa không được fucosyl hóa này có trong FVII của chế phẩm với lượng lớn hơn 20%. Thuận lợi là, lượng này lớn hơn 25%, hoặc lớn hơn 40%. Theo cách đặc biệt thuận lợi, mức độ fucosyl hóa của chế phẩm FVII nằm trong khoảng từ 20% đến 50%. Theo một phương án, mức độ này có thể thấp hơn 20%.

Theo một phương án cụ thể, ít nhất là 10%, tốt hơn nếu ít nhất là 15%, tốt hơn nếu ít nhất là 20%, tốt hơn nếu ít nhất là 25% các dạng N-glycan của yếu tố FVII của chế phẩm là manozơ/lai hóa cao.

Tốt hơn nếu, profin glycosyl hóa mô tả ở đây đem lại hoạt tính sinh học và tính ổn định cải thiện cho FVII. Chế phẩm yếu tố VII có điểm đẳng điện gần như đồng nhất tạo điều kiện cho bước phối trộn ở độ pH tối ưu, tốt hơn nếu ở độ pH tối ưu bằng $6,0 \pm 0,2$, của được phẩm bằng cách ngăn chặn sự kết tủa của FVII. Trên thực tế thì, đã biết rằng ở điểm đẳng điện của phân tử, thì các chế phẩm này sẽ có xu hướng tích tụ và kết tủa. Các phân tử yếu tố VII dùng trong chế phẩm theo sáng chế có điểm đẳng điện nằm trong khoảng từ 6,6 đến 7,0. Điều này đem lại tính ổn định tốt hơn cho chế phẩm yếu tố VII, đặc biệt là khi nó được phối trộn ở độ pH thấp hơn điểm đẳng điện, và đặc biệt là ở độ pH bằng 6,0. Việc cải thiện tính ổn định của chế phẩm yếu tố VII này ngăn chặn các tương tác tĩnh điện chịu trách nhiệm về hiện tượng kết tủa và tích tụ tan được và không tan được, cũng như ngăn chặn sự hao hụt vật liệu thô và từ đó là sự giảm hiệu suất dẫn đến mất số lượng hoạt chất và do đó có thể là mất hoạt tính.

Theo một phương án được ưu tiên, FVII chuyển gen được sản sinh ra từ sữa của thỏ, cho phép thu được chế phẩm trong đó mỗi phân tử yếu tố VII của chế phẩm này có hai vị trí N-glycosyl hóa. Tốt hơn nếu tất cả các phân tử FVII của chế phẩm này có lượng đơn vị Gal α 1,3Gal glycan thấp hơn 4%, hoặc thậm chí bằng không. Vì vậy, thuận lợi là, FVII chuyển gen sản sinh ra từ thỏ không có đơn vị Gal α 1,3Gal.

FVII có thể được tinh chế từ sữa bằng các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ, phương pháp tinh chế protein đang quan tâm từ sữa, như được mô tả trong Patent Mỹ số 6,268,487, có thể bao gồm các bước sau: a) đưa sữa vào lọc tiếp xúc qua màng có đủ độ xốp để tạo ra chất không thấm qua và chất thấm qua, chất thấm qua chứa protein ngoại sinh, b) đưa chất thấm qua vào thiết bị giữ sắc ký để thay thế protein ngoại sinh và thu được dòng thải, c) kết hợp dòng thải này và chất không thấm qua, d) lặp lại các bước từ a) đến c) cho đến khi FVII được tách khỏi lipit và các mixen casein, và FVII được thu hồi.

Thuận lợi là, FVII theo sáng chế này ở dạng được hoạt hóa. Theo một phương án, FVII có thể được hoạt hóa *in vitro* bằng các yếu tố Xa, VIIa, IIa, IXa hoặc XIIa. FVII cũng có thể thường được hoạt hóa trong quy trình tinh chế của nó, cụ thể là bằng cách cấy chuyển qua cột sắc ký tích điện dương.

Kháng thể đa đặc hiệu

"Kháng thể đa đặc hiệu" có nghĩa là kháng thể bất kỳ có ít nhất hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với ít nhất hai kháng nguyên khác nhau, hoặc các epitop khác nhau của cùng một kháng nguyên. Thuật ngữ "đặc hiệu" có nghĩa là kháng thể có khả năng nhận biết và gắn kết kháng nguyên, gần như không có phản ứng chéo với một kháng nguyên khác. Thuận lợi là, kháng thể này có hằng số ái lực K_D đối với mỗi kháng nguyên bằng ít nhất là $10^{-6}M$, tốt hơn nếu ít nhất là $10^{-7}M$, tốt hơn nữa nếu ít nhất là $10^{-8}M$, $10^{-9}M$, hoặc $10^{-10}M$.

Vì vậy, các kháng thể hữu ích theo sáng chế có khả năng gắn kết đặc hiệu với cả yếu tố đông máu IX và yếu tố đông máu X ở dạng được hoạt hóa hoặc dạng không được hoạt hóa.

Kháng thể được sử dụng theo sáng chế, mà có khả năng gắn kết đặc hiệu với cả yếu tố đông máu IX và yếu tố đông máu X tốt hơn là có khả năng hoạt động như phân tử thay thế cho yếu tố VIII (FVIII), mà có nghĩa là kháng thể này thúc đẩy sự hoạt hóa của FX bởi FIXa.

Có thể thu được các kháng thể đa đặc hiệu, tốt hơn nếu là hai đặc hiệu bằng các phương pháp khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, ví dụ, bằng cách liên hợp hóa học, hoặc bằng cách sử dụng phương pháp quadroma, mà là kết quả của quá trình dung hợp giữa hai khối lai sản sinh ra hai kháng thể đơn dòng khác nhau; hoặc thậm chí là bằng cách tái tổ hợp di truyền.

Do đó, các polynucleotit mã hóa các kháng thể này có thể được cài xen vào vector biểu hiện và được biểu hiện trong các tế bào vật chủ hoặc các sinh vật đã được làm cho thích ứng bằng các kỹ thuật đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Các kháng thể hữu ích ở đây có thể có định dạng rất đơn giản, có cấu trúc từ các mảnh Fv chuỗi đơn (scFv), từ hai hoặc nhiều hơn hai kháng thể, kết hợp bởi tác nhân liên kết peptit thích hợp.

"Fv" có nghĩa là mảnh kháng thể nhỏ nhất bảo toàn các tính chất là nhận biết và gắn kết với kháng nguyên. Mảnh "Fv" là dime ($V_H + V_L$ dime) gồm có vùng biến đổi (V_H) mang bởi chuỗi nặng (H) và vùng biến đổi liên kề (V_L) mang bởi chuỗi nhẹ (L).

Theo cách khác, kháng thể đó có thể là kháng thể độ dài đầy đủ, tốt hơn nếu chứa vùng Fc. Có thể có một vài định dạng. Ví dụ, ở định dạng thứ nhất, các mảnh scFv của kháng thể A được dung hợp với các đầu (thường là đầu tận cùng N) của chuỗi nặng của kháng thể B. Kháng thể thu được có một kiểu chuỗi nặng, mà chứa các miền V_H , CH_1 , CH_2 và CH_3 của kháng thể B và các miền V_H và V_L của kháng thể A, và một kiểu chuỗi nhẹ chứa các miền V_L và CL của kháng thể B (Qu et al. Blood, 111, 2211-2219, 2008). Ở định dạng thứ hai, chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể A được kết hợp với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể B. Nếu thích hợp thì, các đột biến, ví dụ "khóa trong ổ" (Ridgway et al, Protein Eng, 9, 617-21, 1996; Patent Mỹ số 7,695,936) có thể được đưa vào để ngăn chặn các cặp ghép không chính xác.

