



(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) 
1-0020284

(51)⁷ **A61K 39/395, A61P 29/00, 37/06, 35/00,** (13) **B**
43/00

(21)	1-2015-02488	(22)	09.12.2013		
(86)	PCT/US2013/073825	09.12.2013	(87)	WO2014/093203	19.06.2014
(30)	61/737,035	13.12.2012	US		
(45)	25.01.2019	370	(43)	26.10.2015	331
(73)	MERCK SHARP & DOHME CORP. (US) 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907, United States of America				
(72)	KASHI, Ramesh, S. (US), BADKAR, Aniket (IN)				
(74)	Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)				

(54) **CHẾ PHẨM DẠNG DUNG DỊCH CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG INTOLOKIN-23P19 (IL-23P19) Ở NGƯỜI**

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao chứa kháng thể hum13B8-b kháng intolokin-23 p19 (IL-23p19) ở người, và việc sử dụng chúng trong điều trị các rối loạn khác nhau.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao chứa các kháng thể có tác dụng điều trị bệnh, và việc sử dụng chế phẩm này trong điều trị các rối loạn khác nhau.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Intolokine-23 (IL-23) là một cytokine dị dimer cấu thành từ hai cấu trúc dưới phân tử, đó là p19, một cấu trúc đặc trưng cho IL-23, và p40, một cấu trúc tham gia tạo nên intolokine-12 (IL-12). Cấu trúc dưới phân tử p19 có liên quan về mặt cấu trúc với IL-6, một yếu tố kích thích tạo dòng bạch cầu hạt (granulocyte-colony stimulating factor - G-CSF), và cấu trúc dưới phân tử p35 của IL-12. IL-23 làm trung gian cho việc truyền tín hiệu bằng cách liên kết với thụ thể dị dimer được cấu thành từ hai cấu trúc dưới phân tử đó là IL-23R, đặc trưng cho thụ thể IL-23, và IL-12R β 1, một cấu trúc dưới đơn vị tham gia vào việc tạo ra thụ thể IL-12. Nhiều nghiên cứu trước đây đã cho thấy rằng hậu quả của việc thiếu hụt gen p40 (chuột có p40 bị bất hoạt; chuột p40KO) thường có mức độ nghiêm trọng lớn hơn hậu quả quan sát được khi thiếu hụt p35, ví dụ ở chuột p35KO. Việc này cuối cùng đã được giải thích nhờ vào việc phát hiện ra IL-23, và việc nhận thấy rằng p40KO không chỉ ức chế sự biểu hiện của IL-12, mà còn ức chế sự biểu hiện của IL-23. Xem, ví dụ tài liệu: Oppmann *et al.* (2000) *Immunity* 13:715-725; Wiekowski *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:7563-7570; Parham *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:5699-708; Frucht (2002) *Sci STKE* 2002, E1-E3; Elkins *et al.* (2002) *Infection Immunity* 70: 1936-1948).

Các nghiên cứu gần đây, mặc dù sử dụng chuột p40 KO, đã chỉ ra rằng việc phong bế cả IL-23 lẫn IL-12 là một phương pháp điều trị hiệu quả đối với nhiều rối loạn viêm và tự miễn khác nhau. Tuy nhiên, việc phong bế IL-12 thông qua p40 thường tạo ra các tác dụng không mong muốn trên toàn thân, như khả năng dễ mắc các tình trạng nhiễm vi khuẩn cơ hội hoặc tăng nguy cơ xuất hiện u. Bowman *et al.* (2006) *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19:245; Langowski *et al.* (2006) *Nature* 442:461. Do đó, việc phong bế đặc hiệu đối với cấu trúc dưới phân tử p19 của IL-23 được ưu tiên trong điều trị bệnh ở người do nó tác động tới hoạt tính gây viêm bệnh lý của IL-23 mà không tác

động đến các hoạt tính có lợi của IL-12, ví dụ khi điều trị các bệnh lây nhiễm và khi giám sát miễn dịch.

Các kháng thể có tác dụng điều trị bệnh có thể được sử dụng để phong bế hoạt tính của xytokin. Yếu tố làm hạn chế đáng kể việc sử dụng các kháng thể làm chất điều trị bệnh *in vivo* là tính sinh miễn dịch của chúng. Đối với các kháng thể đơn dòng có nguồn gốc từ các loài không phải là người, việc sử dụng nhiều lần cho người sẽ dẫn đến việc tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại kháng thể trị liệu này. Đáp ứng miễn dịch này ít nhất là cũng sẽ làm mất hiệu quả điều trị, và có thể tạo ra đáp ứng phản vệ có hại. Do đó, các kháng thể có tính sinh miễn dịch giảm ở người, như kháng thể được làm giống người hoặc hoàn toàn ở người được ưu tiên dùng để điều trị cho đối tượng là người. Ví dụ về các kháng thể trị liệu kháng IL-23p19 được nêu trong các công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2007/0009526, và trong công bố đơn quốc tế số WO 2007/076524, WO 2007/024846, WO 2007/147019, và WO 2009/043933. Toàn bộ nội dung của các tài liệu nêu trên được kết hợp ở đây bằng cách dẫn chiếu. Các kháng thể kháng IL-23p19 được làm giống người khác được bộc lộ trong các đơn được chuyển nhượng chung được công bố dưới dạng công bố đơn quốc tế số WO 2008/103432 và WO 2008/103473, và trong công bố đơn xin cấp patent Mỹ được chuyển nhượng chung số 2007/0048315, toàn bộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp ở đây bằng cách dẫn chiếu.

Các kháng thể để sử dụng làm thuốc dùng cho người (sau đây gọi là kháng thể trị liệu) có trình tự axit amin của miền cố định, hoặc trình tự khung làm việc trong miền biến đổi chỉ khác nhau đôi chút, tuy nhiên chúng thường khác nhau nhiều nhất ở trình tự CDR. Ngay cả khi các kháng thể này liên kết với cùng một protein, cùng một polypeptit, hoặc thậm chí có thể là cùng một epitop nhưng chúng có thể bao gồm các trình tự CDR khác nhau hoàn toàn. Các kháng thể trị liệu để sử dụng cho người cũng có thể thu được từ trình tự kháng thể dòng mầm ở người hoặc từ trình tự kháng thể dòng mầm không phải ở người (ví dụ, ở loài gặm nhấm), như kháng thể được làm giống người, từ đó tạo ra tính đa dạng hơn nữa cho các trình tự CDR tiềm năng. Sự khác nhau về trình tự này tạo ra độ ổn định khác nhau cho dung dịch và tính đáp ứng khác nhau đối với các thông số của dung dịch. Ngoài ra, các thay đổi nhỏ trong trật tự sắp xếp các axit amin hoặc các thay đổi trong một hoặc một số gốc axit amin có thể

làm cho kháng thể có độ ổn định và khả năng dễ tham gia vào các con đường phân hủy đặc hiệu theo trình tự cũng khác nhau rất nhiều. Kết quả là, hiện nay không thể dự đoán được các điều kiện cần thiết đối với dung dịch để tối ưu hóa độ ổn định cho kháng thể. Mỗi kháng thể cần được nghiên cứu độc lập và chuyên sâu để xác định được công thức tối ưu để tạo ra dung dịch. Bhambhani *et al.* (2012) *J. Pharm. Sci.* 101 : 1120.

Các kháng thể còn là các protein có phân tử lượng tương đối lớn (~150000 Da), ví dụ như khi so sánh với các protein khác dùng để điều trị bệnh như các hormone và cytokin. Kết quả là, để đạt được nồng độ thuốc (tính theo mol) mong muốn, thường cần sử dụng liều chứa một lượng lớn kháng thể trị liệu này. Ngoài ra, thường mong muốn sử dụng kháng thể trị liệu này dưới da, vì điều này cho phép người dùng có thể tự dùng thuốc.

Việc tự dùng thuốc sẽ tiết kiệm được thời gian và chi phí liên quan đến việc thăm khám tại các cơ sở y tế để sử dụng thuốc, ví dụ như dùng trong tĩnh mạch. Việc dùng dưới da được giới hạn ở thể tích dung dịch thực tế có thể phân phối được tại vị trí tiêm trong một lần tiêm duy nhất, thường nằm trong khoảng từ 1 đến 1,5 ml. Việc tự dùng dưới da thường được thực hiện sử dụng ống tiêm nạp sẵn thuốc hoặc dụng cụ tiêm tự động đã nạp đầy dung dịch lỏng chứa thuốc, hơn là sử dụng dạng đông khô, để người bệnh không cần tạo lại hỗn dịch thuốc trước khi tiêm. Để phân phối thuốc ở liều cao hơn, việc giới hạn thể tích nêu trên làm xuất hiện nhu cầu phát triển chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao. Tuy nhiên, khi kháng thể có mặt với nồng độ cao, chúng thường có hiệu ứng kết hợp thành các đại phân tử và làm tăng tương tác protein-protein, dẫn đến dung dịch thu được không ổn định về vật lý như bị đục, tự kết hợp, kết tụ, không gập nếp và bị tách pha. Dung dịch chứa kháng thể nồng độ cao này cũng có thể có độ nhớt cao (ví dụ, >10 centipoise), làm giảm khả năng tiêm đối với ống tiêm nạp sẵn thuốc và dụng cụ tiêm tự động. Kháng thể trị liệu phải ổn định trong khi bảo quản để đảm bảo được hiệu lực đồng thời cũng đảm bảo việc định liều đồng đều, vì thế điều tiên quyết là bất cứ chế phẩm nào được chọn đều phải hỗ trợ cho các đặc tính mong muốn, như có nồng độ cao, độ trong và độ nhớt ở mức chấp nhận được, và chúng cũng phải giữ lại được các đặc tính này đồng thời giữ được hiệu lực của thuốc

trong thời gian sử dụng dài ở mức chấp nhận được trong các điều kiện bảo quản thông thường.

Kết quả là, cần có các chế phẩm chứa kháng thể trị liệu như các kháng thể liên kết với IL-23p19 người ở dạng dung dịch nồng độ cao, ổn định. Chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao này tốt hơn nếu ổn định trong thời gian từ vài tháng đến vài năm trong các điều kiện thường dùng để bảo quản thuốc tự dùng, nghĩa là ở nhiệt độ của tủ lạnh trong các ống tiêm, từ đó kéo dài thời gian sử dụng cho sản phẩm thuốc tương ứng. Chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao, ổn định nêu trên cho phép đóng gói kháng thể trị liệu thành chế phẩm tiêm dưới da nồng độ cao bằng cách tự sử dụng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao chứa kháng thể kháng IL-23p19 được làm giống người 13B8-b ("hum13B8-b"). Kháng thể hum13B8-b bao gồm hai chuỗi nhẹ giống nhau có trình tự SEQ ID NO: 2 và hai chuỗi nặng giống nhau có trình tự SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án, chế phẩm dạng dung dịch này chứa kháng thể kháng IL-23p19 được làm giống người hum13B8-b, dung dịch đệm histidin có độ pH=6,0 ($\pm$ 0,3), sucroza và polysorbat 80. Theo một phương án khác, chế phẩm dạng dung dịch này chứa kháng thể kháng IL-23p19 được làm giống người 13B8-b, dung dịch đệm histidin nồng độ khoảng 10 mM có độ pH=6,0 ($\pm$ 0,3), sucroza khoảng 7% và polysorbat 80 nồng độ khoảng 0,05%. Theo một phương án khác, chế phẩm dạng dung dịch này chứa kháng thể kháng IL-23p19 được làm giống người 13B8-b, dung dịch đệm histidin nồng độ 10 mM có độ pH=6,0 ($\pm$ 0,3), sucroza 7% và polysorbat 80 nồng độ 0,05%.

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm dạng dung dịch theo sáng chế chứa ít nhất 50, 80, 90, 100, 110 hoặc 120 mg/ml kháng thể hum13B8-b. Theo các phương án khác, chế phẩm dạng dung dịch theo sáng chế chứa khoảng từ 80 đến 120 mg/ml kháng thể hum13B8-b, từ 80 đến 120 mg/ml kháng thể hum13B8-b, khoảng 100 mg/ml kháng thể hum13B8-b, và 100 mg/ml kháng thể hum13B8-b.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị sử dụng chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao chứa kháng thể hum13B8-b kháng IL-23p19

theo sáng chế để điều trị các rối loạn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh viêm, bệnh tự miễn, các rối loạn tăng sinh, bệnh ung thư, bệnh lây nhiễm (ví dụ, nhiễm vi khuẩn, nhiễm vi khuẩn hiếu khí gram dương hình que, nhiễm virus hoặc nhiễm nấm, kể cả nhiễm mạn tính), bệnh viêm khớp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh viêm điểm bám gân, bệnh viêm cứng khớp đốt sống, bệnh viêm ruột, kể cả bệnh Crohn và bệnh viêm loét ruột, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm màng mạch nhỏ, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, luput ban đỏ hệ thống và bệnh đái đường. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao chứa kháng thể hum13B8-b kháng IL-23p19 để sử dụng trong điều trị các rối loạn nêu trên. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao chứa kháng thể hum13B8-b kháng IL-23p19 trong sản xuất thuốc để sử dụng trong điều trị các rối loạn nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 thể hiện số liệu được sử dụng để xác định điều kiện đệm và độ pH tối ưu cho các chế phẩm chứa hum13B8-b. FIG.1A thể hiện nhiệt độ không gấp nếp, khi được xác định bằng phép đo nhiệt lượng quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC), và độ tinh khiết (%), khi được xác định bằng RP-HPLC, cho các chế phẩm khác nhau chứa kháng thể nồng độ 1 mg/mL, và FIG.1B thể hiện % monome và % đỉnh rửa giải trễ, khi được xác định bằng HP-SEC, dưới dạng hàm của pH khi sử dụng các dung dịch đệm khác nhau (axetat, xitrat, phosphat và Tris). Phần thảo luận tóm tắt về DSC và HP-SEC được cung cấp trong các ví dụ 2 và 3 tương ứng.

Các hình vẽ từ FIG.1C đến FIG.1E thể hiện các đặc tính khác nhau của chế phẩm chứa xitrat nồng độ 10 mM dưới dạng một hàm của độ pH, bao gồm độ trắng sữa (OD_{350}), sự phân bố theo kích thước thủy động học (nm), khi được xác định bằng phép đo tán xạ ánh sáng động học (dynamic light scattering - DLS), và nhiệt độ nóng chảy, khi được xác định bằng DSC, tương ứng. Phần thảo luận tóm tắt về DLS và DSC lần lượt được cung cấp trong các ví dụ 4 và 2.

Các hình vẽ FIG.1F và FIG.1G lần lượt thể hiện % đỉnh rửa giải trễ, và % đỉnh chính theo thời gian, khi được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao (HP-IEX). Phần thảo luận tóm tắt về HP-IEX được cung cấp trong ví dụ 5.

Các hình vẽ FIG.1H và FIG.1I lần lượt thể hiện độ trắng sữa (OD_{350}) và sự phân bố theo kích thước thủy động học (nm), khi được đo bằng phép đo tán xạ ánh sáng động học (dynamic light scattering - DLS) của chế phẩm chứa kháng thể ở nồng độ thấp (1 mg/ml) trong các dung dịch đệm khác nhau ở các độ pH khác nhau, trong khi FIG.1J thể hiện sự phân bố theo kích thước thủy động học (nm) của các chế phẩm chứa kháng thể đậm đặc hơn (50 và 100 mg/ml), khi được xác định bằng DLS. Phần thảo luận tóm tắt về DLS được cung cấp trong ví dụ 4.

FIG.1K thể hiện % đỉnh rửa giải trễ trong các dung dịch đệm khác nhau ở các độ pH khác nhau theo thời gian, khi được xác định bằng HP-SEC. Phần thảo luận tóm tắt về HP-SEC được cung cấp trong ví dụ 3.

Các hình vẽ FIG.2A và FIG.2B lần lượt thể hiện nhiệt độ không gấp nếp, khi được xác định bằng DSC, và các thay đổi về độ trắng sữa của các chế phẩm bao gồm hum13B8-b chứa các tá dược khác nhau (NaCl 100mM, sucroza 7%, trehaloza 7% và manitol 6%). DS dùng để chỉ dược chất. Phần thảo luận tóm tắt về DSC được cung cấp trong ví dụ 2.