Trừ khi có quy định trái ngược, trong phần mô tả này, thuật ngữ "yếu tố IX" sẽ dùng để chỉ yếu tố IX đã bất hoạt hoặc yếu tố IX đã hoạt hóa (FIXa).

Trừ khi có quy định trái ngược, trong phần mô tả này, thuật ngữ "yếu tố X" sẽ dùng để chỉ yếu tố X đã bất hoạt hoặc yếu tố X đã hoạt hóa (FXa).

Kháng thể nhận biết (i) FIX và/hoặc FIXa, và (ii) FX và/hoặc FXa có thể thu được, cụ thể là, theo các phương pháp được mô tả trong các công bố đơn số WO2005/035756, WO2006/109592 hoặc WO2012/067176.

Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể này là emicizumab. Quy trình sản xuất kháng thể này được mô tả, ví dụ, trong công bố đơn số WO2018047813 hoặc đơn châu Âu số EP1688488.

Dược phẩm và liều lượng

Yếu tố VII và các kháng thể có thể được phối trộn ở dạng các dược phẩm tách biệt, hoặc được kết hợp vào trong cùng một dược phẩm.

Trong trường hợp dùng tách biệt, FVII và các kháng thể có thể được phối trộn theo cách thích hợp để dùng thông qua các đường khác nhau hoặc cùng một đường.

Vì vậy, ví dụ, FVII có thể được dùng trong tĩnh mạch, dưới da hoặc trong cơ.

Kháng thể này cũng có thể được dùng, ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da hoặc trong cơ.

Chế phẩm yếu tố VII có thể là, ví dụ, giống như chế phẩm được mô tả trong công bố đơn số WO2010/149907

Vì vậy, theo một phương án lấy làm ví dụ, chế phẩm này bao gồm:

- yếu tố VII, tốt hơn nếu ở dạng yếu tố VIIa;
- arginin, có thể ở dạng hydroclorua;
- isoleuxin;
- lysin;
- glyxin;
- trinati xitrat hoặc canxi clorua;
- và, nếu thích hợp, polysorbat 80 hoặc polysorbat 20.

Đặc biệt hơn, chế phẩm này có thể bao gồm:

- yếu tố VII, tốt hơn nếu ở dạng yếu tố VIIa;
- arginin với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 40g/L, có thể ở dạng hydroclorua;
- isoleuxin với lượng nằm trong khoảng từ 4,2 đến 6,6 g/L;
- lysin với lượng nằm trong khoảng từ 0,6 đến 1,8 g/L;
- glyxin với lượng nằm trong khoảng từ 0,6 đến 1,8 g/L;

- trinati xitrat với lượng nằm trong khoảng từ 0 đến 0,2 g/L hoặc canxi clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 2 g/L;
- và, nếu thích hợp, polysorbat 80 với lượng nằm trong khoảng từ 0 đến 0,5 g/L.

Chế phẩm FVII, tùy ý còn chứa ít nhất một kháng thể đa đặc hiệu như được mô tả ở đây, có thể được bảo quản ở dạng lỏng hoặc dạng rắn, thường thu được bằng cách sấy khô. Chế phẩm bột ở trên được xác định đối với các chế phẩm ở dạng lỏng, trước khi sấy khô, hoặc sau khi hoàn nguyên ở dạng chế phẩm dùng để tiêm.

Sấy khô là phương pháp để loại bỏ nước giai đoạn cao. Đây là bước khử nước nhằm loại bỏ nhiều nước nhất có thể. Hiện tượng này có thể là tự nhiên hoặc ép buộc. Quy trình sấy khô này có thể được thực hiện bằng cách sấy khô đông lạnh, sấy khô phun và sấy khô phun-đông lạnh.

Phương pháp được ưu tiên để thu được dạng rắn của chế phẩm để sử dụng trong lĩnh vực dược lý mô tả ở đây là phương pháp sấy khô đông lạnh.

Các phương pháp sấy khô đông lạnh là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, xem, ví dụ [Wang et al, Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, International Journal of Pharmaceutics, Vol 203, p 1-60, 2000].

Các quy trình thích hợp khác để làm giảm độ ẩm hoặc hàm lượng nước của chế phẩm có thể được dự tính. Tốt hơn nếu, độ ẩm này thấp hơn hoặc bằng 3% khối lượng, tốt hơn nếu thấp hơn hoặc bằng 2,5%, tốt hơn nếu thấp hơn hoặc bằng 2%, tốt hơn nếu thấp hơn hoặc bằng 1,5%.

Chế phẩm rắn, tốt hơn nếu ở dạng được sấy khô đông lạnh, có thể được hòa tan trong nước dùng để tiêm (water for injection-WFI), để thu được dạng phối trộn dùng để điều trị bệnh.

Dạng phối trộn dùng để tiêm có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa (trong tĩnh mạch, dưới da, trong cơ), ở lượng được đánh giá bởi bác sĩ. Việc dùng dạng lỏng (trước khi sấy khô) hoặc dạng rắn, bằng đường bất kỳ và phương tiện thích hợp bất kỳ, không bị loại trừ.

Liều lượng FVII hữu ích theo sáng chế có thể được xác định theo cách thích hợp tùy thuộc vào dạng phối trộn, phương pháp dùng, độ tuổi và cân nặng của bệnh nhân, các triệu chứng của bệnh nhân, độ nghiêm trọng của bệnh, v.v..

Liều FVII để dùng theo sáng chế có thể được chọn nằm trong khoảng từ 270 μ g/kg đến 2,70 μ g/kg. Tốt hơn nếu, liều FVII cần được dùng là thấp hơn 270 μ g/kg thể trọng, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 225 μ g/kg thể trọng, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 180 μ g/kg thể trọng, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 135 μ g/kg thể trọng, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 90 μ g/kg thể trọng, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 45 μ g/kg thể trọng, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 9 μ g/kg, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 5,4 μ g/kg, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 2,7 μ g/kg.

Chế phẩm kháng thể đa đặc hiệu, như kháng thể emicizumab, là, ví dụ, giống như các chế phẩm được mô tả trong các công bố đơn số WO2017/188356 và WO2018/047813.

Vì vậy, theo một phương án lấy làm ví dụ, chế phẩm là chế phẩm lỏng.

Theo một phương án lấy làm ví dụ, chế phẩm này bao gồm:

- các kháng thể hai đặc hiệu đối với yếu tố IX và yếu tố X
- chất hoạt động bề mặt như poloxame 188 hoặc polysorbat 20
- chất đệm histidin-axit aspartic
- arginin

Đặc biệt hơn, chế phẩm này có thể bao gồm:

- các kháng thể hai đặc hiệu đối với yếu tố IX và yếu tố X với lượng nằm trong khoảng từ 20mg/mL đến 180mg/mL,
- poloxame 188 với lượng nằm trong khoảng từ 0,2mg/mL đến 1mg/mL,
- chất đệm histidin-axit aspartic với lượng nằm trong khoảng từ 10mM đến 40mM
- arginin với lượng nằm trong khoảng từ 100mM đến 300mM,

ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5

Liều lượng chế phẩm kháng thể đa đặc hiệu, như kháng thể emicizumab, hữu ích theo sáng chế, có thể được xác định một cách thích hợp tùy thuộc vào dạng phối trộn, phương pháp dùng, độ tuổi và cân nặng của bệnh nhân, các triệu chứng của bệnh nhân, độ nghiêm trọng của bệnh, v.v.. Liều kháng thể này có thể là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,3 đến 5mg/kg, tốt hơn nếu nhiều nhất là 3mg/kg một lần một tuần trong suốt giai đoạn đầu, mà có thể kéo dài 4 tuần, ví dụ, sau đó đến liều duy trì, tốt hơn nếu thấp hơn, ví dụ, 1,5mg/kg một lần một tuần. Tốt hơn nếu, liều kháng thể được dùng thấp hơn 5mg/kg thể trọng, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 3mg/kg thể trọng, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 1,5mg/kg thể trọng, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 1mg/kg thể trọng, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 0,5mg/kg thể trọng, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 0,1mg/kg thể trọng, tốt hơn nếu liều này thấp hơn 0,05mg/kg thể trọng.

Chế phẩm kháng thể hữu ích theo sáng chế có thể được dùng cho bệnh nhân thông qua đường thích hợp bất kỳ, ví dụ trong tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, trong não tủy, áp da, dưới da, trong khớp, dưới lưỡi, trong hoạt dịch, qua đường miệng hoặc bằng cách xông hít. Tốt hơn nếu, đường trong tĩnh mạch hoặc đường dưới da được ưu tiên.

Theo một phương án cụ thể, yếu tố VII và kháng thể được dùng đồng thời cho bệnh nhân.

Theo một phương án cụ thể khác, yếu tố VII và kháng thể được dùng tách biệt cho bệnh nhân, tốt hơn nếu là tuần tự.

Chỉ định trị liệu

Tổ hợp mô tả ở đây ngăn ngừa hoặc điều trị các rối loạn đông máu, đặc biệt là bệnh ưa chảy máu biểu hiện sự thiếu hụt yếu tố VIII (bệnh ưa chảy máu typ A, tốt hơn nếu là bệnh ưa chảy máu typ A mắc phải).

Tốt hơn nếu, bệnh nhân là bệnh nhân có bệnh ưa chảy máu typ A, với kháng yếu tố VIII.

Tổ hợp mô tả ở đây ngăn ngừa hoặc điều trị các rối loạn đông máu, đặc biệt là chứng thiếu hụt yếu tố VII.

Tổ hợp mô tả ở đây kết hợp tác dụng nhanh của FVII hoạt hóa con đường ngoại sinh của đợt đông máu và tác dụng kéo dài của các kháng thể đa đặc hiệu mô tả ở đây mà hoạt hóa con đường nội sinh của đợt đông máu đó. Tổ hợp này có thể đem lại sự theo dõi tốt hơn cho bệnh nhân.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tinh chế và chiết FVII chuyển gen

Phương pháp tinh chế và chiết yếu tố VII được thực hiện trong ví dụ này là phương pháp được mô tả trong đơn châu Âu EP12305882. Các bước của phương pháp này được mô tả dưới đây.

Sữa thỏ chuyển gen thu được từ dòng thỏ chuyển gen. Sữa đông lạnh từ thỏ chuyển gen được rã đông và cô đặc ở dạng khối chứa sữa thỏ chuyển gen.

Sau đó, khối chứa sữa thỏ chuyển gen thu được từ đó được đưa vào bước thanh lọc bằng cách sử dụng bộ lọc sâu có độ xốp bằng $0,2\mu\text{m}$, để loại bỏ lipit và các hợp chất không tan. Sau đó, sữa đã được thanh lọc từ đó được đưa vào bước bất hoạt virus bằng dung môi tẩy rửa, ví dụ, polysorbate 80 hoặc tri-n-butyl phosphat ở nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong ít nhất hai giờ. Quy trình xử lý này làm bất hoạt hiệu quả các virus, và, đặc biệt là, các virus không có vỏ. Sau đó, sữa đã thanh lọc và bất hoạt virus được đưa vào bước sắc ký ái lực bằng cách sử dụng phối tử ái lực đặc hiệu đối với yếu tố VII/yếu tố VIIa. Nước giải hấp chứa yếu tố VII thu được từ bước sắc ký này sau đó được đưa vào bước siêu lọc và phối trộn, từ đó khiến có thể thu được chất trung gian yếu tố VII đậm đặc có độ tinh khiết bằng 95%.

Chất trung gian yếu tố VII đậm đặc sau đó được đưa vào bước lọc bằng cách sử dụng bộ lọc có độ xốp nằm trong khoảng từ $0,1\mu\text{m}$ đến $0,2\mu\text{m}$ sau đó đến bước lọc nano qua các bộ lọc có độ xốp bằng 20nm sau đó là 15nm. Sau đó, sản phẩm thu được từ đó và chứa yếu tố VII được đưa vào sắc ký gel Q Sepharose XL sau đó đến bước sắc ký CHT-I sau đó đến sắc ký Superdex 200 SEC. Sau đó yếu tố VII đậm đặc thu được từ đó được đưa vào bước làm ổn định sau đó đến bước lọc thông qua bộ lọc có độ xốp bằng $0,2\mu\text{m}$.

Phương pháp mô tả từ đó khiến cho có thể đề thu được yếu tố VII đậm đặc có độ tinh khiết bằng khoảng 99,9995%.

Ví dụ 2: So sánh khả năng tạo cục đông máu của Novoseven®, Sevenfact® và Hemlibra®

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định khả năng tạo cục đông máu của Novoseven®, Sevenfact® và Hemlibra® (còn được gọi là emicizumab) bằng cách thực hiện phương pháp sau đây.

Các chất phản ứng:

- bộ định chuẩn thrombin (Stago)
- chất phản ứng PPP 5pM (Stago)
- chất phản ứng PPP LOW (Stago)
- CK-Prest (Stago)
- chất đệm Fluo (Stago)
- cơ chất Fluo (Stago)
- huyết tương thiếu hụt FVIII (Siemens)
- Sevenfact®/yếu tố VII chuyển gen sản sinh ra ở thỏ 1mg/ml (LFB)
- PNP (Cryopep)
- Novoseven® (NovoNordisk)
- Hemlibra®/Emicizumab (Roche/Genentech/Chugai)

Phương pháp:

Thử nghiệm tạo ra thrombin bao gồm bước hoạt hóa sự đông máu *ex vivo* với hỗn hợp của yếu tố mô và các phospholipit (TF/PL), hoặc bằng cách sử dụng xephalin và sau đó bằng cách đo nồng độ của thrombin tạo ra theo thời gian.

- Xác định khả năng tạo cục đông máu của Novoseven® sau khi cảm ứng sự đông máu bằng TF/P:

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện trong 80 μ L khối huyết tương thiếu hụt FVIII mà giả huyết tương của bệnh ưa chảy máu A khi có mặt 20 μ L chất phản ứng PPP (Stago) chứa yếu tố mô (TF) 0,5pM và phospholipit (PL) 4 μ M. Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 20 μ L kit Fluca (cơ chất + CaCl₂) mà là khởi đầu của quy trình xác định mức độ tạo ra thrombin.

Liều trị liệu của FVIIa là 270 μ g/kg, mà tương ứng với 6 μ g/mL FVIIa trong huyết tương, coi mức độ thu hồi là 100%. Sau đó thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện ở liều Novoseven® bằng 0 μ g/mL, 1 μ g/mL, 2 μ g/mL, 3 μ g/mL, 4 μ g/mL, 5 μ g/mL, và 6 μ g/mL, khi có mặt 0,5pM TF/2 μ M PL (chất cảm ứng đông máu).

- Xác định khả năng tạo cục đông máu của Novoseven® sau khi cảm ứng sự đông máu bằng xephalin:

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện trong 80 μ L khối huyết tương thiếu hụt FVIII mà giả huyết tương của bệnh ưa chảy máu A khi có mặt 20 μ L xephalin (CK-Prest được hoàn nguyên bằng 5mL H₂O cất).

Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 20 μ L kit Fluca (cơ chất + CaCl₂) mà là khởi đầu của quy trình xác định mức độ tạo ra thrombin.

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện ở liều Novoseven® bằng 0 μ g/mL, 1 μ g/mL, 2 μ g/mL, 3 μ g/mL, 4 μ g/mL, 5 μ g/mL, và 6 μ g/mL, khi có mặt 20 μ L xephalin (chất cảm ứng đông máu).

- Xác định khả năng tạo cục đông máu của Sevenfact® sau khi cảm ứng sự đông máu bằng TF/PL:

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện trong 80 μ L khối huyết tương thiếu hụt FVIII mà giả huyết tương của bệnh ưa chảy máu A khi có mặt 20 μ L chất phản ứng PPP (Stago) chứa yếu tố mô (TF) 0,5pM và phospholipit (PL) 4 μ M. Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 20 μ L kit Fluca (cơ chất + CaCl₂) mà là khởi đầu của quy trình xác định mức độ tạo ra thrombin.

Thử nghiệm tạo ra thrombin sau đó được thực hiện ở liều Sevenfact® bằng 0 μ g/mL, 1 μ g/mL, 2 μ g/mL, 3 μ g/mL, 4 μ g/mL, 5 μ g/mL, và 6 μ g/mL, khi có mặt 0,5pM TF/2 μ M PL (chất cảm ứng đông máu).

- Xác định khả năng tạo cục đông máu của Sevenfact® sau khi cảm ứng sự đông máu bằng xephalin:

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện trong 80µL khối huyết tương thiếu hụt FVIII mà giả huyết tương của bệnh ưa chảy máu A khi có mặt 20µL xephalin (CK-Prest được hoàn nguyên bằng 5mL H₂O cất).

Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 20µL kit Fluca (cơ chất + CaCl₂) mà là khởi đầu của quy trình xác định mức độ tạo ra thrombin.

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện ở liều Sevenfact® bằng 0µg/mL, 1µg/mL, 2µg/mL, 3µg/mL, 4µg/mL, 5µg/mL, và 6µg/mL, khi có mặt 20µL xephalin.

- Xác định khả năng tạo cục đông máu của Hemlibra® sau khi cảm ứng sự đông máu bằng TF/PL:

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện trong 80µL khối huyết tương thiếu hụt FVIII mà giả huyết tương của bệnh ưa chảy máu A khi có mặt 20µL chất phản ứng PPP (Stago) chứa yếu tố mô (TF) 0,5pM và phospholipit (PL) 4µM.

Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 20µL kit Fluca (cơ chất + CaCl₂) mà là khởi đầu của quy trình xác định mức độ tạo ra thrombin.

Hemlibra® (Roche/Genentech/Chugai, USA), kháng thể hai đặc hiệu bất chức năng của FVIII, được sử dụng ở nồng độ lớn nhất bằng 50µg/mL, mà là nồng độ được phát hiện ở các bệnh nhân đang điều trị (Oldenburg et al. NEJM, 2017). Sau đó thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện ở liều Hemlibra® bằng 0µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 30µg/mL, 40µg/mL và 50µg/mL, khi có mặt 0,5pM TF/4µM PL (chất cảm ứng đông máu).

- Xác định khả năng tạo cục đông máu của Hemlibra® sau khi cảm ứng sự đông máu bằng xephalin:

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện trong 80µL khối huyết tương thiếu hụt FVIII mà giả huyết tương của bệnh ưa chảy máu A khi có mặt 20µL xephalin (CK-Prest được hoàn nguyên bằng 5mL H₂O cất).

Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 20µL kit Fluca (cơ chất + CaCl₂) mà là khởi đầu của quy trình xác định mức độ tạo ra thrombin.

Thử nghiệm tạo ra thrombin sau đó được thực hiện ở liều Helibra® bằng 0µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 30µg/mL, 40µg/mL và 50µg/mL, khi có mặt 20µL xephalin.

Đối với tất cả các thử nghiệm này, sự xuất hiện của huỳnh quang được đo trên huỳnh quang kế Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) ở bước sóng kích thích bằng 390nm và bước sóng phát xạ bằng 460nm. Sau đó, các biểu đồ thrombin (các đường cong thể hiện cường độ huỳnh quang theo thời gian) được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Thrombinoscope™, mà biến đổi giá trị huỳnh quang thành nM của thrombin bằng phép tính tương đối.

Thrombin được tạo ra và các biến số chủ chốt để đánh giá hoạt lực của các sản phẩm thuốc khác nhau được ghi lại và so sánh: điện thế thrombin nội sinh (ETP), chiều cao đỉnh, độ trễ và vận tốc.

Ví dụ 3: Đánh giá khả năng tạo cục đông máu hiệp đồng của Novoseven® và Hemlibra® hoặc SevenFact® và Hemlibra®

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định khả năng tạo cục đông máu của tổ hợp của Novoseven®/Hemlibra® và Sevenfact®/Hemlibra® bằng cách thực hiện phương pháp sau đây.

Các chất phản ứng:

Các chất phản ứng, thiết bị và phương pháp thử nghiệm trong huyết tương thiếu hụt FVIII là giống như các chất phản ứng, thiết bị và phương pháp thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 2.

Phương pháp:

- Xác định khả năng tạo cục đông máu của tổ hợp Novoseven® + Hemlibra® sau khi cảm ứng sự đông máu bằng TF/PL:

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện trong 80 μ L khối huyết tương thiếu hụt FVIII mà giả huyết tương của bệnh ưa chảy máu A khi có mặt 20 μ L chất phản ứng PPP (Stago) chứa yếu tố mô (TF) 0,5pM và phospholipit (PL) 4 μ M.

Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 20 μ L kit Fluca (cơ chất + CaCl₂) mà là khởi đầu của quy trình xác định mức độ tạo ra thrombin.

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện khi có mặt 0,5pM TF/4 μ M PL (chất cảm ứng đông máu) trong một vài tổ hợp Novoseven®/Hemlibra®. Chế phẩm chứa lượng sản phẩm lớn nhất được tạo thành từ 6 μ g/mL Novoseven® và 50 μ g/mL Hemlibra®, ở lượng lớn nhất của chúng.

Khả năng tạo cục đông máu thu được khi có mặt tổ hợp các sản phẩm được so sánh với khả năng của từng sản phẩm đơn lẻ. Để xem xét tác dụng hiệp đồng của tổ hợp sản phẩm, thì các liều thấp hơn được đánh giá để đảm bảo rằng không bão hòa khả năng phát hiện thrombin.

Các chế phẩm thử nghiệm chứa:

Tổ hợp	Hemlibra® (μ g/mL)	NovoSeven® (μ g/mL)
Tổ hợp 1	50	6
Tổ hợp 2	50	5
Tổ hợp 3	40	4
Tổ hợp 4	30	3
Tổ hợp 5	20	2
Tổ hợp 6	10	1

- Xác định khả năng tạo cục đông máu của tổ hợp Novoseven® + Hemlibra® sau khi cảm ứng sự đông máu bằng xephalin:

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện trong 80 μ L khối huyết tương thiếu hụt FVIII mà giả huyết tương của bệnh ưa chảy máu A khi có mặt 20 μ L xephalin (CK-Prest được hoàn nguyên bằng 5mL H₂O cất).

Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 20 μ L kit Fluca (cơ chất + CaCl₂) mà là khởi đầu của quy trình xác định mức độ tạo ra thrombin.