Các hình vẽ FIG.3A và FIG.3B lần lượt thể hiện % kháng thể và % đỉnh rửa giải sớm, khi được xác định bằng HP-SEC và FIG.3C thể hiện độ trắng sữa, trước và sau năm ngày lắc, dưới dạng hàm của sự có mặt hoặc không có mặt của chất hoạt động bề mặt (polysorbat 20 nồng độ 0,05%, polysorbat 80 nồng độ 0,05%, hoặc Pluronic F-68). Giá trị thu được sau 5 ngày lắc của mẫu không có mặt chất hoạt động bề mặt (NS) thực tế lớn hơn 3, và do đó đây là giá trị tốt. Phần thảo luận tóm tắt về HP-SEC được cung cấp trong ví dụ 3.

FIG.4 thể hiện độ ổn định của các chế phẩm kháng thể chứa axetat và histidin, bao gồm dung dịch đệm 10 mM, sucroza 7% và polysorbat 80 nồng độ 0,05%, khi được bảo quản trong các điều kiện khác nhau. Các mẫu được bảo quản là các mẫu thể tích 1,5 ml trong các lọ nhỏ bằng thủy tinh dung tích 2,0 ml. FIG.4A thể hiện độ ổn định của chế phẩm kháng thể nồng độ 50 và 100 mg/ml, như được phản ánh bằng % kháng thể dạng monome được xác định bằng HP-SEC, khi được bảo quản ở nhiệt độ 5°C (độ ẩm tương đối của môi trường) hoặc trong điều kiện RH4 (40°C, độ ẩm tương đối 75%). Phần thảo luận tóm tắt về HP-SEC được cung cấp trong ví dụ 3.

Các hình vẽ từ FIG.4B đến FIG.4D lần lượt là đồ thị điểm thể hiện % monome, dạng HMW và dạng LMW, khi được xác định bằng HP-SEC, trong các điều kiện bảo quản khác nhau. "25H" dùng để chỉ việc bảo quản ở nhiệt độ 25°C, độ ẩm tương đối 60%. Lưu ý rằng tung độ (trục thời gian) của các hình vẽ từ FIG.4B đến FIG.4D không phải là đường thẳng. Phần thảo luận tóm tắt về HP-SEC được cung cấp trong ví dụ 3.

Các hình vẽ FIG.4E và FIG.4F lần lượt là đồ thị điểm thể hiện các kết quả thu được từ thử nghiệm HP-IEX dùng để đánh giá độ ổn định của kháng thể bằng cách xác định % đỉnh chính và các biến thể có tính axit. Phần thảo luận tóm tắt về HP-IEX được cung cấp trong ví dụ 5.

Các hình vẽ từ FIG.4G đến FIG.4I lần lượt là đồ thị điểm thể hiện độ trắng sữa sau khi bảo quản ở nhiệt độ 5°C, 25°C (25H) và 40°C (RH4). Các hình vẽ FIG.4J và FIG.4K lần lượt thể hiện mức độ oxy hóa, khi được xác định bằng phương pháp lập bản đồ peptit, sau khi bảo quản ở nhiệt độ RH4 (40°C, độ ẩm tương đối 75%) và 5°C, và ở nhiệt độ 40°C và 5°C. Phần thảo luận tóm tắt về phương pháp lập bản đồ peptit được cung cấp trong ví dụ 6.

Các hình vẽ FIG.4L và FIG.4M lần lượt là đồ thị điểm kết quả không gấp nếp của các chế phẩm chứa axetat và histidin thu được các phép đo DSC đối với các mẫu ban đầu và các mẫu được bảo quản trong thời gian 4,5 tháng ở nhiệt độ 5°C hoặc trong điều kiện RH4. Phần thảo luận tóm tắt về DSC được cung cấp trong ví dụ 2.

Độ ổn định của các chế phẩm chứa axetat nồng độ 10 mM và chứa histidin nồng độ 10 mM được xác định dưới dạng % monome và dưới dạng % các hợp chất có trọng lượng phân tử cao, khi được đo bằng HP-SEC. Độ ổn định được xác định cho các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$), 25H (25°C, độ ẩm tương đối 60%), hoặc RH4 (40°C, độ ẩm tương đối 75%). Các kết quả được thể hiện trên các hình vẽ FIG.4A và FIG.4B. Phần thảo luận tóm tắt về HP-SEC được cung cấp trong ví dụ 3.

FIG.5 thể hiện số liệu về độ ổn định của các chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế khi được bảo quản trong dạng dược chất trong túi Celsius® Pak có lớp tiếp xúc lòng etylen-vinyl-axetat (EVA) dung tích 30 mL. Số liệu được thể hiện cho các chế phẩm chứa dung dịch đệm histidin 10 mM (độ pH=6,0), sucroza 7%, polysorbat 80 nồng độ 0,05% và kháng thể hum13B8-b. Các hình vẽ từ FIG.5A đến FIG.5C lần

lượt là đồ thị điểm thể hiện nồng độ protein, hoạt lực sinh học (khi được xác định bằng thử nghiệm chức năng dựa trên tế bào), và hoạt lực sinh học (khi được xác định bằng thử nghiệm ELISA) cho ba chế phẩm khác nhau chứa hum13B8-b (loạt mẫu A, B và C). Phần thảo luận tóm tắt về việc xác định nồng độ protein, thử nghiệm chức năng dựa trên tế bào và thử nghiệm ELISA lần lượt được cung cấp trong các ví dụ 7, 8 và 9.

Các hình vẽ từ FIG.5D đến FIG.5G lần lượt là các đồ thị điểm thể hiện kết quả của thử nghiệm HP-IEX đánh giá độ ổn định của kháng thể bằng cách đo % các biến thể có tính axit, đỉnh chính, các loại đỉnh sau đỉnh chính và các biến thể có tính bazơ. Phần thảo luận tóm tắt về HP-IEX được cung cấp trong ví dụ 5.

FIG.5H thể hiện % monome khi được xác định bằng HP-SEC. Phần thảo luận tóm tắt về HP-SEC được cung cấp trong ví dụ 3.

Các hình vẽ FIG.5I và FIG.5J lần lượt thể hiện độ tinh khiết khi xác định % đỉnh chính bằng CE-SDS không khử, hoặc % chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bằng CE-SDS khử. Phần thảo luận tóm tắt về CE-SDS được cung cấp trong ví dụ 10.

Các hình vẽ FIG.5K và FIG.5L lần lượt thể hiện % các hợp chất HMW và LMW khi được xác định bằng HP-SEC. Phần thảo luận tóm tắt về HP-SEC được cung cấp trong ví dụ 3.

FIG.6 thể hiện số liệu bổ sung về độ ổn định của các chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế (loạt kháng thể A và B) khi được bảo quản trong dạng dược chất trong các túi Celsius® Pak có lớp tiếp xúc lỏng etylen-vinyl-axetat (EVA) dung tích 30 mL. Số liệu được thể hiện cho các chế phẩm chứa đệm histidin nồng độ 10 mM (độ pH=6,0), sucroza 7%, polysorbat 80 nồng độ 0,05% và kháng thể hum13B8-b. Các hình vẽ FIG.6A và FIG.6B lần lượt là đồ thị điểm thể hiện hoạt lực sinh học khi được xác định bằng thử nghiệm ELISA và khi được xác định bằng thử nghiệm chức năng dựa trên tế bào. Phần thảo luận tóm tắt về ELISA và thử nghiệm chức năng dựa trên tế bào lần lượt được cung cấp trong các ví dụ 9 và 8.

Các hình vẽ từ FIG.6C đến FIG.6E lần lượt là các đồ thị điểm thể hiện % monome, các hợp chất HMW và các hợp chất LMW khi được xác định bằng HP-SEC, trong các điều kiện bảo quản khác nhau. Phần thảo luận tóm tắt về HP-SEC được cung cấp trong ví dụ 3.

Các hình vẽ FIG.6F và FIG.6G lần lượt thể hiện độ tinh khiết bằng cách xác định % đỉnh chính bằng CE-SDS không khử, hoặc % chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bằng CE-SDS khử. Phần thảo luận tóm tắt về CE-SDS được cung cấp trong ví dụ 10.

Các hình vẽ từ FIG.6H đến FIG.6K lần lượt là đồ thị điểm thể hiện kết quả của thử nghiệm HP-IEEX đánh giá độ ổn định của kháng thể bằng cách xác định % các biến thể có tính axit, đỉnh chính, các đỉnh sau đỉnh chính và biến thể có tính bazơ. Phần thảo luận tóm tắt về HP-IEEX được cung cấp trong ví dụ 5.

FIG.7 thể hiện số liệu về độ ổn định của các chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế khi được bảo quản ở nhiệt độ 5°C (3°C) dưới dạng dược phẩm ở các liều đơn vị trong các ống tiêm nạp sẵn, ở nồng độ kháng thể là 100 mg/ml và thể tích nạp 1,0 ml. FIG.7A là đồ thị điểm thể hiện nồng độ protein của bốn chế phẩm khác nhau chứa hum13B8-b (loạt chế phẩm D, E, F, G và H) khi được xác định bằng cách đo độ hấp thụ UV. Phần thảo luận tóm tắt về các phương pháp xác định nồng độ protein được cung cấp trong ví dụ 7.

Các hình vẽ FIG.7B và FIG.7C lần lượt là các đồ thị điểm thể hiện hoạt lực sinh học khi được xác định bằng thử nghiệm chức năng dựa trên tế bào, và khi được xác định bằng thử nghiệm ELISA cho bốn chế phẩm khác nhau chứa hum13B8-b (loạt chế phẩm E, F, G và H). Phần thảo luận tóm tắt về thử nghiệm chức năng dựa trên tế bào và thử nghiệm ELISA lần lượt được cung cấp trong các ví dụ 8 và 9.

Các hình vẽ FIG.7D đến FIG.7F lần lượt là đồ thị điểm thể hiện % các hợp chất HMW, monome, và hợp chất LMW khi được xác định bằng HP-SEC. Phần thảo luận tóm tắt về HP-SEC được cung cấp trong ví dụ 3.

Các hình vẽ từ FIG.7G đến FIG.7J là các đồ thị điểm thể hiện kết quả thu được từ thử nghiệm HP-IEEX đánh giá độ ổn định của kháng thể bằng cách xác định % đỉnh chính, các biến thể có tính axit, các biến thể có tính bazơ, và các đỉnh sau đỉnh chính, tương ứng. Phần thảo luận tóm tắt về HP-IEEX được cung cấp trong ví dụ 5.

Các hình vẽ FIG.7K và FIG.7L lần lượt thể hiện độ tinh khiết được xác định bằng cách tính % đỉnh chính bằng CE-SDS không khử, hoặc % chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bằng CE-SDS khử. Phần thảo luận tóm tắt về CE-SDS được cung cấp trong ví dụ 10.

Mô tả chi tiết sáng chế

Khi được sử dụng ở đây, kể cả trong các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm, dạng số ít được hiểu là bao gồm cả các dạng số nhiều tương ứng của chúng trừ khi nội dung thể hiện rõ nghĩa khác. Bảng 10 dưới đây cung cấp danh mục số nhận biết trình tự được sử dụng trong sáng chế. Trừ khi có quy định khác, các protein và các đối tượng được đề cập đến ở đây là protein ở người và ở đối tượng là người, không phải ở các loài khác. Khi được sử dụng ở đây, "FIG.X" dùng để chỉ chung cho tất cả các hình vẽ đơn lẻ từ FIG.XA đến FIG.XZ.

Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn ở đây được kết hợp vào đây bằng cách dẫn chiếu với cùng mức độ như thể từng ấn phẩm, mục cơ sở số liệu (ví dụ, trình tự trong ngân hàng gen hoặc mục GenID), đơn sáng chế, hoặc bằng sáng chế, được nêu cụ thể và riêng biệt được kết hợp ở đây bằng cách dẫn chiếu. Việc trích dẫn các tài liệu tham khảo ở đây không được dự định là sự thừa nhận rằng tài liệu tham khảo này là tình trạng kỹ thuật thích hợp, hoặc nó cũng không góp phần thừa nhận về mặt nội dung hoặc ngày của các công bố hoặc tài liệu này.

I. Các định nghĩa

"Hoạt tính tăng sinh" bao gồm hoạt tính thúc đẩy, nếu cần đối với, hoặc có liên quan đặc biệt với, ví dụ, quá trình phân chia tế bào bình thường, cũng như ung thư, khối u, loạn sản, biến nạp tế bào, di căn, và sinh mạch.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vùng siêu biến" dùng để chỉ các gốc axit amin của một kháng thể mà chịu trách nhiệm liên kết kháng nguyên. Vùng siêu biến bao gồm các gốc axit amin từ "vùng xác định tính hỗ trợ" hoặc "CDR" (ví dụ, các gốc 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) và 89-97 (CDRL3) trong miền biến đổi chuỗi nhẹ và các gốc 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) và 95-102 (CDRH3) trong miền biến đổi chuỗi nặng (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) và/hoặc các gốc từ "vùng siêu biến" (nghĩa là, các gốc 26-32 (L1), 50-52 (L2) và 91-96 (L3) trong miền biến đổi chuỗi nhẹ và 26-32 (H1), 53-55 (H2) và 96-101 (H3) trong miền biến đổi chuỗi nặng (Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ các gốc "khung làm việc" hoặc "FR" dùng để chỉ các gốc trong

miền biến đổi không phải là các gốc trong vùng siêu biến được định nghĩa ở đây là các gốc CDR. Việc đánh số thứ tự cho các gốc ở trên liên quan đến hệ thống đánh số Kabat và không nhất thiết phải tương ứng một cách chi tiết với việc đánh số trình tự trong danh mục trình tự kèm theo.

"Tình trạng bệnh miễn dịch" hoặc "rối loạn miễn dịch" bao gồm, ví dụ, tình trạng viêm bệnh lý, rối loạn viêm, và rối loạn hoặc bệnh tự miễn. "Tình trạng bệnh miễn dịch" cũng dùng để chỉ tình trạng viêm, viêm dai dẳng, và tình trạng bệnh lý tăng sinh, như bệnh ung thư, có khối u, và tình trạng sinh mạch, bao gồm bệnh viêm nhiễm, có khối u, và bệnh ung thư chống lại sự tiêu diệt của hệ miễn dịch. "Tình trạng bệnh gây ung thư" gồm, ví dụ, bệnh ung thư, tế bào ung thư, có khối u, tình trạng sinh mạch, và các tình trạng bệnh lý tiền ung thư như chứng loạn sản.

"Các rối loạn viêm" dùng để chỉ các rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý trong đó bệnh lý, toàn bộ hoặc một phần, xuất phát từ, ví dụ, sự thay đổi về số lượng, sự thay đổi về tốc độ di trú, hoặc sự thay đổi trong việc hoạt hóa của các tế bào của hệ miễn dịch. Các tế bào của hệ miễn dịch bao gồm, ví dụ, tế bào T, tế bào B, bạch cầu đơn nhân to hoặc đại thực bào, tế bào trình diện kháng nguyên (antigen presenting cell - APC), tế bào đuôi gai, thực bào trung bì, tế bào NK, tế bào NKT, bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa eosin, tế bào mast, hoặc tế bào bất kỳ khác có liên quan đặc biệt về mặt miễn dịch, ví dụ, tế bào nội mô sản xuất xytokin hoặc tế bào biểu mô.

Khi được sử dụng ở đây, nồng độ nên được hiểu có tính xấp xỉ và nằm trong một khoảng mà thường gắn với nồng độ này trong sản xuất dược phẩm. Cụ thể, nồng độ không cần phải chính xác, mà nó có thể khác với các nồng độ đã nêu trong dung sai thường được cho phép đối với các loại thuốc được sản xuất trong điều kiện GMP. Tương tự, giá trị pH cũng có tính xấp xỉ trong dung sai thường được cho phép đối với các loại thuốc được sản xuất trong điều kiện GMP và được bảo quản trong điều kiện bảo quản thông thường. Ví dụ, chế phẩm chứa histidin theo sáng chế được đề cập là có độ pH=6,0 nhưng dung sai thường là độ pH=6,0 ($\pm 0,3$). Trừ khi có quy định khác, nồng độ % là nồng độ tính theo khối lượng/khối lượng.