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện khi có mặt 20 μ L xephalin trong một vài tổ hợp Novoseven®/Hemlibra®. Chế phẩm chứa lượng sản phẩm lớn nhất được tạo thành từ 6 μ g/mL Novoseven® và 50 μ g/mL Hemlibra®, ở lượng lớn nhất của chúng.

Khả năng tạo cục đông máu thu được khi có mặt tổ hợp các sản phẩm được so sánh với khả năng của từng sản phẩm đơn lẻ. Để xem xét tác dụng hiệp đồng của tổ hợp sản phẩm, thì các liều thấp hơn được đánh giá để đảm bảo rằng không bão hòa khả năng phát hiện thrombin.

Các chế phẩm thử nghiệm chứa:

Tổ hợp	Hemlibra® (μ g/mL)	NovoSeven® (μ g/mL)
Tổ hợp 1	50	6
Tổ hợp 2	50	5
Tổ hợp 3	40	4
Tổ hợp 4	30	3
Tổ hợp 5	20	2
Tổ hợp 6	10	1

- Xác định khả năng tạo cục đông máu của tổ hợp Sevenfact® + Hemlibra® sau khi cảm ứng sự đông máu bằng TF/PL:

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện trong 80 μ L khối huyết tương thiếu hụt FVIII mà giả huyết tương của bệnh ưa chảy máu A khi có mặt 20 μ L chất phản ứng PPP (Stago) chứa yếu tố mô (TF) 0,5pM và phospholipit (PL) 4 μ M.

Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 20 μ L kit Fluca (cơ chất + CaCl₂) mà là khởi đầu của quy trình xác định mức độ tạo ra thrombin.

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện khi có mặt 0,5pM TF/4 μ M PL (chất cảm ứng đông máu) trong một vài tổ hợp Sevenfact®/Hemlibra®. Chế phẩm chứa lượng sản phẩm lớn nhất được tạo thành từ 6 μ g/mL Sevenfact® và 50 μ g/mL Hemlibra®, ở lượng lớn nhất của chúng.

Khả năng tạo cục đông máu thu được khi có mặt tổ hợp các sản phẩm được so sánh với khả năng của từng sản phẩm đơn lẻ. Để xem xét tác dụng hiệp đồng của tổ hợp sản phẩm, thì các liều thấp hơn được đánh giá để đảm bảo rằng không bão hòa khả năng phát hiện thrombin.

Các chế phẩm thử nghiệm chứa:

Tổ hợp	Hemlibra® (µg/mL)	Sevenfact® (µg/mL)
Tổ hợp 1	50	6
Tổ hợp 2	50	5
Tổ hợp 3	40	4
Tổ hợp 4	30	3
Tổ hợp 4	20	2
Tổ hợp 6	10	1

- Xác định khả năng tạo cục đông máu của tổ hợp Sevenfact® + Hemlibra® sau khi cảm ứng sự đông máu bằng xephalin:

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện trong 80µL khối huyết tương thiếu hụt FVIII mà giả huyết tương của bệnh ưa chảy máu A khi có mặt 20µL xephalin (CK-Prest được hoàn nguyên bằng 5mL H₂O cất).

Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 20µL kit Fluca (cơ chất + CaCl₂) mà là khởi đầu của quy trình xác định mức độ tạo ra thrombin.

Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện khi có mặt 20µL xephalin trong một vài tổ hợp Sevenfact®/Hemlibra®. Chế phẩm chứa lượng sản phẩm lớn nhất được tạo thành từ 6µg/mL Sevenfact® và 50µg/mL Hemlibra®, ở lượng lớn nhất của chúng.

Khả năng tạo cục đông máu thu được khi có mặt tổ hợp các sản phẩm được so sánh với khả năng của từng sản phẩm đơn lẻ. Để xem xét tác dụng hiệp đồng của tổ hợp sản phẩm, thì các liều thấp hơn được đánh giá để đảm bảo rằng không bão hòa khả năng phát hiện thrombin.

Các chế phẩm thử nghiệm chứa:

Tổ hợp	Hemlibra® (µg/mL)	Sevenfact® (µg/mL)
Tổ hợp 1	50	6
Tổ hợp 2	50	5
Tổ hợp 3	40	4
Tổ hợp 4	30	3
Tổ hợp 5	20	2
Tổ hợp 6	10	1

Đối với tất cả các thử nghiệm này, sự xuất hiện của huỳnh quang được đo trên huỳnh quang kế Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) ở bước sóng kích thích bằng 390nm và bước sóng phát xạ bằng 460nm. Sau đó, các biểu đồ thrombin (các đường cong thể hiện cường độ huỳnh quang theo thời gian) được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Thrombinoscope™, mà biến đổi giá trị huỳnh quang thành nM của thrombin bằng phép tính tương đối.

Tác dụng hiệp đồng được xem xét, ví dụ, khi ít nhất một trong các thông số tính được từ thử nghiệm tạo ra thrombin đối với tổ hợp cho trước lớn hơn so với tổng của mỗi trong các thông số này đạt được với một mình các thành phần đó, trừ đi độ nhiễu cơ sở của thử nghiệm

Ví dụ 4: So sánh khả năng của Sevenfact™, Hemlibra® và tổ hợp của hai chất này trong huyết tương của bệnh ưa chảy máu A:

Các chất phản ứng:

- bộ định chuẩn thrombin (Stago)
- chất phản ứng TF PRP 1pM (Stago)
- chất phản ứng PL MP 4µM (Stago)
- chất đệm Fluo (Stago)
- cơ chất Fluo (Stago)
- Sevenfact™: yếu tố VII chuyển gen sản sinh ra ở thỏ 1mg/ml (LFB)
- Hemlibra®: Emicizumab (Roche/Genentech/Chugai)

- Huyết tương của bệnh ưa chảy máu A (Cryoep)
- Owren Koller (Stago)

Phương pháp:

Thử nghiệm tạo ra thrombin bao gồm bước hoạt hóa sự đông máu *ex vivo*, ví dụ với hỗn hợp của yếu tố mô và các phospholipit (TF/PL), sau đó đo nồng độ của thrombin tạo ra theo thời gian. Thử nghiệm tạo ra thrombin được thực hiện với 80μL huyết tương của bệnh ưa chảy máu A (Cryoep), khi có mặt 20μL hỗn hợp của các chất phản ứng PRP và MP (Stago) chứa yếu tố mô 0,5pM và phospholipit 4μM.

Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 20μL kit Fluca (chất Fluo + CaCl₂) mà là khởi đầu của quy trình xác định mức độ tạo ra thrombin (TG).

Huỳnh quang được đo bằng huỳnh quang kế bằng cách sử dụng thiết bị Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) ở bước sóng kích thích bằng 390nm và bước sóng phát xạ bằng 460nm. Các biểu đồ thrombin được phân tích bằng phần mềm Thrombinoscope™ sử dụng phép tính tương đối để biến đổi cường độ huỳnh quang thành nồng độ mol của thrombin (nM).