II. Chế phẩm chứa kháng thể dạng dung dịch nồng độ cao

Kháng thể đơn dòng điển hình dùng để điều trị bệnh được cấu thành từ bốn polypeptit: hai chuỗi nhẹ (ví dụ, có chiều dài 214 axit amin) và hai chuỗi nặng (ví dụ, có chiều dài 446 axit amin). Tiếp theo, mỗi chuỗi được cấu thành từ miền biến đổi và miền cố định. Miền biến đổi đối với kháng thể kháng IL-23p19 là hum13B8-b lần lượt có 108 và 116 axit amin trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và số gốc axit amin trong các miền cố định là 106 và 330. Tính đặc hiệu của kháng thể đối với đích của nó phần lớn được xác định bằng các trình tự nằm trong vùng được gọi là vùng "siêu biến," hoặc vùng "xác định tính hỗ trợ" (CDR), ba trong số chúng được tìm thấy trong các miền biến đổi của mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các CDR có thể có chiều dài rất khác nhau giữa các kháng thể khác nhau, nhưng trong hum13B8-b, các CDR này bao gồm 44 axit amin trên chuỗi nặng và 27 axit amin trên chuỗi nhẹ. Các gốc CDR có rất khác nhau giữa các kháng thể khác nhau, và có thể có nguồn gốc từ các trình tự dòng mầm ở người (trong trường hợp các kháng thể hoàn toàn ở người), hoặc từ trình tự dòng mầm không phải người (ví dụ, loài gặm nhấm). Các vùng khung làm việc giữa các kháng thể khác nhau cũng có thể khác nhau rất nhiều. Các vùng cố định sẽ thay đổi, phụ thuộc vào việc kháng thể đã chọn có chuỗi nhẹ lamda (λ) hoặc kapa (κ) hay không, và phụ thuộc vào lớp (hoặc isotyp) của kháng thể (IgA, IgD, IgE, IgG, hoặc IgM) và phân lớp (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Tổng thể là một phân tử kháng thể có phân tử lượng khoảng 150000 Da, bao gồm khoảng 650 axit amin, trong đó 224 axit amin nằm trong các miền biến đổi, và 71 axit amin trong vùng "siêu biến", với các miền cố định thay đổi theo lớp, phân lớp, và các miền cố định của chuỗi nhẹ.

Kháng thể theo sáng chế (kháng thể kháng IL-23p19 là mAb hum13B8-b) cũng khác với nhiều kháng thể trị bệnh được phát triển gần đây ở chỗ kháng thể này được làm giống người, khác với kháng thể hoàn toàn ở người. Kết quả là, các trình tự CDR thu được từ các trình tự dòng mầm không phải ở người (trong trường hợp này là chuột), mà không phải từ các trình tự dòng mầm ở người. Các trình tự dòng mầm này bao gồm kho trình tự mà từ đó tạo ra các trình tự CDR của kháng thể, ngoài các thay đổi bắt nguồn từ quá trình siêu đột biến soma, và kết quả là CDR thu được từ dòng mầm ở chuột được kỳ vọng là khác hoàn toàn so với các dòng mầm thu được từ dòng mầm ở người. Thực tế thì đây là cơ sở để sử dụng các hệ miễn dịch của các loài khác nhau để làm tăng việc sản xuất kháng thể, do việc sử dụng các loài khác nhau làm tăng

tính đa dạng có thể phát sinh trong các trình tự CDR thu được. Việc sử dụng các trình tự dòng mầm ở người thường được chứng minh là đúng dựa trên cơ sở rằng các trình tự CDR từ các dòng mầm ở người sẽ ít sinh miễn dịch ở người hơn so với các trình tự CDR từ các dòng mầm có nguồn gốc từ các loài khác, điều này phản ánh niềm tin rằng các CDR sẽ khác hoàn toàn, phụ thuộc vào loài cung cấp chúng. Mặc dù việc tăng tính đa dạng của CDR sẽ làm tăng khả năng có thể phát hiện các kháng thể có các đặc tính mong muốn, như ái lực cao, nhưng việc này cũng làm tăng các khó khăn khi phát triển chế phẩm dạng dung dịch ổn định chứa kháng thể tạo thành.

Ngay cả khi các kháng thể liên kết với cùng một kháng nguyên thì trình tự của chúng cũng có thể rất khác nhau, và chúng cũng không nhất thiết phải có liên quan mật thiết hơn về mặt trình tự so với các kháng thể liên kết với các kháng nguyên khác nhau hoàn toàn. Ví dụ, các miền biến đổi của kháng thể theo sáng chế (hum13B8-b) chỉ có độ đồng nhất về mặt trình tự rơi vào khoảng từ 50 đến 60% so với kháng thể đặc hiệu kháng IL-23p19 khác là CNTO 1959 (SEQ ID NO: 1 16 và 106 trong patent Mỹ số 7,993,645). CNTO 1959 là một kháng thể hoàn toàn ở người. Do mức độ tương tự về mặt trình tự thấp, nên các tính chất hóa học của kháng thể, và theo đó là tính dễ phân hủy, không thể dự đoán được là sẽ tương tự nhau mặc dù chúng có chung đích.

Như đã nêu ở trên, các kháng thể là các phức hợp polypeptit lớn, có độ phức tạp cao, dễ bị phân hủy thành nhiều dạng, và không ổn định trong dung dịch. Tính đa dạng của trình tự, và theo đó là tính đa dạng của cấu trúc của các kháng thể sẽ tạo ra nhiều tính chất hóa học khác nhau. Ngoài các khác biệt hiển nhiên về tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên của từng kháng thể, các kháng thể cũng thể hiện mức độ dễ tham gia vào các con đường phân hủy khác nhau, mức độ dễ kết tụ, và kết tủa khác nhau. Các chuỗi bên axit amin cũng khác nhau về sự có mặt hoặc không có mặt các nhóm dễ phản ứng, như các nhóm carboxy- (D,E), amino- (K), amit- (N,Q), hydroxyl- (S,T,Y), sulfhydryl- (C), thioete- (M), cũng như các vị trí có thể tham gia phản ứng hóa học trên các gốc histidin, phenylalanin và prolin. Các chuỗi bên axit amin trực tiếp tham gia vào các tương tác liên kết kháng nguyên hiển nhiên là các đối tượng dễ vô hoạt thông qua việc thay đổi chuỗi bên, nhưng sự phân hủy tại các vị trí khác cũng có thể ảnh hưởng đến các yếu tố này là tính định hướng trong không gian của các CDR (ví dụ, các thay đổi của các gốc trong khung làm việc), chức năng của vùng tác động (ví

dù, các thay đổi trong vùng Fc - xem, ví dụ, tài liệu: Liu et al. (2008) *Biochemistry* 47:5088), hoặc việc tự liên kết/kết tụ.

Các kháng thể tham gia vào rất nhiều quá trình phân hủy bất kỳ có khả năng xảy ra. Việc oxy hóa các gốc methionion trong các kháng thể, cụ thể là trong các CDR, có thể trở thành vấn đề nếu nó phá vỡ liên kết kháng nguyên. Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116: 731; Lam et al. (1997) *J. Pharm. Sci.* 86: 1250. Các con đường làm phân hủy khác có thể xảy ra bao gồm loại nhóm amin của asparagin (Harris et al. (2001) *Chromatogr., B* 752:233; Vlasak et al. (2009) *Anal. Biochem.* 392: 145) oxy hóa tryptophan (Wei et al. (2007) *Anal. Chem.* 79:2797), xysteinylation (Banks et al. (2008) *J. Pharm. Sci.* 97:775), glycation (cộng thêm một phân tử đường) (Brady et al. (2007) *Anal. Chem.* 79:9403), tạo thành pyroglutamat (Yu et al. (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42:455), xáo trộn liên kết disulfua (Liu et al. (2008) *J. Biol. Chem.* 283:29266), và thủy phân (Davagnino et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 185: 177) được thảo luận trong tài liệu Ionescu & Vlasak (2010) *Anal. Chem.* 82:3198. Xem tài liệu Liu et al. (2008) *J. Pharm. Sci.* 97:2426. Một số quá trình phân hủy có thể xảy ra không chỉ phụ thuộc vào sự có mặt của một gốc axit amin cụ thể mà còn phụ thuộc vào trình tự xung quanh. Phản ứng loại nhóm amin và phản ứng tạo ra isoaspartat có thể xảy ra do việc tự sắp xếp lại các liên kết peptit sau gốc N hoặc D (tính từ đầu tận C đến), bên trong phân tử, với trình tự N-G và D-G là các trình tự dễ tham gia các phản ứng này. Reissner & Aswad (2003) *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1281.

Các kháng thể cũng bị phân mảnh khi bảo quản mà không do tác động của enzym mà phụ thuộc vào chính trình tự của chúng. Vlasak & Ionescu (2011) *mAbs* 3:253. Sự có mặt của các chuỗi bên dễ tham gia phản ứng, như D, G, S, T, C hoặc N có thể dẫn đến các phản ứng phân cắt nội phân tử mà phân cắt khung polypeptit. Phản ứng thủy phân đặc trưng cho từng trình tự này thường phụ thuộc rất lớn vào độ pH. *Id.* Các kháng thể cũng có thể bị kết tụ theo cách phụ thuộc vào trình tự của chúng, ví dụ khi CDR bao gồm số lượng lớn các gốc kỵ nước. Perchiacca et al. (2012) *Prot. Eng. Des. Selection* 25:591. Việc kết tụ trở thành vấn đề khó giải quyết đối với các kháng thể cần được phối chế với nồng độ cao khi sử dụng dưới da, và thậm chí trong một số trường hợp, dẫn đến việc làm thay đổi trình tự của kháng thể do việc bổ sung các gốc mang điện tích để làm tăng độ hòa tan. *Id.*

Do phát sinh nhiều vấn đề đa dạng liên quan đến tính ổn định đặc hiệu theo trình tự có thể có gắn với các kháng thể nên cũng có thể tạo ra nhiều chế phẩm kháng thể khác nhau. Rất nhiều biến khác nhau cần phải được tùy chỉnh để tối ưu cho từng kháng thể mới. Các chế phẩm có thể khác nhau, ví dụ, về nồng độ kháng thể, dung dịch đệm, độ pH, sự có mặt hoặc không có mặt của chất hoạt động bề mặt, sự có mặt hoặc không có mặt của chất làm đẳng trương (ion hoặc không ion), có mặt hoặc không có mặt chất tập hợp phân tử. Các kháng thể trị liệu được đưa ra thị trường ở rất nhiều dạng chế phẩm dung dịch khác nhau, trong dung dịch đệm phosphat (ví dụ, adalimumab), dung dịch đệm phosphat/glyxin (ví dụ, basilixumab), dung dịch đệm Tris (ví dụ, ipilimumab), histidin (ví dụ, ustekinumab), natri xitrat (ví dụ, rituximab); và từ độ pH=4,7 (ví dụ, xertolizumab) và độ pH=5,2 (ví dụ, adalimumab) đến độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,4 (ví dụ, xetuximab). Chúng cũng có sẵn ở dạng chế phẩm tùy ý chứa dinatri edetat (ví dụ, alemtuzumab), manitol (ví dụ, ipilimumab), sorbitol (ví dụ, golimumab), sucroza (ví dụ, ustekinumab), natri clorua (ví dụ, rituximab), kali clorua (ví dụ, alemtuzumab), và trehaloza (ví dụ, ranibizumab); tất cả chứa và không chứa polysorbat-80, nằm trong khoảng từ 0,001% (ví dụ, abxixmab) đến 0,1% (ví dụ, adalimumab).

Ví dụ về các chế phẩm chứa kháng thể được nêu trong các patent Mỹ số 7,691,379 (kháng thể kháng IL-9 mAb MEDI-528); 7,592,004 (thụ thể kháng IL-2, daclizumab); 7,705,132 (kháng thể kháng EGFR, panitumumab); và 7,635,473 (kháng thể kháng A β ; bapineuzumab). Các ví dụ khác về chế phẩm chứa kháng thể được nêu trong công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2010/00021461 (kháng thể kháng α 4-integrin, natalizumab); 2009/0181027 (kháng thể kháng IL-12/IL-23, ustekinumab); 2009/0162352 (kháng thể kháng CD20, ritumixmab); 2009/0060906 (kháng thể kháng IL-13); 2008/0286270 (kháng thể kháng RSV, palivizumab); và 2006/0088523 (kháng thể kháng Her2, pertuzumab). Các chế phẩm khác nữa được nêu trong tài liệu: Daugherty & Mersyn (2006) Adv. Drug Deliv. Rev. 58:686; Wang et al. (2007) J. Pharm. Sci. 96: 1; và tài liệu: Lam et al. (1997) J. Pharm. Sci. 86: 1250.

Sự khác nhau về trình tự chính là cơ sở tạo ra tính đặc hiệu của kháng thể, và là yếu tố trung tâm của đáp ứng miễn dịch. Sự khác nhau này dẫn đến sự khác nhau về tính chất hóa học của các kháng thể thu được, mà dẫn tới nhiều con đường phân hủy

có thể xảy ra. Một số lượng khổng lồ các chế phẩm chứa kháng thể được phát triển đến nay đã chứng minh một thực tế rằng từng chế phẩm cần được tối ưu hóa đối với từng kháng thể đặc hiệu để đảm bảo độ ổn định tối ưu. Thực tế, mỗi và mọi kháng thể trị liệu đang bán trên thị trường đều được chấp thuận để sử dụng ở người đến nay đều có một công thức đặc trưng, khác biệt.

III. Hoạt tính sinh học của kháng thể kháng IL-23 được làm giống người

Chế phẩm dạng dung dịch chứa kháng thể mAb hum13B8-b kháng IL-23p19 theo sáng chế có thể được sử dụng trong điều trị các rối loạn, trong đó cơ chế đối kháng có chọn lọc đối với quá trình truyền tín hiệu IL-23 được mong đợi là có lợi. Các bệnh viêm của da, khớp, CNS, cũng như các rối loạn tăng sinh đều tạo ra các đáp ứng miễn dịch tương tự nhau, do đó việc phong bế IL-23 sẽ tạo ra tác dụng ức chế các rối loạn viêm qua trung gian miễn dịch này, mà không cần đến khả năng chiến đấu chống lại các bệnh nhiễm toàn thân này của vật chủ. Việc tạo cơ chế đối kháng với IL-23 sẽ làm giảm tình trạng viêm trong bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp vảy nến, bệnh vảy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, bệnh viêm da cơ địa, và nhiều rối loạn tự miễn và viêm khác nhau. Việc sử dụng các chất ức chế IL-23 cũng sẽ tạo ra tác dụng ức chế các rối loạn tăng sinh, ví dụ, bệnh ung thư và các rối loạn tự miễn, ví dụ, bệnh đa xơ cứng, bệnh đái đường týp I, và SLE. Phần mô tả về vai trò của IL-23 trong các rối loạn khác nhau này có thể được tìm thấy trong các đơn PCT đã công bố sau đây: WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631; và WO 01/18051. Các chất ức chế IL-23 cũng có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị bệnh nhiễm, bao gồm các bệnh nhiễm mạn tính, như nhiễm vi khuẩn, mycobacterium, virus và nấm. Xem patent Mỹ số 8,263,080 và công bố đơn quốc tế số WO 2008/153610.

Chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao theo sáng chế chứa các kháng thể mà giữ lại được hoạt tính sinh học khi được bảo quản trong một khoảng thời gian dài. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "có hoạt tính sinh học" dùng để chỉ kháng thể hoặc đoạn kháng thể có khả năng liên kết với epitop kháng nguyên mong muốn và trực tiếp hoặc gián tiếp tạo ra các tác dụng sinh học. Thông thường, các tác dụng này thường thu được từ việc IL-23 không liên kết được với thụ thể của nó. Khi được sử dụng ở

đây, thuật ngữ "đặc hiệu" dùng để chỉ tính liên kết có chọn lọc của kháng thể với epitop kháng nguyên đích. Các kháng thể có thể được đánh giá về tính đặc hiệu liên kết bằng cách so sánh mức độ liên kết của kháng thể với IL-23 so với mức độ liên kết của nó với kháng nguyên hoặc hỗn hợp kháng nguyên không liên quan trong một bộ điều kiện nhất định. Nếu mức độ liên kết của kháng thể với IL-23 ít nhất là cao hơn 10 lần, và tốt hơn nếu cao hơn 50 lần so với mức độ liên kết của nó với kháng nguyên hoặc hỗn hợp kháng nguyên không liên quan, thì nó được coi là có tính đặc hiệu. Kháng thể mà liên kết với IL-12 sẽ không phải là kháng thể đặc hiệu với IL-23. Kháng thể mà "liên kết đặc hiệu" với IL-23p19 sẽ không liên kết với protein mà không bao gồm các trình tự thu được từ IL-23p19, nghĩa là "tính đặc hiệu" khi được sử dụng ở đây chỉ tính đặc hiệu đối với IL-23p19, và không chứa trình tự bất kỳ khác không thể có mặt trong protein đang đề cập đến. Ví dụ, khi được sử dụng ở đây, kháng thể mà "liên kết đặc hiệu" với IL-23p19 sẽ thường liên kết với FLAG[®]-hIL-23p19, là một protein dung hợp bao gồm IL-23p19 và thẻ peptit FLAG[®], nhưng không liên kết với một mình thẻ peptit FLAG[®] hoặc khi nó được dung hợp với protein khác với IL-23p19.