Để xác định khả năng tạo cục đông máu của hai phân tử này, thì một vài huyết tương của bệnh ưa chảy máu A được nghiên cứu. Liều trị liệu cao nhất của FVIIa là 270μg/kg, tương ứng với 6μg/mL FVIIa (hoặc 120nM) trong huyết tương. Việc sử dụng liều này có thể được coi là khả năng lớn nhất để tạo ra thrombin. Trên cơ sở các nồng độ sản phẩm trong dòng máu thu được ở các bệnh nhân, thì nồng độ Sevenfact™ nằm trong khoảng từ 20 đến 100nM cũng được nghiên cứu. Hemlibra® (Roche/Genentech/Chugai, USA), kháng thể hai đặc hiệu mô phỏng chức năng của FVIII, được sử dụng ở nồng độ lớn nhất bằng 120μg/mL. Trên thực tế, nồng độ được phát hiện ở các bệnh nhân đang điều trị là 50μg/mL (hoặc 300nM) (Oldenburg et al. NEJM, 2017). Vì vậy, Hemlibra® được sử dụng ở đây ở nồng độ khoảng 300nM (50μg/mL). Các biến số được nghiên cứu để xác định khả năng tạo cục đông máu của Hemlibra® và Sevenfact™ là:

- Điện thế thrombin nội sinh (ETP): diện tích dưới đường cong biểu diễn tổng lượng thrombin được tạo ra,

- Chiều cao đỉnh: nồng độ lớn nhất đo được của thrombin, và
- Vận tốc tạo ra thrombin: tốc độ hình thành thrombin.

2 - Các kết quả

2.1 - Tác dụng của Sevenfact™ hoặc Hemlibra® đến huyết tương của bệnh ưa chảy máu A

2.1.1 - Đánh giá mẻ 1 của huyết tương của bệnh ưa chảy máu A

Trong chất nền này, thu được các tín hiệu tạo ra thrombin rất thấp bắt nguồn từ hai hợp chất, bất kể nồng độ được sử dụng. Trên thực tế thì, mức độ tạo ra thrombin quan sát được gần như là bằng không đối với Hemlibra® và Sevenfact™ ở các nồng độ là 20 và 40nM. Với 100nM Sevenfact™, thì quan sát thấy đỉnh tạo thrombin rất thấp (Bảng 1).

	Sevenfact™ 20nM	Sevenfact™ 40nM	Sevenfact™ 100nM	Hemlibra® 300nM
ETP (nM.phút)	125	154,25	128,75	128,25
Đỉnh (nM)	7,105	9,46	16,55	6,41
Vận tốc (nM/phút)	0,59	0,84	1,64	0,42

Bảng 1: Thông số tạo ra thrombin từ mẻ 1 của huyết tương của bệnh ưa chảy máu A được điều trị bằng Sevenfact™ hoặc Hemlibra®

Vì vậy, mỗi phân tử được sử dụng riêng lẻ chỉ tạo ra thrombin rất thấp.

2.1.2 - Đánh giá mẻ 2 của huyết tương của bệnh ưa chảy máu A

Mẻ thứ hai của huyết tương của bệnh ưa chảy máu A được thử nghiệm. Một lần nữa, quan sát thấy sự tạo ra thrombin rất thấp khi sử dụng Hemlibra® và Sevenfact™, với đỉnh tạo thrombin lớn nhất ở nồng độ bằng 100nM của Sevenfact™ (Bảng 2).

	Sevenfact™ 20nM	Sevenfact™ 40nM	Sevenfact™ 100nM	Hemlibra® 300nM
ETP (nM.phút)	221,25	280,75	414,25	196
Đỉnh (nM)	9,93	12,84	21,04	8,895
Vận tốc (nM/phút)	0,7	0,96	1,75	0,51

Bảng 2: Thông số tạo ra thrombin từ mẻ 2 của huyết tương của bệnh ưa chảy máu A được điều trị bằng Sevenfact™ hoặc Hemlibra®

Trong chất nền này, Sevenfact™ và Hemlibra® sử dụng tách biệt có khả năng tạo cục đông máu thấp.

Ví dụ 5: Đánh giá tổ hợp hiệp đồng của Sevenfact™ + Hemlibra®

1 - Phương pháp

Các chất phản ứng, thiết bị và phương pháp thử nghiệm trong huyết tương của bệnh ưa chảy máu A là giống như các chất phản ứng, thiết bị và phương pháp thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 2.

2 - Các kết quả

Như quan sát thấy trong Ví dụ 2, Sevenfact™ và Hemlibra® sử dụng riêng lẻ tạo ra thrombin thấp trong huyết tương của bệnh ưa chảy máu A. Tác dụng hiệp đồng của tổ hợp Sevenfact™ và Hemlibra® được nghiên cứu trong ví dụ này. Ba nồng độ của Sevenfact™ được nghiên cứu (20nM, 40nM và 100nM) khi có mặt Hemlibra® ở nồng độ bằng 300nM. Tác dụng hiệp đồng được xem xét nếu tác dụng của tổ hợp Sevenfact™ + Hemlibra® lớn hơn gấp ít nhất 2 lần so với tổng các tác dụng của Sevenfact và Hemlibra® dùng riêng rẽ về ít nhất một trong các thông số của thử nghiệm tạo ra thrombin (ETP, đỉnh tạo ra thrombin và vận tốc).

2.1 - Tác dụng của Sevenfact™ và Hemlibra® đến huyết tương của bệnh ưa chảy máu A sau khi cảm ứng sự đông máu bằng TF/PL

2.1.1 - Đánh giá mẻ 1 của huyết tương của bệnh ưa chảy máu A

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3 và Fig.1. Ở nồng độ Sevenfact™ rất thấp là 20nM, các tỷ lệ đối với ETP (Fig.1A), đỉnh thrombin (Fig.1B) và vận tốc (Fig.1C) của tổ hợp Sevenfact™ + Hemlibra® lần lượt là 2,14, 2,95 và 4,19. Vì vậy, ngay cả khi ở nồng độ thử nghiệm thấp nhất, thì vẫn quan sát thấy tác dụng tạo cục đông hiệp đồng.

Ở nồng độ 40nM, đối với tất cả các thông số được thử nghiệm, thì tỷ lệ này lớn hơn 2. Tỷ lệ thu được đối với ETP bằng 2,75 (Fig.1A), tỷ lệ thu được đối với đỉnh thrombin là 3,96 (Fig.1B) và tỷ lệ thu được đối với vận tốc đạt giá trị là 6,21 (Fig.1C). Nói cách khác, tốc độ hình thành thrombin cao hơn sáu lần khi Sevenfact™ và Hemlibra® được sử dụng kết hợp

Tác dụng hiệp đồng là lớn nhất ở nồng độ Sevenfact™ bằng 100nM. Ở nồng độ 100nM, thì đối với tất cả các thông số được thử nghiệm, tỷ lệ này lớn hơn 2. Tỷ lệ thu được đối với ETP là 4,00 (Fig.1A) và tỷ lệ đối với đỉnh thrombin là 4,81 (Fig.1B), có nghĩa là nồng độ lớn nhất của thrombin được tạo ra lớn hơn gần năm lần khi Hemlibra® và Sevenfact™ được sử dụng kết hợp. Tỷ lệ vận tốc tương ứng là 9,58 (Fig.1C), có nghĩa là thrombin được tạo ra nhanh hơn gần mười lần khi Sevenfact™ và Hemlibra® được sử dụng kết hợp.