Các hợp chất liên kết đặc hiệu với IL-23 theo sáng chế có thể ức chế một hoạt tính sinh học bất kỳ trong số các hoạt tính sinh học bao gồm, nhưng không giới hạn ở, quá trình sản xuất IL-1 β và TNF của đại thực bào màng bụng và IL-17 của các tế bào T là T_H17. Xem tài liệu: Langrish et al. (2004) Immunol. Rev. 202:96-105. Các kháng thể kháng IL-23p19 cũng sẽ có thể ức chế sự biểu hiện gen IL-17A, IL-17F, CCL7, CCL17, CCL20, CCL22, CCR1, và GM-CSF. Xem tài liệu: Langrish et al. (2005) J. Exp. Med. 201 :233-240. Các hợp chất liên kết đặc hiệu với IL-23 theo sáng chế cũng sẽ phong bế khả năng của IL-23 để làm tăng khả năng tăng sinh hoặc khả năng sống sót của các tế bào T_H17. Cua and Kastelein (2006) Nat. Immunol. 7:557-559. Hoạt tính ức chế của các kháng thể kháng IL-23p19 đã xử lý kỹ thuật sẽ hữu ích trong điều trị các rối loạn viêm, tự miễn, và tăng sinh. Các ví dụ về các rối loạn này được mô tả trong công bố đơn PCT số WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631; và WO 01/18051.

Chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao theo sáng chế là hữu ích, ví dụ, để bảo quản và phân phối kháng thể hum13B8-b kháng IL-23p19 để sử dụng trong điều trị

hoặc ngăn chặn các rối loạn có liên quan đến hoạt tính tăng cao của IL-23 hoặc IL-23p19, như bệnh do Th17 gây ra, bệnh tự miễn hoặc các rối loạn viêm mạn tính, hoặc bệnh ung thư.

IV. Các chế phẩm dạng dung dịch chứa kháng thể kháng IL-23p 19 được làm giống người 13B8-b

Sáng chế đề xuất chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao chứa kháng thể hum13B8-b kháng IL-23p19, có chứa hai chuỗi nhẹ giống nhau với trình tự có SEQ ID NO: 2 và hai chuỗi nặng giống nhau với trình tự có SEQ ID NO: 1, và được bộc lộ trong patent Mỹ được chuyển nhượng chung, đồng xét nghiệm số 8,293,883, phần bộc lộ của tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo toàn bộ. Trình tự 13B8 chuỗi nhẹ được làm giống người (với vùng cố định kappa) được đề xuất có SEQ ID NO: 2, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các các gốc từ 1 đến 108 của trình tự đó. Trình tự 13B8 chuỗi nặng được làm giống người (có vùng cố định γ 1) được đề xuất tại SEQ ID NO: 1, và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các các gốc 1 đến 116 của trình tự đó.

Trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 1 và 2) được cung cấp không có trình tự tín hiệu. Ví dụ về các trình tự tín hiệu của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ lần lượt được cung cấp ở SEQ ID NO: 12 và 13. Các trình tự tín hiệu này, hoặc các trình tự axit nucleic mã hóa các trình tự tín hiệu, có thể được gắn vào đầu tận N của chuỗi kháng thể tương ứng để tạo ra tiền chất protein để tế bào chủ tiết ra. Các trình tự tín hiệu thay thế cũng có thể được sử dụng, và một số trình tự đó có thể được tìm thấy trong tài liệu: "SPdb: a Signal Peptide Database." Choo et al. (2005) BMC Bioinformatics 6:249.

Tế bào lai biểu hiện kháng thể gốc 13B8 được lưu trữ theo Hiệp ước Budapest dưới dạng bộ sưu tập chủng giống Mỹ (American Type Culture Collection - ATCC, Manassas, Virginia, USA) vào 17 tháng 08, 2006 với số truy cập PTA-7803. Mỗi liên hệ giữa kháng thể gốc 13B8 và hum13B8-b được nêu chi tiết trong patent Mỹ số 8,293,883 được chuyển nhượng chung.

Chế phẩm dạng dung dịch theo sáng chế được phát triển bằng cách sử dụng ít nhất tám lô kháng thể 13B8-b khác nhau thu được từ tế bào buồng trứng chuột đồng

trung quốc (Chinese hamster ovary - CHO) trong môi trường nuôi cấy, ở quy mô 500 - 2000 L.

Rất nhiều điều kiện cho dung dịch ban đầu cũng được đánh giá đối với chế phẩm dạng dung dịch theo sáng chế. Các thử nghiệm được tiến hành với các dung dịch đệm khác nhau, như axetat, xitrat, histidin, TRIS và phosphat, ở các độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,8. Các tá dược, như sucroza, trehaloza, và manitol, đều được thử nghiệm, ở các nồng độ NaCl khác nhau (và, theo đó là ở các nồng độ ion khác nhau) và bao gồm cả chất hoạt động bề mặt polysorbat 80.

Các chế phẩm được sàng lọc dựa trên độ trắng sữa bằng cách xác định O.D. ở 350nm. Độ kết tụ được xác định bằng phương pháp sắc ký loại theo kích thước hiệu năng cao (high-performance size exclusion chromatography - HP-SEC), phép đo tán xạ ánh sáng động học (dynamic light scattering - DLS) và máy siêu ly tâm phân tích (analytical ultracentrifugation - AUC). Độ ổn định hóa sinh được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao (high-performance ion exchange chromatography - HP-IEX), và độ ổn định nhiệt được đo bằng phép đo nhiệt lượng quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC).

Các thử nghiệm tiền bào chế ban đầu ở nồng độ của hum13B8-b là 1 mg/mL cho thấy rằng % độ tinh khiết, như được đo bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (reverse phase high performance liquid chromatography - RP-HPLC), tăng lên khi ở khoảng độ pH=6,0 và sau đó giữ ổn định đến độ pH=8,8. Xem FIG.1A. Tuy nhiên, nhiệt độ không gấp nếp của kháng thể đạt cực đại quanh độ pH=5. Xem FIG.1A. Kết quả so sánh các loại dung dịch đệm giữa axetat, xitrat, phosphat và TRIS cho thấy rằng dung dịch đệm xitrat ở độ pH=5,5 tạo ra % monome cao nhất, và % các đỉnh rửa giải trễ thấp nhất. Xem FIG.1B. Mặc dù độ ổn định sinh hóa và sinh lý ở ngưỡng tối ưu được quan sát thấy trong dung dịch đệm xitrat ở độ pH=5,5 nhưng nồng độ của kháng thể trong dung dịch đệm xitrat >65 mg/mL kháng thể làm tăng đáng kể độ trắng sữa (số liệu không được thể hiện). Dung dịch có màu trắng sữa là hiện tượng không mong muốn do khi đó khả năng tiếp nhận của người bệnh giảm có thể giảm, mà đặc biệt xảy ra đối với thuốc có thể được bào chế để tự sử dụng. Mặc dù độ trắng sữa này có thể khắc phục bằng cách pha loãng và làm giảm độ pH đến 4,8 trong dung dịch

đệm xitrat (FIG.1C), và việc làm giảm độ pH này cũng sẽ làm giảm đường kính thủy động lực học (FIG.1D), việc làm giảm độ pH cũng sẽ làm giảm độ ổn định nhiệt và độ ổn định sinh hóa của dung dịch, như được phản ánh bởi tỷ lệ các dạng có nhiệt độ nóng chảy thấp tăng lên (FIG.1E), theo thời gian sự tích tụ các đỉnh rửa giải trở nên tăng dần, như được xác định bằng HP-SEC (FIG.1F), và làm giảm các đỉnh chính theo thời gian, như được xác định bằng HP-IEX (FIG.1G).

Tiếp theo, histidin được đánh giá dưới dạng một hệ đệm thay thế với nỗ lực làm giảm độ trắng sữa và việc tự kết hợp mà không làm giảm độ ổn định nhiệt và độ ổn định sinh hóa. Các mẫu được điều chế trong axetat 10 mM (độ pH=4,8 và 5,6), xitrat 10 mM (độ pH=4,8, 5,5 và 6,0), và histidin 10 mM (độ pH=5,5 và 6,0). Độ trắng sữa và đường kính thủy động lực học lần lượt được xác định bằng OD₃₅₀ và DLS. Xem FIG.1H và 1I.

Việc thay thế xitrat bằng axetat hoặc histidin sẽ giảm tới mức thấp nhất độ trắng sữa và làm giảm mức độ tự kết hợp mà không làm ảnh hưởng đến độ ổn định sinh hóa. Ở nồng độ kháng thể cao hơn (từ 50 đến 100 mg/mL), axetat (độ pH=5,5) và histidin (độ pH=6,0), các chế phẩm này trong suốt và không quan sát thấy kích cỡ thủy động lực học tăng lên như đã được quan sát đối với xitrat (độ pH=5,5). Xem FIG.1J. Các chế phẩm chứa xitrat và axetat ở độ pH thấp (4,8) cũng có sự tích tụ các đỉnh rửa giải trở nên tăng khi bảo quản trong các điều kiện RH4 (40°C, độ ẩm tương đối 75%), như được xác định bằng phương pháp sắc ký loại theo kích thước (size exclusion chromatography - SEC). Xem FIG.1K.

Các tá dược khác nhau (NaCl 100 mM, sucroza 7%, trehaloza 7% và manitol 6%) cũng được thử nghiệm về ảnh hưởng của chúng đối với nhiệt độ không gấp nếp (FIG.2A) và độ trắng sữa (FIG.2B). Sucroza 7% được bổ sung vào để làm cho chế phẩm này đẳng trương, làm giảm độ trắng sữa, và làm tăng độ ổn định nhiệt (làm tăng T_m). Các chất hoạt động bề mặt polysorbat-20 (PS20), polysorbat-80 (PS80) và PLURONIC® F-68 cũng được thử nghiệm về ảnh hưởng của chúng đối với sự kết tụ (FIG.3A và FIG.3B) và độ trắng sữa (FIG.3C). Polysorbat 80 được bổ sung vào để giảm thiểu sự kết tụ do tác động của khuấy trộn gây ra.

Các kết quả nêu trên đã dẫn đến sự thay đổi hệ dung dịch đậm được ưu tiên. Kháng thể kháng IL-23 có đặc tính tự kết hợp và bị đục trong xitrat nồng độ cao ở độ pH=5,5 và độ pH=6,0. Việc thay thế xitrat bằng axetat (độ pH=5,5) hoặc histidin (độ pH=6,0) đã giảm tới mức thấp nhất độ trắng sữa mà không làm ảnh hưởng đến độ ổn định nhiệt và sinh hóa. Sucroza (7%) được bổ sung vào để làm cho chế phẩm đẳng trương. Sucroza (7%) cũng làm giảm độ trắng sữa và làm tăng độ ổn định nhiệt (Tm tăng) và làm giảm % monome mất đi trong các nghiên cứu về độ ổn định trong điều kiện tăng cường (số liệu không được nêu). Polysorbat 80 (0,05%) được bổ sung vào để giảm thiểu sự kết tụ do tác động của việc lắc gây ra.

Chế phẩm dựa trên histidin bao gồm histidin 10 mM (độ pH=6,0), sucroza 7% và PS-80 0,05% được chọn là chế phẩm nồng độ cao chứa hum13B8-b được ưu tiên. Các đặc tính khác nhau của dung dịch, bao gồm độ nhớt, tỷ trọng, nồng độ osmol/lít nước dung dịch, và các hạt, được xác định cho chế phẩm chứa histidin 10 mM (độ pH=6,0). Xem bảng 1. Độ nhớt quan sát được ở nhiệt độ trong phòng (5,65 cP) có thể ở mức chấp nhận được khi sử dụng trong các ống tiêm và dụng cụ tiêm tự động đã nạp đầy thuốc.

Bảng 1: Các đặc tính của chế phẩm dạng dung dịch chứa histidin

Đặc tính của dung dịch	Histidin (độ pH=6,0)
Độ nhớt (cP)	5,65 (25°C) 14,46 (5°C)
Tỷ trọng (g/cm ³)	1,06
Độ mol	266
Các hạt có kích thước quan sát được dưới kính hiển vi	25 (>10 µm) 2 (>25 µm)

V. Độ ổn định của chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao chứa kháng thể kháng IL-23p19 được làm giống người 13B8-b

Độ ổn định trong thời gian dài của các chế phẩm đã chọn theo sáng chế được nghiên cứu sau thời gian từ 3 đến 24 tháng bảo quản trong các điều kiện bảo quản khác nhau. Các mẫu được ủ trong các lọ thủy tinh nhỏ dung tích 2 ml (FIG.4), trong các túi dung tích 30 ml (bảo quản với số lượng lớn) (các hình vẽ FIG.5 và FIG.6), hoặc trong các ống tiêm đã nạp sẵn (đóng gói dạng liều đơn để lưu hành trên thị trường) (FIG.7) ở các mức nhiệt độ và độ ẩm khác nhau. Các mẫu được phân tích về sự có mặt của sản

phẩm phân hủy và sản phẩm kết tụ bằng các phương pháp như phương pháp sắc ký loại theo kích thước hiệu năng cao (high-performance size exclusion chromatography - HP-SEC), phương pháp sắc ký trao đổi ion (HP-IEX), phương pháp điện di mao quản SDS (CE-SDS, khử và không khử), và phương pháp lập bản đồ peptit. Độ ổn định kháng thể được đo bằng phép đo nhiệt lượng quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC). Hoạt tính sinh học được đánh giá bằng thử nghiệm ELISA liên kết IL-23 và thử nghiệm chức năng dựa trên tế bào. Nồng độ kháng thể được xác định bằng cách đo độ hấp thụ UV ở bước sóng 280 nm. Độ trắng sữa được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 350 nm (OD_{350}). Các kết quả được thể hiện trên các hình vẽ từ FIG.4 đến FIG.7.

Trong bộ thử nghiệm thứ nhất, 1,5 ml mẫu được đặt trong các lọ thủy tinh nhỏ 2,0 ml và được phân tích sau khi bảo quản trong các điều kiện khác nhau. Các kết quả được thể hiện ở FIG.4. Rất ít sự phân hủy hoặc kết tụ được quan sát trong các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 5°C và độ ẩm môi trường, tương ứng với điều kiện làm lạnh thông thường. Các hình vẽ từ FIG.4A đến FIG.4F. Các điều kiện phân hủy tăng cường, như RH4 (40°C, độ ẩm tương đối 75%), mà được bao gồm dưới dạng đối chứng dương đánh giá mẫu phân hủy, thể hiện mức hao hụt giảm monome theo kỳ vọng và lượng sản phẩm phân hủy và kết tụ tăng lên rất sớm, ngay từ thời điểm đầu tiên (một tháng). Các hình vẽ từ FIG.4A đến FIG.4F. Độ trắng sữa ổn định ở nhiệt độ 5°C (FIG.4G), nhưng tăng lên ở nhiệt độ 25°C và 40°C (các hình vẽ FIG.4H và FIG.4I). Mức độ oxy hóa thấp tương tự ở nhiệt độ 5°C, nhưng khác biệt đáng kể trong các điều kiện RH4, hoặc ở nhiệt độ 40°C. FIG.4J và FIG.4K. Các kết quả này thể hiện rằng mặc dù các thử nghiệm có khả năng phát hiện thấy sự phân hủy bằng nhiều cách, như đã chứng minh, ví dụ, bằng các kết quả RH4, bảo quản trong điều kiện làm lạnh thông thường dẫn đến chất lượng sản phẩm không giảm hoặc giảm đi rất ít trong thời gian bảo quản ít nhất là chín tháng.