Tổ hợp					Tổ hợp/tổng tỷ lệ			
ETP Sevenfact TM 20nM + ETP Hemlibra [®] 300nM	ETP Sevenfact TM 40nM + ETP Hemlibra [®] 300nM	ETP Sevenfact TM 100nM + ETP Hemlibra [®] 300nM	ETP (Sevenfact TM 20nM + Hemlibra [®] 300nM)	ETP (Sevenfact TM 40nM + Hemlibra [®] 300nM)	ETP (Sevenfact TM 100nM + Hemlibra [®] 300nM)	Sevenfact TM 20nM	Sevenfact TM 40nM	Sevenfact TM 100nM
253,25	282,50	257	543	777,50	1029	2,14	2,75	4,00

Tổ hợp				Tổ hợp/tổng tỷ lệ				
Đỉnh Sevenfact ™ 20nM + đỉnh Hemlibra® 300nM	Đỉnh Sevenfact ™ 40nM + đỉnh Hemlibra® 300nM	Đỉnh Sevenfact ™ 100nM + đỉnh Hemlibra® 300nM	Đỉnh (Sevenfact ™ 20nM + Hemlibra® 300nM)	Đỉnh (Sevenfact ™ 40nM + Hemlibra® 300nM)	Đỉnh (Sevenfact ™ 100nM + Hemlibra® 300nM)	Sevenfact ™ 20nM	Sevenfact ™ 40nM	Sevenfact ™ 100nM
13,515	15,87	22,965	39,915	62,9	110,565	2,95	3,96	4,81

			Tổ hợp			Tổ hợp/tổng tỷ lệ		
Vận tốc Sevenfact™ 20nM + vận tốc Hemlibra® 300nM	Vận tốc Sevenfact™ 40nM + vận tốc Hemlibra® 300nM	Vận tốc Sevenfact™ 100nM + vận tốc Hemlibra® 300nM	Vận tốc (Sevenfact™ 20nM + Hemlibra® 300nM)	Vận tốc (Sevenfact™ 40nM + Hemlibra® 300nM)	Vận tốc (Sevenfact™ 100nM + Hemlibra® 300nM)	Sevenfact™ 20nM	Sevenfact™ 40nM	Sevenfact™ 100nM
1,01	1,42	2,06	4,24	7,86	19,78	4,19	6,21	9,58

Bảng 3: Các thông số tạo ra thrombin từ mẻ 1 của huyết tương của bệnh ưa chảy máu A được điều trị bằng tổ hợp Sevenfact™ + Hemlibra®

Tóm lại, đối với tất cả các nồng độ Sevenfact™ được thử nghiệm, thì Sevenfact™ và Hemlibra® được sử dụng kết hợp có tác dụng hiệp đồng đến sự tạo ra thrombin.

2.1.2 - Đánh giá mẻ 2 của huyết tương của bệnh ưa chảy máu A

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4 và Fig.2. Ở nồng độ Sevenfact™ rất thấp là 20nM, thì thu được tỷ lệ là 2,21 đối với thông số ETP (Fig.2A), thu được tỷ lệ là 2,34 đối với đỉnh thrombin (Fig.2B), và thu được tỷ lệ là 2,9 đối với thông số vận tốc (Fig.2C) của tổ hợp Sevenfact™ + Hemlibra®. Vì vậy, ngay cả ở nồng độ Sevenfact™ thử nghiệm thấp nhất, thì vẫn quan sát thấy tác dụng tạo cục đông hiệp đồng.

Ở nồng độ 40nM, tỷ lệ tương ứng với ETP là 2,29 (Fig.2A), tương ứng với đỉnh thrombin là 2,79 (Fig.2B) và tỷ lệ tương ứng với vận tốc là 3,68 (Fig.2C), có nghĩa là việc sử dụng Sevenfact™ kết hợp với Hemlibra® khiến thrombin có thể được hình thành nhanh hơn khoảng 4 lần.

Tác dụng hiệp đồng là lớn nhất với nồng độ Sevenfact™ bằng 100nM. Ở nồng độ 100nM, thì tỷ lệ tương ứng với đỉnh tạo thrombin là 3,41 (Fig.2B) và tương ứng với vận tốc là 5,63 (Fig.2C), có nghĩa là thrombin được tạo ra nhanh hơn gần 6 lần và nồng độ thrombin đạt được lớn hơn gần bốn lần khi Sevenfact™ được sử dụng kết hợp với Hemlibra®.

Tổ hợp				Tổ hợp/tổng tỷ lệ				
ETP Sevenfact ™ 20nM + ETP Hemlibra® 300nM	ETP Sevenfact ™ 40nM + ETP Hemlibra® 300nM	ETP Sevenfact ™ 100nM + ETP Hemlibra® 300nM	ETP (Sevenfact ™ 20nM + 300nM Hemlibra®)	ETP (Sevenfact ™ 40nM + 300nM Hemlibra®)	ETP (Sevenfact ™ 100nM + Hemlibra® 300nM)	Sevenfact ™ 20nM	Sevenfact ™ 40nM	Sevenfact ™ 100nM
417,25	476,75	610,25	920,75	1091,25	1275,50	2,21	2,29	2,09

Tổ hợp				Tổ hợp/tổng tỷ lệ				
Đỉnh Sevenfact ™ 20nM + đỉnh Hemlibra® 300nM	Đỉnh Sevenfact ™ 40nM + đỉnh Hemlibra® 300nM	Đỉnh Sevenfact ™ 100nM + đỉnh Hemlibra® 300nM	Đỉnh (Sevenfact ™ 20nM + Hemlibra® 300nM)	Đỉnh (Sevenfact ™ 40nM + Hemlibra® 300nM)	Đỉnh (Sevenfact ™ 100nM + Hemlibra® 300nM)	Sevenfact ™ 20nM	Sevenfact ™ 40nM	Sevenfact ™ 100nM
18,825	21,735	29,935	43,96	60,745	101,975	2,34	2,79	3,41

Tổ hợp					Tổ hợp/tổng tỷ lệ			
Vận tốc Sevenfact TM 20nM + vận tốc Hemlibra [®] 300nM	Vận tốc Sevenfact TM 40nM + vận tốc Hemlibra [®] 300nM	Vận tốc Sevenfact TM 100nM + ETP Hemlibra [®] 300nM	Vận tốc (Sevenfact TM 20nM + Hemlibra [®] 300nM)	Vận tốc (Sevenfact TM 40nM + Hemlibra [®] 300nM)	Vận tốc (Sevenfact TM 100nM + Hemlibra [®] 300nM)	Sevenfact TM 20nM	Sevenfact TM 40nM	Sevenfact TM 100nM
1,21	1,48	2,27	3,52	5,44	12,77	2,9	3,68	5,63

Bảng 4: Các thông số tạo ra thrombin từ mê 2 của huyết tương của bệnh ưa chảy máu A được điều trị bằng tổ hợp Sevenfact™ + Hemlibra®

Tóm lại, đối với tất cả các nồng độ của Sevenfact™ được thử nghiệm, thì Sevenfact™ và Hemlibra® được sử dụng kết hợp có tác dụng hiệp đồng đến sự tạo ra thrombin.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa:

- a. yếu tố VII chuyển gen, và
- b. kháng thể đa đặc hiệu được định hướng kháng lại yếu tố IX và yếu tố X.

2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó yếu tố VII chuyển gen này là yếu tố VII ở người thu được từ quá trình sản sinh ra bởi các tế bào biểu mô của tuyến vú của động vật có vú chuyển gen không phải người.

3. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó động vật chuyển gen này là thỏ.

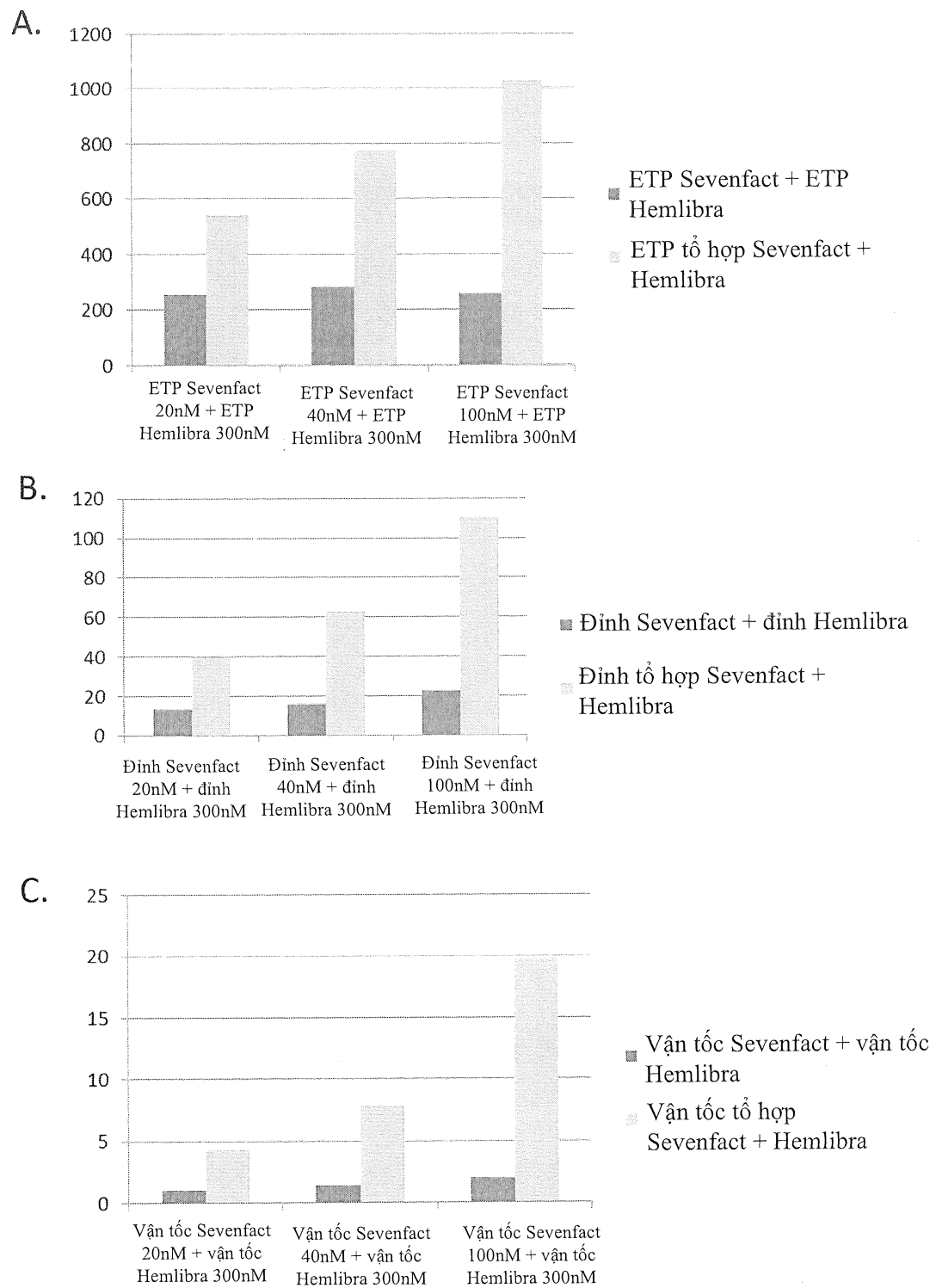
4. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này là emicizumab.

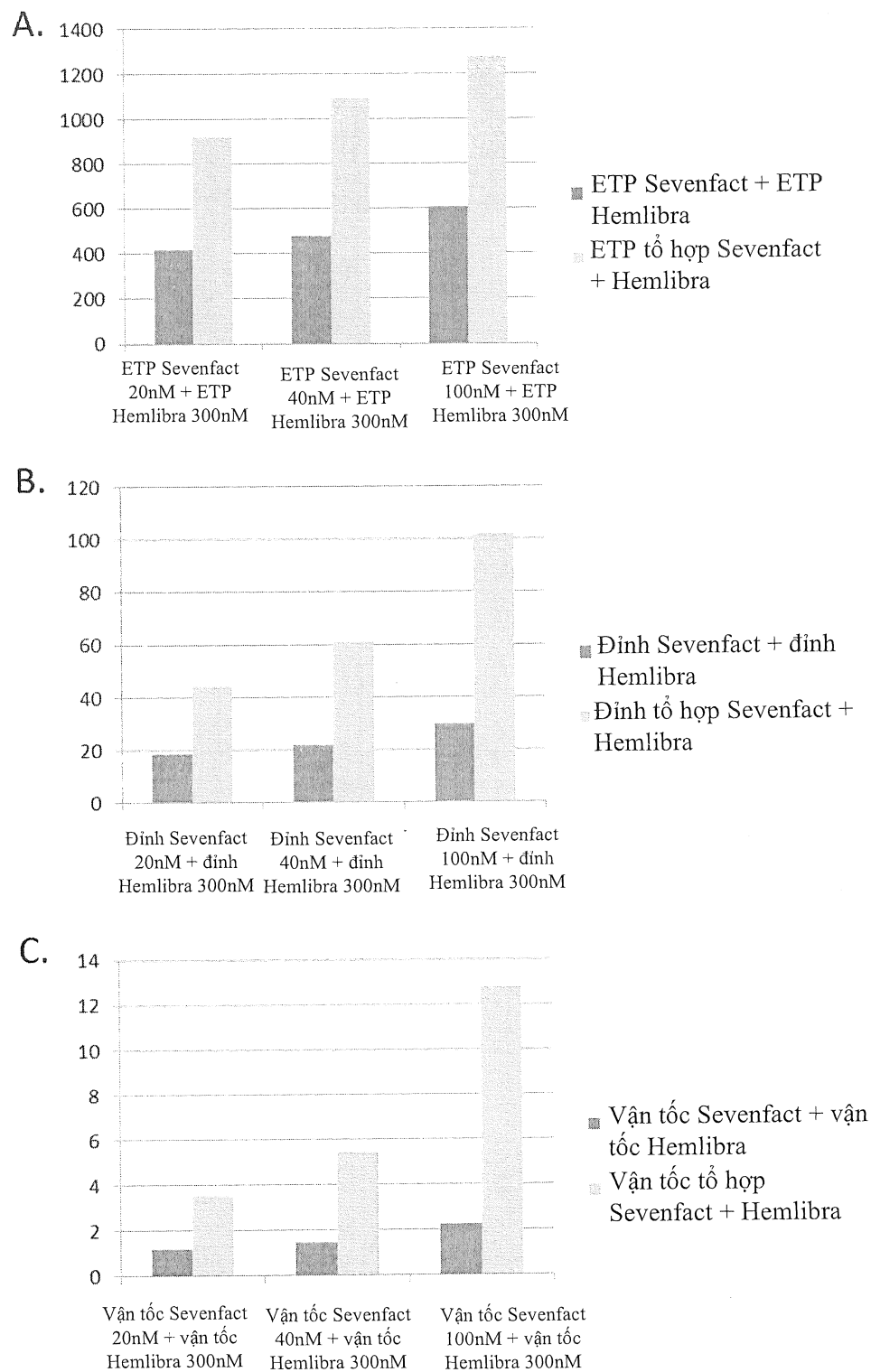
5. Sản phẩm kết hợp chứa:

- a. yếu tố VII chuyển gen, và
- b. kháng thể đa đặc hiệu được định hướng kháng lại yếu tố IX và yếu tố X, để sử dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn đông máu ở bệnh nhân.

6. Kit bao gồm:

- Vật chứa chứa yếu tố FVII chuyển gen; và
- Một vật chứa khác chứa kháng thể được định hướng kháng lại yếu tố IX và yếu tố X.

**Fig.1**

**Fig.2**