Trong bộ thử nghiệm thứ hai, các mẫu được đặt trong túi có lớp tiếp xúc lỏng etylen-vinyl-axetat (EVA) có tên CELSIUS®-Pak dung tích 30 ml (Sartorius, Goettingen, Germany) và được phân tích sau khi bảo quản trong các điều kiện khác nhau. Các kết quả được thể hiện trong các hình vẽ FIG.5 và FIG.6. Các thử nghiệm

này được thiết kế chủ yếu là để đánh giá độ ổn định của dược chất trong các điều kiện bảo quản với số lượng lớn thông thường.

Các mẫu được bảo quản với số lượng lớn được bảo quản trong ba điều kiện đông lạnh (-80°C , -45°C và -20°C) và được làm lạnh (từ 2°C đến 8°C). Các số liệu đại diện được cung cấp trên FIG.5 cho các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 5°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) và -45°C trong thời gian lên tới 18 tháng. Sau 12 tháng bảo quản quan sát thấy nồng độ tăng nhẹ (FIG.5A), có lẽ là do sự bay hơi từ các túi bảo quản ở các mẫu ở nhiệt độ 5°C . Hoạt tính sinh học không có xu hướng thay đổi rõ rệt (FIG.5B và FIG.5C), và các tạp chất có liên quan đến protein, các sản phẩm phân hủy và các sản phẩm kết tụ thường nằm trong các giới hạn cho phép trong thời gian lên tới 18 tháng, đặc biệt đối với các mẫu được bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ -45°C (các hình vẽ từ FIG.5D đến FIG.5L).

Độ ổn định khi bảo quản số lượng lớn cũng được đánh giá ở nhiệt độ cao hơn. Số liệu đại diện được thể hiện trên FIG.6 cho các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 5°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$), 25°C , 25H, 40°C và RH4 trong thời gian lên tới 12 tháng. Các mẫu đã làm lạnh thể hiện hoạt tính sinh học ổn định trong thời gian 12 tháng, trong khi các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng (25°) thực tế có hoạt lực sinh học tăng rõ rệt, một tác động có thể xảy ra do nồng độ thực do bay hơi. Các hình vẽ FIG.6A và FIG.6B. Các mẫu ổn định trong thời gian 12 tháng khi được bảo quản ở nhiệt độ 5°C , nhưng các tạp chất có liên quan đến protein, (sản phẩm phân hủy và sản phẩm kết tụ) tăng lên theo thời gian đối với các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 25°C và 25H, và tăng mạnh đối với các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 40°C và RH4 (điều kiện phân hủy tăng cường). Các hình vẽ từ FIG.6C đến FIG.6K.

Trong bộ thử nghiệm thứ ba, 1 ml mẫu chế phẩm chứa kháng thể nồng độ 100 mg/ml được đặt trong các ống tiêm (ống tiêm nạp sẵn, có tên BD Hypak Physioliis) và được phân tích sau khi bảo quản trong các điều kiện khác nhau. Các kết quả được thể hiện trên FIG.7 cho các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 5°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) trong thời gian lên tới 24 tháng. Nồng độ kháng thể giữ gần như không thay đổi (FIG.7A), cũng như đối với hoạt tính sinh học (các hình vẽ FIG.7B và FIG.7C). Mức các chất có trọng lượng phân tử cao, % monome, mức các chất có trọng lượng phân tử thấp, % đỉnh kháng thể

chính, các biến thể có tính axit, các biến thể có tính bazơ, các đỉnh sau đỉnh chính, IgG chính, và các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (các hình vẽ từ FIG.7D đến FIG.7L, tương ứng) tất cả được giữ gần như ổn định trong thời gian ít nhất từ 12 đến 24 tháng.

Các kết quả của thử nghiệm về độ ổn định trong thời gian dài được thể hiện trong các hình vẽ từ FIG.4 đến FIG.7 cho thấy rằng chế phẩm chứa hum13B8-b và đệm histidin theo sáng chế có tính ổn định, ở cả hoạt tính sinh học lẫn tính toàn vẹn về mặt vật lý, ở nồng độ kháng thể cao trong các điều kiện bảo quản thông thường, bất kể việc chúng được làm đông lạnh trong dung dịch khối hoặc được làm lạnh, như trong ống tiêm được làm đầy trước.

Các kết quả thu được trong điều kiện phân hủy tăng cường, như RH4 và 25H, và các điều kiện nhiệt độ cao khác, và dường như được dùng để minh họa các sản phẩm và quy trình phân cắt có thể xảy ra đối với kháng thể hum13B8-b, và không phản ánh tốc độ phân hủy đối với kháng thể được dự định để dùng trong điều trị bệnh. Các con đường phân hủy chính của hum13B8-b được phát hiện thấy trong điều kiện phân hủy tăng cường bao gồm mất độ tinh khiết như khi quan sát thấy bằng CE-SDS, tăng các chất HMW và LMW và % monome giảm như khi quan sát thấy bằng HP-SEC. Ngoài ra, HP-IEX cho thấy số lượng biến thể có tính axit và các đỉnh sau đỉnh chính tăng lên, trong khi đó số lượng các biến thể có tính bazơ và các đỉnh chính giảm xuống. Việc bảo quản trong thời gian dài các chế phẩm dạng dung dịch chứa kháng thể trị liệu, như hum13B8-b, ở nhiệt độ cao là rất khó. Việc bảo quản trong thời gian dài hum13B8-b, ví dụ, có thể được thực hiện trong các túi CELSIUS®-Pak được làm đông lạnh ở nhiệt độ -45°C, trong điều kiện đó, các thuộc tính về mặt chất lượng được kỳ vọng là giữ ổn định trong thời gian ít nhất 18 tháng. Các ống tiêm hoặc dụng cụ tiêm tự động nạp sẵn chứa các liều hum13B8-b đơn lẻ có thể được bảo quản ở nhiệt độ khoảng 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$), và cũng được kỳ vọng là giữ ổn định trong thời gian ít nhất là 18 tháng.

VI. Liều dùng và cách dùng

Mặc dù chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao theo sáng chế đặc biệt thích hợp để sử dụng dưới da ở liều cao nhưng các chế phẩm này cũng có thể được sử dụng theo cách khác nhau. Đường dùng thích hợp có thể, ví dụ gồm sử dụng qua đường miệng,

qua đường trực tràng, qua niêm mạc, hoặc trong ruột; phân phối ngoài đường tiêu hóa, bao gồm việc tiêm trong cơ, trong da, trong tủy sống, cũng như tiêm trong nội tủy mạc, trực tiếp trong não thất, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong mũi, hoặc trong mắt.

Theo cách khác, một người có thể sử dụng kháng thể khu trú ở một vị trí hơn là dùng toàn thân, ví dụ, thông qua việc tiêm kháng thể trực tiếp vào khớp bị viêm hoặc thương tổn do tác nhân gây bệnh gây ra đặc trưng bởi bệnh lý miễn dịch, thường ở dạng chế phẩm giải phóng kéo dài hoặc chế phẩm giải phóng chậm. Hơn nữa, một người có thể sử dụng kháng thể trong hệ thống phân phối thuốc hướng đích, ví dụ, trong thể mỡ phủ kháng thể đặc hiệu mô, hướng tới, ví dụ, khớp bị viêm hoặc thương tổn do tác nhân gây bệnh gây ra đặc trưng bởi bệnh lý miễn dịch. Thể mỡ này sẽ được hướng đích và được hấp thu chọn lọc bởi mô bị tổn thương.

Việc sử dụng dưới da có thể được thực hiện bằng cách tiêm sử dụng ống tiêm, dụng cụ tiêm tự động, bút tiêm hoặc dụng cụ tiêm không cần kim tiêm.

Mặc dù chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao theo sáng chế đặc biệt thích hợp cho các ứng dụng yêu cầu nồng độ kháng thể cao nhưng không có lý do cho thấy chế phẩm này không thể sử dụng được ở nồng độ thấp hơn trong các trường hợp không cần hoặc không muốn sử dụng nồng độ cao. Nồng độ kháng thể thấp hơn có thể thích hợp đối với việc sử dụng dưới da với liều thấp, hoặc trong các chế độ sử dụng khác (như sử dụng trong tĩnh mạch), trong đó thể tích có thể được phân phối về cơ bản nhiều hơn 1 ml. Nồng độ thấp hơn này có thể gồm 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 mg/ml hoặc ít hơn.

Việc chọn chế độ sử dụng để điều trị bệnh phụ thuộc vào một vài yếu tố, gồm tốc độ chuyển hóa thực thể trong mô hoặc huyết thanh, mức trầm trọng của triệu chứng bệnh, tính sinh miễn dịch của thực thể, và tính dễ tiếp cận các tế bào đích trong nền sinh học. Tốt hơn nếu, chế độ sử dụng tối đa hóa lượng chất trị liệu được phân phối cho người bệnh phù hợp với mức tạo ra các tác dụng phụ cho phép. Do đó, lượng chất sinh học được phân phối phụ thuộc một phần vào thực thể cụ thể và mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh lý cần điều trị. Các hướng dẫn về việc chọn liều dùng thích hợp cho kháng thể, xytokin, và các phân tử nhỏ đã có sẵn. Xem, ví dụ, tài liệu:

Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokin and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, NY; Baert et al. (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom et al. (1999) New Engl. J. Med. 341 : 1966-1973; Slamon et al. (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz et al. (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh et al. (2003) New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipsky et al. (2000) New Engl. J. Med. 343: 1594-1602; Physicians* Desk Reference 2003 (Physicians* Desk Reference, 57th Ed); Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002).

Việc xác định liều thích hợp được tiến hành bởi thầy thuốc lâm sàng, ví dụ, bằng cách sử dụng các thông số hoặc yếu tố đã biết hoặc nghi ngờ trong lĩnh vực kỹ thuật này là sẽ tác động đến việc điều trị hoặc được dự đoán là sẽ tác động đến việc điều trị. Liều dùng thích hợp ("lượng cho hiệu quả điều trị bệnh") của protein sẽ phụ thuộc, ví dụ, vào tình trạng bệnh lý cần điều trị, mức độ trầm trọng và tiến trình của tình trạng bệnh, việc liệu protein được sử dụng cho mục đích ngăn ngừa hay điều trị bệnh, liệu pháp đã sử dụng trước đó, tiểu sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng đối với protein này, loại protein được sử dụng, và sự can thiệp của bác sỹ chăm sóc. Trong một số trường hợp, liều dùng ban đầu thấp sẽ được chọn và sau đó, liều này được tăng dần với các lượng nhỏ cho đến khi đạt được lợi ích điều trị mong muốn hoặc tối ưu so với các tác dụng phụ tiêu cực bất kỳ. Các thông số quan trọng dùng để chẩn đoán bao gồm các thông số thể hiện triệu chứng, ví dụ, mức độ viêm hoặc mức độ cytokin gây viêm. Protein này thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân một lần hoặc nhiều lần. Protein này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các thuốc hoặc liệu pháp điều trị khác.

Các kháng thể có thể được cung cấp bằng cách truyền liên tục, hoặc bằng các dùng cách liều, ví dụ, một ngày một lần, từ 1 đến 7 lần một tuần, một tuần một lần, hai tuần một lần, mỗi tháng một lần, hai tháng một lần, mỗi quý một lần, nửa năm một lần hoặc mỗi năm một lần, v.v.. Phác đồ liều được ưu tiên là một phác đồ bao gồm liều tối đa hoặc tần suất dùng để tránh được các tác dụng phụ không mong muốn quan trọng. Tổng liều dùng hằng tuần thường ít nhất bằng 0,05 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,5 µg/kg, 1

µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0,2 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg cân nặng hoặc lớn hơn. Xem, ví dụ, tài liệu: Yang et al. (2003) New Engl. J. Med. 349:427-434; Herald et al. (2002) New Engl. J. Med. 346: 1692-1698; Liu et al. (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portielji et al. (20003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 133-144.

VII. Các ứng dụng

Sáng chế đề xuất chế phẩm dạng dung dịch nồng độ cao chứa kháng thể kháng IL-23p19 ở người là mAb hum13B8-b để sử dụng trong điều trị các rối loạn và tình trạng bệnh viêm, ví dụ, của hệ thần kinh trung ương, hệ thần kinh ngoại biên, và đường dạ dày - ruột, cũng như các rối loạn tự miễn và các rối loạn tăng sinh.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị, ví dụ, bệnh đa xơ cứng (MS), bao gồm bệnh MS tái phát - hồi phục và bệnh MS tiến triển nguyên phát, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ (a.k.a. ALS; bệnh Lou Gehrig), tổn thương não do thiếu máu cục bộ, bệnh prion, và bệnh sa sút trí tuệ có liên quan đến HIV, cũng như chứng đau thần kinh, bệnh lý thần kinh sau chấn thương, hội chứng Guillain-Barre (Guillain-Barre syndrome - GBS), bệnh lý đa thần kinh ngoại biên, và tái tạo thần kinh.

Các chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong điều trị các rối loạn viêm ruột, ví dụ, bệnh Crohn, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh của bụng, và hội chứng ruột dễ bị kích thích. Chúng cũng có thể được sử dụng trong điều trị các rối loạn viêm như bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, bệnh vẩy nến, bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm khớp, bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, và bệnh viêm khớp vẩy nến, các rối loạn tự miễn, như luput ban đỏ hệ thống và bệnh tiểu đường tuýp I, và các rối loạn tăng sinh như bệnh ung thư. Xem, ví dụ, công bố đơn PCT số WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631; và WO 01/18051.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Chế phẩm dạng dung dịch

Theo một phương án, chế phẩm dạng dung dịch chứa hum13B8-b theo sáng chế được cung cấp dưới dạng dung dịch nồng độ 100 mg/mL chứa kháng thể nạp với thể tích 1,0 mL nạp sẵn trong ống tiêm, hoặc dụng cụ tiêm tự động. Thể tích 1,0 mL là thể tích có thể chiết ra được, chứ không phải là thể tích nạp, thể tích này có thể bao gồm một lượng nạp đầy đủ để đảm bảo phân phối một liều có thể tích đầy đủ là 1,0 mL. Ví dụ về công thức bào chế ra 1,0 ml chế phẩm theo sáng chế được cung cấp bảng 2. Theo một phương án, một mẻ sản phẩm thuốc được bào chế ở quy mô từ 15 đến 30 L, hoặc bao gồm từ 15.000 đến 30.000 liều.

Bảng 2: 1,0 mL chế phẩm dạng dung dịch

Thành phần	Loại	Số lượng
Hum13B8-b	Theo đặc tính kỹ thuật của sản phẩm	100 mg
L-Histidin	Ph.Eur./USP	0,683 mg
L-Histidin HCl	Ph.Eur.	1,17 mg
Polysorbat 80	Ph.Eur./NF/JP	0,500 mg
Sucroza	Ph.Eur./NF/JP	70,0 mg
Nước dùng để tiêm	USP	Vừa đủ

Theo một số phương án, lượng thành phần đệm (L-histidin và L-histidin HCl) sẽ lệch một chút so với lượng tính theo khối lượng được liệt kê trong bảng 2 do cần phải điều chỉnh độ pH đến khoảng 6,0. Cụ thể, theo một số phương án, dạng axit hoặc bazơ của histidin với lượng nhiều hơn hoặc ít hơn so với các lượng này trong bảng 2, được bổ sung vào để điều chỉnh độ pH đến giá trị mong muốn bằng khoảng 6,0. Theo các phương án khác, lượng L-histidin và L-histidin HCl xấp xỉ các lượng trong bảng 2 sẽ được bổ sung vào để đạt được độ pH gần bằng 6,0, nhưng cao hơn một chút, và HCl tiếp đó được bổ sung vào để làm giảm độ pH của chế phẩm thu được xuống khoảng 6,0.

Ví dụ 2

Phép đo nhiệt lượng quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC)

Phép đo nhiệt lượng quét vi sai Valerian-Plotnikov (differential scanning calorimetry - DSC) được sử dụng để đánh giá độ ổn định nhiệt của các kháng thể trong các chế phẩm theo sáng chế. DSC trực tiếp đo sự thay đổi nhiệt xuất hiện trong các protein khi điều chỉnh tăng hoặc giảm nhiệt độ. Protein trong dung dịch ở trạng thái

cân bằng giữa cấu dạng tự nhiên (gấp nếp) và trạng thái bị biến tính (không gấp nếp). DSC được sử dụng để xác định nhiệt độ mà tại đó 50% protein bị biến tính (điểm giữa chuyển tiếp nhiệt, T_m). Protein có T_m cao hơn thường ổn định hơn. Ví dụ, đường cong DSC được cung cấp trên FIG.1E, thể hiện hai vị trí chuyển tiếp, vị trí thứ nhất (T_{m1}) xuất hiện quanh nhiệt độ nằm trong khoảng từ 64 đến 70°C, phụ thuộc vào độ pH, và vị trí chuyển tiếp chính thứ hai (T_{m2}) bằng khoảng 80°C. Vị trí chuyển tiếp chính có thể được cho là sự không gấp nếp của đoạn Fc. Các sự kiện nhiệt nằm trước các vị trí chuyển tiếp chính (nghĩa là ở nhiệt độ thấp hơn) có thể xảy ra do sự không gấp nếp của một vài miền khác bên trong kháng thể (ví dụ, Fab), mà thẳng hàng với dự báo về các nguyên tố cấu tạo nên kháng thể IgG1 được mô tả trong tài liệu. Vermeer (2000) *Biophys. J.* 78:394.

Ví dụ 3

Phương pháp sắc ký loại theo kích thước hiệu năng cao (High Performance Size Exclusion Chromatography - HP-SEC)

Tỷ lệ % của các hợp chất có phân tử lượng phân tử lượng cao (HMW), các hợp chất có phân tử lượng thấp phân tử lượng (LMW) và monome trong các chế phẩm chứa hum13B8-b theo sáng chế được phát hiện bằng HP-SEC. Dung dịch thử nghiệm được pha loãng và được phân tách bằng HPLC sử dụng cột loại theo kích thước (YMC-pack Diol-200, cỡ lỗ 200A, 300 x 8,0 mm, 5 μ m, hoặc đương lượng; YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan). Các diện tích đỉnh được sử dụng để xác định % monome, các hợp chất HMW và các hợp chất LMW.

Các đỉnh rửa giải từ SEC được xác định đặc tính bằng cách sử dụng phương pháp tán xạ ánh sáng laze đa góc (SEC-MALLS), mà có thể được sử dụng để ước tính phân tử lượng và để theo dõi các khối kết tụ. Sau khi tách riêng đỉnh monome khỏi các đoạn và các khối kết tụ trên cột SEC, mẫu được phân tích bằng tia cực tím (ultra violet - UV), MALLS và bộ dò chỉ số khúc xạ (refractive index - RI), cho phép tính toán nồng độ chất phân tích và sau đó ước tính phân tử lượng (MW) của chất phân tích này. Cường độ của ánh sáng tán xạ (được phát hiện bằng MALLS) tỷ lệ với sản phẩm chứa protein (được xác định bằng RI) và phân tử lượng. SEC-MALLS thể hiện đỉnh chính nổi trội có phân tử lượng bằng khoảng 138 kDa. Phân tử lượng này hoàn toàn tương

ứng với phân tử lượng của monome hum13B8-b tính được theo lý thuyết, và tương tự, tương ứng với khối lượng monome hum13B8-b như được phát hiện bằng cách sử dụng phép đo phổ khối, đồng thời có tính đến độ phân giải sắc ký của SEC và độ chính xác của phương pháp phát hiện bằng tán xạ ánh sáng. Các hợp chất có phân tử lượng lớn phân tử lượng(HMW1), có phân tử lượng phân tử lượng bằng khoảng 300 kDa, có thể là các hợp chất ở dạng dime. Đỉnh HMW thứ hai (HMW2), mà không được quan sát trong tất cả các mẻ, chứa các hợp chất có phân tử lượng phân tử lượng đã ước tính bằng khoảng 465 kDa, tương ứng với các hợp chất ở dạng trime. Các hợp chất có phân tử lượng phân tử lượng thấp (LMW) được phát hiện có phân tử lượng xấp xỉ bằng từ 108 đến 117 kDa, mà là một sản phẩm của quá trình phân mảnh, ví dụ, sản phẩm phân mảnh tại vị trí khớp nối.

Ví dụ 4

Phép đo tán xạ ánh sáng động học (dynamic light scattering - DLS)

Phép đo tán xạ ánh sáng động học (dynamic light scattering - DLS) là một kỹ thuật có thể đưa ra thông tin chi tiết về profin phân bố theo kích thước của các kháng thể đơn dòng nằm trong khoảng từ 0,5 nm đến 6 µm trong dung dịch. Kháng thể đơn dòng hum13B8-b thể hiện đường kính thủy động lực học trung bình bằng khoảng 9,5 nm tính theo cường độ (và 6,5 nm tính theo thể tích). Giá trị này phù hợp với các giá trị của các kháng thể đơn dòng khác. Các chế phẩm có nồng độ ion cao hơn có xu hướng có đường kính thủy động lực học nhỏ hơn so với các chế phẩm có nồng độ ion thấp, và có thể bị ảnh hưởng bởi các thông số khác của dung dịch như dung dịch đệm và độ pH. Xem FIG.1I và FIG.1J. Các kháng thể trong chế phẩm theo sáng chế chủ yếu có tính đơn phân tán. Đường kính thủy động lực học của các kháng thể theo sáng chế có thể có tính thuận nghịch, như được chứng minh bằng các thử nghiệm trong đó kháng thể được pha loãng trong dung dịch đệm có nồng độ ion cao hơn hoặc thấp hơn (số liệu không được thể hiện). Các kết quả này gợi ý rằng đường kính thủy động lực học sẽ cân bằng với các thông số của môi trường xung quanh tại vị trí tiêm khi được sử dụng cho đối tượng.

Ví dụ 5

Phương pháp sắc ký trao đổi cation hiệu năng cao (HP-IEEX)

Các biến thể mang điện của hum13B8-b được phát hiện bằng HP-IEEX, phương pháp này dựa vào các tương tác tĩnh điện giữa các protein trong mẫu và các biến thể mang điện được cố định trên nhựa. Các biến thể mang điện dương của hum13B8-b được liên kết với nhựa mang điện âm trên cột trao đổi cation yếu (Dionex ProPac WCX-10, 4 x 250 mm, hoặc loại tương đương; Thermo Scientific, Bannockburn, III, USA) và được tách bằng phương pháp HPLC. Kháng thể được rửa giải bằng cách tăng độ pH và nồng độ muối, giảm hiệu quả điện tích của các biến thể kháng thể này và thay thế chúng bằng các ion có điện tích tương đương. Sự có mặt của hum13B8-b và các biến thể trong sản phẩm rửa giải được xác định bằng cách dò UV. Các điện tích đỉnh được sử dụng để xác định % các biến thể có tính axit, đỉnh chính, đỉnh sau đỉnh chính và biến thể có tính bazơ.

Tất cả các hợp chất được phát hiện trước đỉnh chính, rửa giải trong thời gian khoảng 23 phút, được đề cập là biến thể có tính axit, trong khi đó các hợp chất rửa giải sau đỉnh chính được đề cập là biến thể có tính bazơ. Việc phân tích các biến thể có tính axit và các đỉnh axit cho thấy rằng chúng không có các cải biến tại đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C, trong khi đó đỉnh chính cho thấy có sự phân cắt hoàn toàn lysin ở đầu tận cùng C và tạo thành pyroglutamat hoàn toàn ở đầu tận cùng N. Đỉnh chính vẫn giữ lại được toàn bộ hoạt tính sinh học. Đỉnh sau đỉnh chính cho thấy có sự phân cắt hoàn toàn lysin và sự α -amit hóa giới hạn đối với gốc prolin ở đầu tận cùng C, tạo thành pyroglutamat hoàn toàn ở đầu tận cùng N, oxy hóa Met251 và Met427 và có hoạt lực giảm khi được xác định bằng thử nghiệm ELISA liên kết. Đỉnh bazơ 1 thể hiện có sự phân cắt hoàn toàn lysin và sự α -amit hóa đối với gốc prolin ở mức độ nào đó ở đầu tận cùng C, và tạo thành pyroglutamat hoàn toàn ở đầu tận cùng N. Đỉnh bazơ 3, là đỉnh phổ biến nhất trong số các đỉnh bazơ, thể hiện sự phân cắt hoàn toàn lysin ở đầu tận cùng C và tạo thành pyroglutamat không hoàn toàn ở đầu tận cùng N. Các biến thể có tính bazơ thể hiện sự phân cắt hoàn toàn lysin và các mức α -amit hóa khác nhau đối với gốc prolin ở đầu tận cùng C, và tạo thành pyroglutamat không hoàn toàn ở đầu tận cùng N. Phần lớn các biến thể mang điện đều giữ lại được hoạt tính sinh học.

Ví dụ 6

Phương pháp lập bản đồ peptit

Phương pháp lập bản đồ peptit cung cấp thông tin về cấu trúc cơ bản của hum13B8-b, và có thể được sử dụng để đánh giá xem liệu phản ứng oxy hóa có diễn ra hay không. Để làm tăng độ bao phủ trình tự, hai phương pháp lập biểu đồ peptit enzym khác nhau được sử dụng để phân tích đặc tính của hum13B8-b. Phương pháp lập biểu đồ đầu tiên là lập biểu đồ peptit sau khi tiêu hóa bằng Lys-C endoproteinaza. Biểu đồ peptit này thu được bằng cách xử lý mẫu chứa hum13B8-b bằng guanidin hydroclorua để làm biến tính protein, và bằng 1,4-dithiotreitol (DTT) để khử các liên kết disulfua. Các mẫu này sau đó được xử lý bằng iodoacetamid (IAM) để alkyl hóa các thiol tự do tạo ra do việc xử lý bằng DTT nêu trên. Các mẫu này sau đó được tiêu hóa bằng Lys-C endoproteinaza. Việc phân tích các peptit tạo thành được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo (Xbridge C18, 5 μ m, cỡ lỗ 130 Å, 2,1x150 mm hoặc tương đương; Waters Corporation, Milford, Mass., USA) được kết hợp với phương pháp đo phổ khối phun điện tử. Trình tự peptit có nguồn gốc từ các chuỗi nhẹ (L) và chuỗi nặng (H), cũng như khối lượng của chúng được phát hiện bằng cách sử dụng phép đo phổ khối, được nêu trong bảng 3.

Thời gian lưu được xác định bằng cách đo độ hấp thụ tia cực tím ở bước sóng 214 nm trong khi chạy sắc ký trong thời gian 90 phút. Các giá trị khối lượng được hiệu chỉnh có tính đến mức độ alkyl hóa các gốc cystein bằng cách cộng khối lượng thực bằng 57 Da vào mỗi gốc cystein được alkyl hóa bằng IAM. Năm peptit có nguồn gốc từ vùng xác định tính bổ trợ (complementarity-determining region - CDR) của hum13B8-b được quan tâm đặc biệt.

Các peptit được cải biến sau dịch mã phổ biến, như peptit chuỗi nặng có đầu tận cùng N được pyroglutamat hóa, peptit chuỗi nặng có đầu tận cùng C đã cắt gốc lysin và vài peptit được oxy hóa ở gốc metionin và khử amit hóa cũng được quan sát thấy. Không phát thấy các cải biến này trong các CDR của phân tử. Các thử nghiệm lập bản đồ peptit thông thường có thể được thực hiện mà không cần sử dụng phép đo phổ khối, và thời gian lưu của các đỉnh được quan sát có thể được sử dụng để so sánh các mẫu, như mẫu thử nghiệm (kiểm tra) độ ổn định và mẫu đối chứng (tham chiếu).

Phương pháp lập bản đồ peptit thứ hai, sử dụng việc tiêu hóa bằng trypsin, được phát triển để bổ sung thêm độ bao phủ đối với các gốc 64 đến 120 của chuỗi nặng, mà chưa được thể hiện rõ trong bản đồ peptit Lys-C. Ngoài vị trí phân cắt các gốc lysin ở đầu tận cùng C giống với endoproteinaza C, trypsin cũng phân cắt các gốc arginin (trừ trường hợp gốc tiếp theo là P) ở đầu tận cùng C, tạo ra một bộ peptit nhỏ hơn. Các peptit thu được từ các gốc từ 64 đến 120 của chuỗi nặng được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo kết hợp với phương pháp đo độ hấp thụ UV và phép đo phổ khối (để chú thích đỉnh). Các đoạn peptit liên quan thu được khi phân cắt bằng trypsin của hum13B8-b được nêu trong bảng 3.

Bảng 3: Phương pháp lập bản đồ peptit bằng Lys-C endoproteinaza và trypsin

Chuỗi	Peptit	Thời gian lưu (phút)	Khối lượng được quan sát (Da)	Ghi chú
H	13-19	17,15	685,42	
H	334-337	8,94	447,27	
H	213-217	13,12	599,37	
H	14-19	17,15	557,32	
H	409-413	23,95	574,34	
H	439-445	35,96	659,35	Đầu tận cùng C-K
H	326-333	37,23	837,50	
H	1-12	41,37	1267,68	1pE
H	340-359	43,29	2310,19	
H	338-359	43,49	2509,32	
H	133-146	43,81	1320,68	
H	414-438	45,04	3059,36	M427 được oxy hóa
H	360-369	47,39	1160,62	
H	121-132	47,97	1185,65	
H	274-287	50,08	1676,80	
H	414-438	52,65	3043,37	
H	370-391	56,90	2544,09	N383 iso D
H	370-391	57,27	2543,10	
H	370-391	58,13	2544,10	N383 D
H	248-273	60,30	2970,41	M251 được oxy hóa
H	392-408	62,47	1872,92	
H	248-273	63,11	2954,42	

H	288-316	70,98	5066,36	
H	288-316	71,19	4904,28	
H	288-316	71,39	4758,17	
H	222-247	71,74	2843,43	
H	274-325	73,05	6096,43	
H	222-245	73,88	2618,29	
H	147-209	82,40	6712,66	
H	13-63	93,78	5696,78	
H	20-63	95,45	5029,36	Có nguồn gốc từ CDR
H	24-63	96,01	4555,12	Có nguồn gốc từ CDR
L	184-188	9,76	624,28	
L	208-214	19,92	868,36	
L	104-107	22,96	487,30	
L	146-149	26,46	559,32	Có nguồn gốc từ CDR
L	150-169	29,11	2134,95	
L	191-207	39,01	1874,92	
L	46-52	40,79	833,51	Có nguồn gốc từ CDR
L	170-183	47,39	1501,76	
L	108-126	64,81	2101,11	
L	1-42	68,14	4765,28	
L	127-145	68,79	2125,05	
L	1-39	68,90	4483,13	
L	53-103	77,20	5559,57	Có nguồn gốc từ CDR

Ví dụ 7

Xác định nồng độ protein bằng phép đo quang phổ UV

Nồng độ của protein kháng thể hum13B8-b trong chế phẩm dạng dung dịch theo sáng chế được xác định bằng phép đo quang phổ UV. Phép đo này dựa trên hệ số hấp thụ ánh sáng UV ở bước sóng 280 nm của các axit amin như các gốc tryptophan, tyrosin và xystein. Độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm được hiệu chỉnh có tính đến sự tán xạ ánh sáng sử dụng độ hấp thụ ở bước sóng 320 nm. Phương pháp này bao gồm việc pha loãng trọng lượng của mẫu trong nước, và ghi lại phổ UV để thiết lập độ hấp thụ ở

bước sóng 280 nm và độ hấp thụ ở bước sóng 320 nm. Các giá trị hấp thụ này và hệ số tắt được xác định bằng thử nghiệm bằng $1,44 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ được sử dụng để tính nồng độ của hum13B8-b.

Ví dụ 8

Hoạt tính sinh học - thử nghiệm chức năng dựa trên tế bào

Thử nghiệm chức năng dựa trên tế bào được phát triển để đánh giá khả năng phong bế các hoạt tính sinh học của IL-23 ở người của hum13B8-b trong các chế phẩm theo sáng chế. Thử nghiệm này đánh giá khả năng của hum13B8-b trong việc ức chế sự hoạt hóa STAT3 do IL-23 gây ra ở dòng tế bào đáp ứng IL-23 (Kit 225). Các loạt pha loãng theo dãy của chất tham chiếu hum13B8-b và mẫu thử nghiệm được ủ với IL-23 ở người ở nồng độ cố định, sau đó ủ với các tế bào đáp ứng IL-23, Kit225. Mức độ ức chế sự phosphoryl hóa STAT3 của hum13B8-b được đo trong dịch tan tế bào bằng thử nghiệm ELISA sử dụng phương pháp bắt giữ STAT3 và cặp kháng thể phát hiện kháng thể kháng p-STAT3, sau đó ủ với kháng thể kháng IgG liên hợp với peroxidaza và bổ sung cơ chất phát quang hóa học. Đường cong đáp ứng với sự ức chế ("đường cong chuẩn") được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp làm khớp logic bốn thông số hồi quy không tuyến tính, trong đó trị số IC50 thể hiện nồng độ của kháng thể kháng IL-23 mà ức chế 50% đáp ứng tối đa. Hoạt lực tương đối của mẫu thử nghiệm được đánh giá bằng cách so sánh đường cong đáp ứng với sự ức chế của mẫu thử nghiệm với đường cong chuẩn và được tính dưới dạng % so với tham chiếu. Giá trị hoạt lực tương đối cho nhiều bản sao của cùng mẫu được kết hợp thành một giá trị duy nhất có thể báo cáo được - giá trị trung bình hình học của hoạt lực tương đối.

Ví dụ 9

Hoạt tính sinh học – thử nghiệm ELISA liên kết

Ái lực của hum13B8-b trong các chế phẩm theo sáng chế đối với IL-23 ở người được đánh giá trong thử nghiệm ELISA liên kết cân bằng, trong đó các loạt pha loãng của chất tham chiếu và các mẫu thử nghiệm được nạp vào các đĩa thử nghiệm phụ xytokin IL-23 ở người. Thử nghiệm này có thể được sử dụng, ví dụ, để đánh giá khả năng giữ lại hoạt tính sinh học của các chế phẩm khác nhau có thể điều trị bệnh. Hoạt lực tương đối của mẫu thử nghiệm được đánh giá bằng cách so sánh đường cong đáp

ứng liều dùng của mẫu thử nghiệm với đường cong đáp ứng liều của chất tham chiếu và được tính dưới dạng % so với chất tham chiếu.

Thử nghiệm ELISA được thực hiện theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tóm tắt như sau, các loạt pha loãng của hum13B8-b trong chế phẩm theo sáng chế được bổ sung vào các lỗ của đĩa vi chuẩn độ trước đó được phủ protein IL-23 ở người và sau đó, phong bế. Sau khoảng thời gian ủ, các lỗ này được rửa và chất phản ứng là kháng thể phát hiện IgG (Fc) dê kháng người ở dê liên hợp với peroxidaza được bổ sung vào. Các lỗ này được rửa lại một lần nữa, và cơ chất peroxidaza phát quang hóa học được bổ sung vào. Tín hiệu được đưa ra là độ phát quang hóa học. Đường cong đáp ứng liều dạng sigma được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp làm khớp logit bốn thông số hồi quy không tuyến tính, trong đó giá trị EC50 thể hiện nồng độ cần để thu được 50% tín hiệu liên kết IL-23 tối đa. Hoạt lực sinh học tương đối được tính bằng cách so sánh các kết quả thu được từ các mẫu thử nghiệm có đường cong chuẩn dựa trên các cơ sở mức tín hiệu thu được với mẫu tham chiếu. Các kết quả được thể hiện dưới dạng % hoạt lực sinh học khi so sánh với dung dịch chứa kháng thể tham chiếu. Các giá trị hoạt lực tương đối cho nhiều bản sao của cùng mẫu được kết hợp thành một giá trị duy nhất có thể báo cáo được - giá trị trung bình hình học của hoạt lực tương đối.

Ví dụ 10

Phương pháp điện di mao quản SDS (CE-SDS)

Phương pháp điện di mao quản bằng natri dodexyl sulfat (CE-SDS) thực hiện việc tách các protein dựa trên kích thước. CE-SDS có thể được thực hiện trong điều kiện không khử hoặc trong điều kiện khử. CE-SDS không khử sẽ phân giải các kháng thể nguyên vẹn khỏi các hợp chất khác trong mẫu, trong khi CE-SDS khử sẽ phân giải các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đã phân ly với nhau, và ra khỏi các hợp chất khác có thể có mặt trong mẫu. Xem, ví dụ tài liệu: Rustandi et al. (2008) Electrophoresis 29:3612.

CE-SDS trong điều kiện không khử bao gồm việc vô hoạt bằng nhiệt đối với mẫu kháng thể hum13B8-b với sự có mặt của N-etylmaleimit, để alkyl hóa các gốc xystein tự do, và SDS. Sau đó, mẫu này được tách ra trong ống mao quản chứa nền polyme SDS có thể thay thế, nền polyme này sẽ tách chọn lọc theo cỡ hạt. Tất cả các

đỉnh trong mẫu thử nghiệm sẽ được hợp nhất lại và các diện tích đỉnh được sử dụng để xác định % IgG chính (kháng thể nguyên vẹn) trong mẫu.

CE-SDS trong điều kiện khử bao gồm việc vô hoạt bằng nhiệt đối với các mẫu kháng thể hum13B8-b với sự có mặt của 2-mercaptoetanol, để khử các liên kết disulfua, và SDS. Sau đó, mẫu được tách ra trong ống mao quản chứa nền polyme SDS có thể thay thế, nền polyme này sẽ tách chọn lọc theo cỡ hạt. Tất cả các đỉnh trong mẫu thử nghiệm sẽ được hợp nhất lại và các diện tích đỉnh được sử dụng để xác định % chuỗi nhẹ và chuỗi nặng nguyên vẹn trong hum13B8-b.

Ví dụ 11

Phương pháp siêu ly tâm phân tích vận tốc lắng (SV-AUC)

SV-AUC được sử dụng để nghiên cứu cấu trúc bậc bốn của kháng thể hum13B8-b trong các chế phẩm theo sáng chế. SV-AUC đo tốc độ tại đó các phân tử lắng xuống để chống lại với lực ly tâm. Tốc độ lắng này cung cấp thông tin về phân tử lượng của các phân tử có mặt trong mẫu. Hum13B8-b chủ yếu lắng dưới dạng một loại chất với hệ số lắng ($s_{20,w}$) bằng 7,0 giầy. Loại chất này có phân tử lượng được ước tính bằng khoảng 150 kDa, phù hợp với phân tử lượng đã dự đoán của monome. Tỷ lệ ma sát, phụ thuộc mức độ hydrat hóa và hình dáng của đại phân tử, tương tự giữa các lô.

Ví dụ 12

Độ ổn định trong thời gian dài của các chế phẩm chứa kháng thể

Số liệu bổ sung về độ ổn định trong thời gian dài được thu thập đối với các chế phẩm kháng thể theo sáng chế. Số liệu ví dụ về độ ổn định trong thời gian lâu hơn 24 tháng được thể hiện trong các bảng từ 4 đến 9 dưới đây cho các lô E và D.

Bảng 4

Điều kiện bảo quản	5C						
Lô D	Khoảng thời gian kiểm tra độ ổn định (tháng)						
Thử nghiệm	Ban đầu	1M	3M	6M	12M	18M	24M
Thử nghiệm - UV (A280nm) mg/mL	95,1	96,1	100,4	99,4	93,6	97,7	103,8
HP-IEX [%]							
Biến thể có tính axit	10,1	10,2	10,2	10,6	9,3	11,5	11,6
Đỉnh axit 1	9,7	9,8	10,7	10,5	10,7	11,4	11,5

Đỉnh trước đỉnh chính							
Đỉnh chính	63,2	63,3	62,3	62,0	62,2	60,3	60,4
Đỉnh sau đỉnh chính							
Đỉnh bazơ 1	9,3	8,9	8,9	9,2	9,7	9,0	8,7
Đỉnh bazơ 2	3,9	4,0	4,4	3,9	2,9	3,4	3,1
Biến thể có tính bazơ	3,8	3,2	3,5	3,8	5,3	3,9	4,0
Khác	ND	0,6	ND	ND	ND	0,5	0,6
HP-SEC [%]							

Điều kiện bảo quản	5C						
Lô D	Khoảng thời gian kiểm tra độ ổn định (tháng)						
Thử nghiệm	Ban đầu	1M	3M	6M	12M	18M	24M
Hợp chất có phân tử lượng cao	0,79	0,83	0,95	0,51	0,84	1,16	1,24
Monome	99,2	99,1	99,0	99,5	98,9	98,6	98,5
Đỉnh rửa giải trễ	NQ	0,11	0,07	NQ	0,25	<QL	0,27
HIAC [hạt/mL]							
2 µM	2827	1805	11905	3701	2895	1081	1879
5 µM	292	168	1474	712	612	201	644
10 µM	35	32	326	211	168	36	123
25 µM	0	1	13	9	6	2	4
ND - Không được phát hiện; NQ - Không được định lượng; QL - Giới hạn định lượng; 5C: 5°C (±3°C); QL = 0,25%							

Bảng 5

Điều kiện bảo quản	25H				
Lô D	Khoảng thời gian kiểm tra độ ổn định (tháng)				
Thử nghiệm	Ban đầu	1M	3M	6M	12M
Thử nghiệm - UV (A280nm) mg/mL	95,1	96,4	98,6	102,8	96,3
HP-IEX [%]					
Biến thể có tính axit	10,1	11,5	15,3	18,5	25,4
Đỉnh axit 1	9,7	11,6	13,8	14,8	17,9
Đỉnh trước đỉnh chính					
Đỉnh chính	63,2	60,3	56,0	51,7	42,2
Đỉnh sau đỉnh chính					
Đỉnh bazơ 1	9,3	9,5	8,5	8,7	8,7
Đỉnh bazơ 2	3,9	3,3	2,2	1,7	1,6
Biến thể có tính bazơ	3,8	3,8	3,6	4,5	4,2
Khác	ND	ND	0,5	ND	ND
HP-SEC [%]					
Hợp chất có phân tử lượng cao	0,79	1,47	2,05	1,35	2,69

Monome	99,2	98,4	97,7	97,9	96,2
Đỉnh rửa giải trễ	NQ	0,14	0,30	0,77	1,15
ND - Không được phát hiện; NQ - Không được định lượng; 25H: 25°C/độ ẩm tương đối 60%					

Bảng 6

Điều kiện bảo quản	RH4			
Lô D	Khoảng thời gian kiểm tra độ ổn định (tháng)			
Thử nghiệm	Ban đầu	1M	3M	6M
Thử nghiệm - UV (A280nm) mg/mL	95,1	95,0	103,6	102,7
HP-IEX [%]				
Biến thể có tính axit	10,1	20,4	46,3	58,4
Đỉnh axit 1	9,7	15,9	17,8	15,0
Đỉnh trước đỉnh chính				
Đỉnh chính	63,2	49,4	24,7	15,8
Đỉnh sau đỉnh chính				
Đỉnh bazơ 1	9,3	8,2	5,0	5,8
Đỉnh bazơ 2	3,9	1,5	1,8	ND
Biến thể có tính bazơ	3,8	3,7	4,4	5,0
Khác	ND	0,8	ND	ND
HP-SEC [%]				
Hợp chất có phân tử lượng cao	0,79	2,34	4,91	3,68
Monome	99,2	97,1	93,3	93,3
Đỉnh rửa giải trễ	NQ	0,56	1,74	3,00
ND - Không được phát hiện; NQ - Không được định lượng; RH4: 40°C/độ ẩm tương đối 75%				

Bảng 7

Điều kiện bảo quản	5C						
Lô E	Khoảng thời gian kiểm tra độ ổn định (tháng)						
Thử nghiệm	Ban đầu	1M	3M	6M	12M	18M	24M
Thử nghiệm - UV (A280nm) [mg/mL]	94,1	97,5	97,3	99,0	91,9	101,3	98,2
HP-IEX [%]							
Biến thể có tính axit	8,1	7,7	7,8	8,0	7,9	8,5	8,6
Đỉnh axit 1	8,3	8,8	8,8	8,8	9,1	9,5	9,6
Đỉnh trước đỉnh chính							
Đỉnh chính	66,0	66,0	66,0	65,8	65,6	65,2	65,2
Đỉnh sau đỉnh chính							
Đỉnh bazơ 1	9,5	9,5	9,7	9,8	9,9	9,4	9,4
Đỉnh bazơ 2	4,3	4,7	4,2	4,0	3,7	3,6	3,3
Biến thể có tính bazơ	3,3	3,3	3,4	3,5	3,6	3,4	3,4

Khác	0,5	ND	ND	ND	ND	0,5	0,5
HP-IEX [%]							
Biến thể có tính axit	16,9	NT	17,2	17,8	18,2	NT	19,1
Đỉnh chính	63,8	NT	63,5	62,7	63,1	NT	63,3
Đỉnh sau đỉnh chính	2,0	NT	2,1	2,4	2,1	NT	1,9
Biến thể có tính bazơ	17,3	NT	17,1	17,0	16,8	NT	15,8
Thử nghiệm ELISA liên kết	112	NT	NT	96	NT	NT	NT
Hoạt lực tương đối so với đối chứng [%]							
Thử nghiệm ELISA liên kết	NT	NT	NT	NT	98	100	103
Hoạt lực tương đối so với đối chứng [%]							
Hoạt lực sinh học trong thử nghiệm chức năng dựa trên tế bào	NT	NT	NT	NT	113	106	90
HP-SEC [%]							
Hợp chất có phân tử lượng cao	0,21	0,27	0,17	0,37	0,37	0,46	0,51
Monome	99,8	99,7	99,8	99,5	99,5	99,3	99,3
Đỉnh rửa giải trễ	NQ	0,05	NQ	0,13	<NQ	<NQ	<NQ
HP-SEC [%]							
Hợp chất có phân tử lượng cao	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0,47
Monome	NT	NT	NT	NT	NT	NT	99,2
Đỉnh rửa giải trễ	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0,36
HIAC [hạt/mL]							
2 µm	1646	2307	2759	2240	5752	923	4491
5 µm	199	343	524	240	1352	265	1733
10 µm	15	96	136	30	275	48	585
25 µm	0	3	4	1	15	0	11
CE-SDS (không khử) [%]							
Độ tinh khiết tổng	NT	NT	NT	NT	NT	NT	96,6
CE-SDS (khử) [%]							
Độ tinh khiết tổng	NT	NT	NT	NT	NT	NT	96,6
ND - Không được phát hiện; NQ - Không được định lượng; NT - Không được thử nghiệm; QL - Giới hạn định lượng; QL = 0,25%; 5C: 5°C (± 3°C)							

Bảng 8

Điều kiện bảo quản	25H				
Lô E	Khoảng thời gian kiểm tra độ ổn định (tháng)				
Thử nghiệm	Ban đầu	1M	3M	6M	12M
Thử nghiệm - UV (A280nm) mg/mL	94,1	98,0	98,2	96,0	92,9
HP-IEC [%]					
Biến thể có tính axit	8,1	9,1	10,9	14,5	20,0
Đỉnh axit 1	8,3	9,4	11,2	13,6	16,8
Đỉnh trước đỉnh chính					
Đỉnh chính	66,0	64,3	61,8	56,8	49,5
Đỉnh sau đỉnh chính					
Đỉnh bazơ 1	9,5	9,6	9,9	9,5	7,7
Đỉnh bazơ 2	4,3	4,1	2,3	1,8	0,9
Biến thể có tính bazơ	3,3	3,4	3,5	3,8	3,9
Khác	0,5	ND	ND	ND	1,1
Thử nghiệm ELISA liên kết	112	NT	NT	99	NT
Hoạt lực tương đối so với đối chứng [%]					
Thử nghiệm ELISA liên kết	NT	NT	NT	NT	105
Hoạt lực tương đối so với đối chứng [%]					
Hoạt lực sinh học trong thử nghiệm chức năng dựa trên tế bào	NT	NT	NT	NT	103
HP-SEC [%]					
Hợp chất có phân tử lượng cao	0,21	0,51	0,49	1,19	1,87
Monome	99,8	99,4	99,1	98,3	97,6
Hợp chất có phân tử lượng thấp	NQ	0,12	0,43	0,50	0,86
ND - Không được phát hiện; NT - Không thử nghiệm; NQ -Không được định lượng; 25H: 25°C/độ ẩm tương đối 60%					

Bảng 9

Điều kiện bảo quản	RH4			
Lô E	Khoảng thời gian kiểm tra độ ổn định (tháng)			
Thử nghiệm	Ban đầu	1M	3M	6M
Thử nghiệm - UV	94,1	94,9	98,4	95,5

(A280nm) mg/mL				
HP-IEX [%]				
Biến thể có tính axit	8,1	18,5	36,3	56,7
Đỉnh axit 1	8,3	15,1	19,4	16,5
Đỉnh trước đỉnh chính				
Đỉnh chính	66,0	51,6	32,6	16,9
Đỉnh sau đỉnh chính				
Đỉnh bazơ 1	9,5	8,8	7,3	5,5
Đỉnh bazơ 2	4,3	1,7	0,4	ND
Biến thể có tính bazơ	3,3	3,6	4,1	4,4
Khác	0,5	0,7	ND	ND
Thử nghiệm ELISA liên kết	112	NT	NT	104
Hoạt lực tương đối so với đối chứng [%]				
HP-SEC [%]				
Hợp chất có phân tử lượng cao	0,21	1,39	1,66	4,86
Monome	99,8	98,1	96,7	92,7
Hợp chất có phân tử lượng thấp	NQ	0,51	1,60	2,44
ND - Không được phát hiện; NQ - Không được định lượng; NT - Không được thử nghiệm; RH4: 40°C/độ ẩm tương đối 75%				

Bảng 10 liệt kê các trình tự trong danh mục trình tự.

Bảng 10

Mã số định danh trình tự

SEQ ID NO:	Mô tả
1	hum13B8-b HC
2	hum13B8-b HC
3	13B8-b CDRH1
4	13B8-b CDRH2
5	13B8-b CDRH3
6	13B8-b CDRL1
7	13B8-b CDRL2
8	13B8-b CDRL3
9	IL-23p19 ở người
10	hum13B8-b HC ADN
11	hum13B8-b LC ADN
12	Trình tự tín hiệu của chuỗi nặng
13	Trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm dạng dung dịch ổn định chứa kháng thể hum13B8-b kháng IL-23p19 bao gồm:

- a) ít nhất 50 mg/ml kháng thể kháng IL-23p19 là hum13B8-b;
 - b) dung dịch đệm histin, độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6;
 - c) chất hoạt động bề mặt; và
 - d) một lượng chất điều chỉnh tính đẳng trương để làm cho dung dịch này đẳng trương, trong đó chất điều chỉnh tính đẳng trương này là sucroza, trehaloza hoặc manitol;
- trong đó kháng thể hum13B8-b nêu trên bao gồm:

- i) polypeptit chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO: 2; và
- ii) polypeptit chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO: 1.

2. Chế phẩm dạng dung dịch ổn định theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa ít nhất là 80 mg/ml kháng thể hum13B8-b kháng IL-23p19.

3. Chế phẩm dạng dung dịch ổn định theo điểm 2, trong đó chế phẩm này chứa ít nhất là 100 mg/ml kháng thể hum13B8-b kháng IL-23p19.

4. Chế phẩm dạng dung dịch ổn định theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa từ 80 đến 120 mg/ml kháng thể hum13B8-b kháng IL-23p19.

5. Chế phẩm dạng dung dịch ổn định theo điểm 4, trong đó chế phẩm này chứa khoảng 100 mg/ml kháng thể hum13B8-b kháng IL-23p19.

6. Chế phẩm dạng dung dịch ổn định theo điểm 1, trong đó chất hoạt động bề mặt là polysorbat 80 và chất điều chỉnh tính đẳng trương là sucroza.

7. Chế phẩm dạng dung dịch ổn định theo điểm 6, trong đó chất hoạt động bề mặt nằm trong khoảng từ 0 đến 0,05% (khối lượng/thể tích) của polysorbat 80 và chất điều chỉnh tính đẳng trương là 7% (khối lượng/thể tích) sucroza.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MERCK SHARP & DOHME CORP.
 Kashi, Ramesh
 Badkar, Aniket

<120> Chế phẩm dạng dung dịch chứa kháng thể kháng intolokin-23p19 (IL-23p19) ở người

<130> 23364

<150> US 61/737,035
 <151> 13-12-2012

<160> 13

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khung làm việc ở người, CDR của bộ gặm nhắm

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(116)
 <223> Vùng biến đổi

<400> 1

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 Ile Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

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

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

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Khung làm việc ở người, CDR của bộ gặm nhấm

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(108)
<223> Vùng biến đổi

<400> 2

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3

Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr Trp Met Thr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR của bộ gặm nhấm với một phần thay thế axit amin

<400> 4

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Glu
 1 5 10 15

Gly

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6

Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 7

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 9

Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln Cys Gln Gln
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His Pro Leu Val
 20 25 30

Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr Thr Asn Asp
 35 40 45

Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln Gly Leu Arg
 50 55 60

Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly Leu Ile Phe
 65 70 75 80

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

Leu Pro Asp Ser Pro Val Gly Gln Leu His Ala Ser Leu Leu Gly Leu
 100 105 110

Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr Gln Gln Ile
 115 120 125

Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu Leu Arg Phe
 130 135 140

Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala Ala Arg Val
 145 150 155 160

Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
 165 170

<210> 10

<211> 1398

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng khung làm việc và vùng hằng định ở người, CDR của bộ gặm nhấm

<400> 10

atggctgtgc tggggctgct gttctgcctg gtgacattcc caagctgtgt gctgtccag
 60

gtgcagctgg tgcagtctgg cgctgaggtg aagaagcctg gcgcctccgt gaaggtctcc
 120

tgcaaggctt ctggctacat cttcatcacc tactggatga cctgggtgcg gcaggccct
 180

ggccaggggc tggagtggat gggccagatc ttccctgcc aaggctctgc agactacaac
 240

gagaagttcg aaggcagagt caccatgacc acagacacat ccaccagcac agcctacatg
 300

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacc gccgtgtatt actgtgccag aggcggtggc
 360

ggattcgctt actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct ccagcgctag caccaagggc
 420

ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg
 480

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgcgtggaa ctcaggcgcc
 540

ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc
600

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg
660

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa
720

actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc
780

ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg
840

gtgggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg
900

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg
960

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag
1020

gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag
1080

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag
1140

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag
1200

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc
1260

tcctttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc
1320

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc
1380

ctgtctccgg gtaaatga
1398

<210> 11

<211> 702

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng khung và vùng hằng định ở người, CDR của bộ gặm nhấm

<400> 11

atggctccag tgcagctgct ggggctgctg gtgctgttcc tgccagccat gagatgtgat
60

atccagatga cccagtctcc atcctccctg tctgcctctg tgggcgacag agtgaccatc
120

acctgcagga ccagcgagaa catctacagc tacctggcct ggtatcagca gaagccaggg
180

aaggccccta agctgctgat ctataacgcc aagaccctgg ctgaaggggt gccatccagg
240

ttcagcggca gcggctctgg gacagacttc accctgacca tcagcagcct gcagcctgag
300

gacttcgcca cctactactg tcagcaccac tacggaattc cattcacctt cggccagggc
360

accaaggtgg agatcaagcg tacggtggct gcaccatctg tgttcatctt ccctccatct
420

gatgagcagc tgaagtctgg aactgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctatccc
480

agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggat aacgccctcc agagcggcaa ctcccaggag
540

agcgtgacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg
600

agcaaagcag actacgagaa acacaaggtg tacgcctgcg aggtgacca tcagggcctg
660

agcagccccg tgacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aa
702

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

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

Val Leu Ser

<210> 13

<211> 19
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 13

Met	Ala	Pro	Val	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Leu	Phe	Leu	Pro	Ala
1				5				10						15	

Met Arg Cys

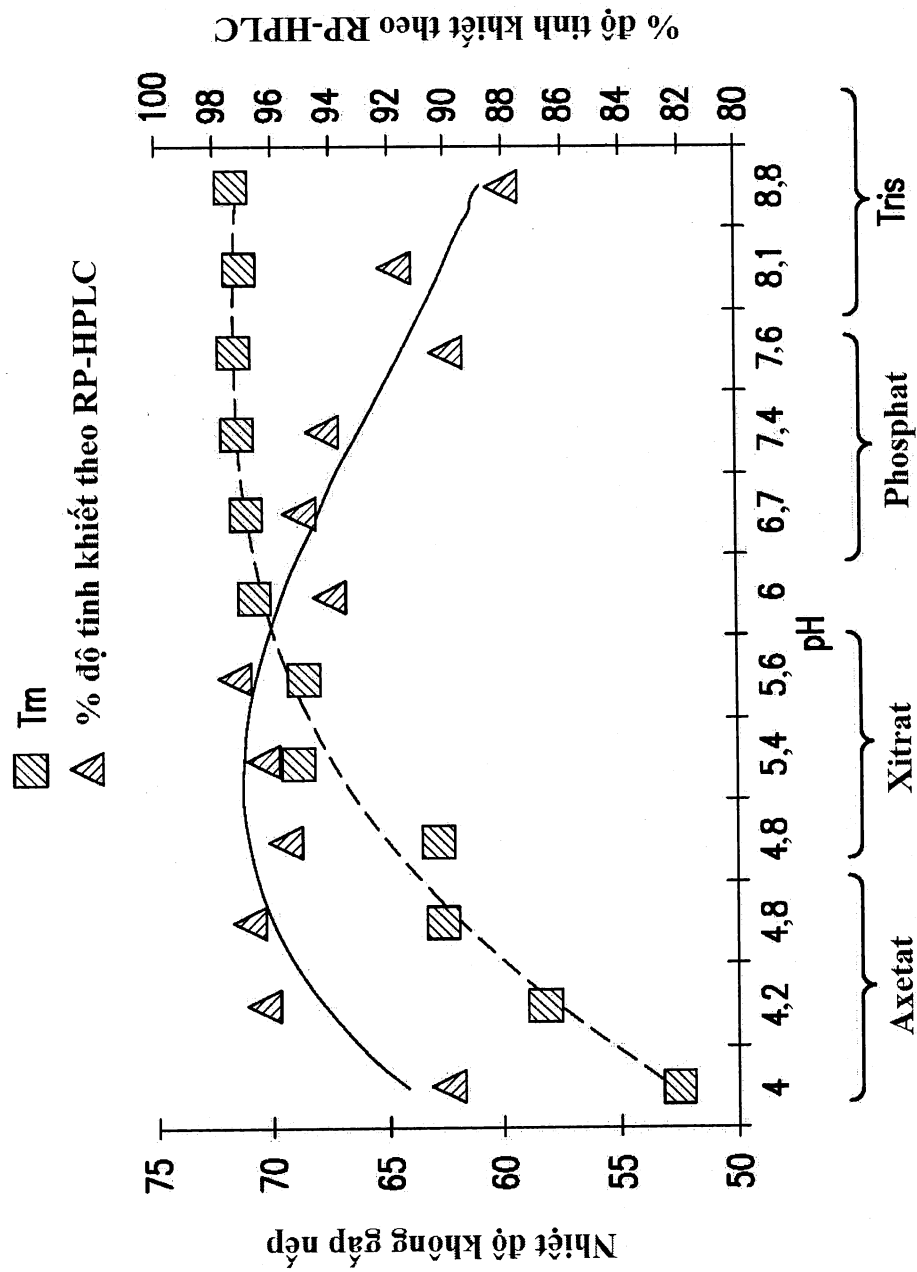


FIG.1A

2/46

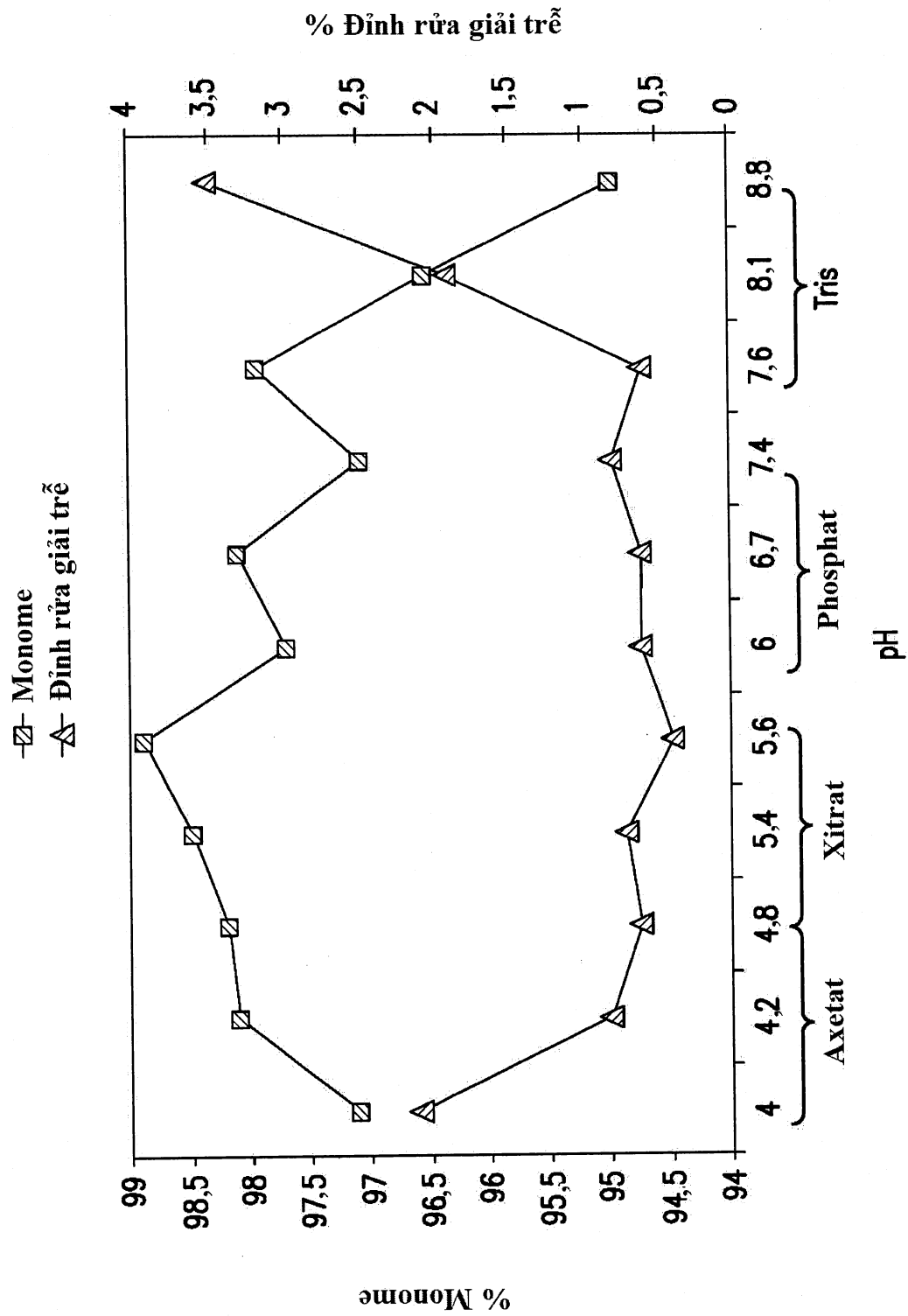


FIG.1B

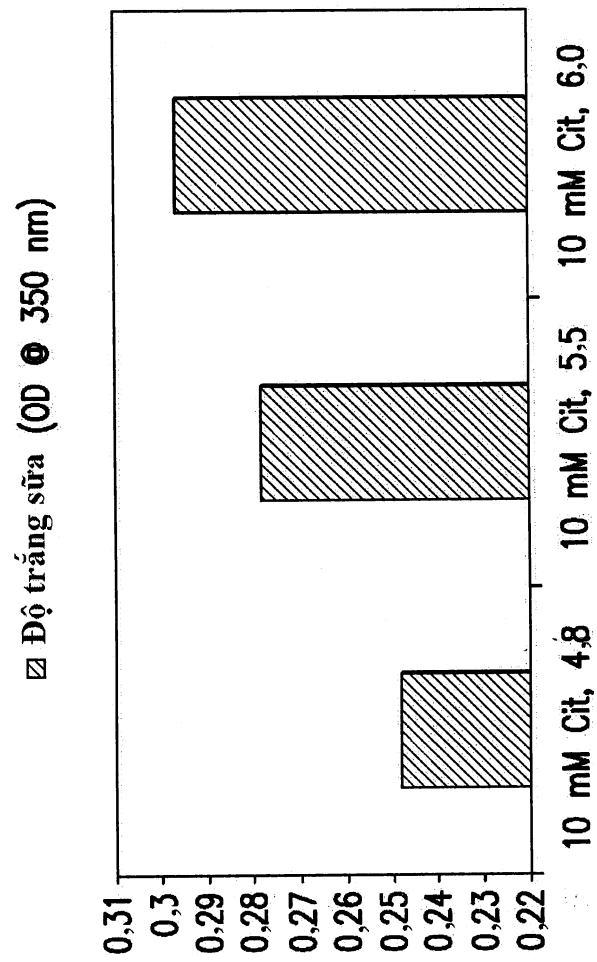


FIG.1C

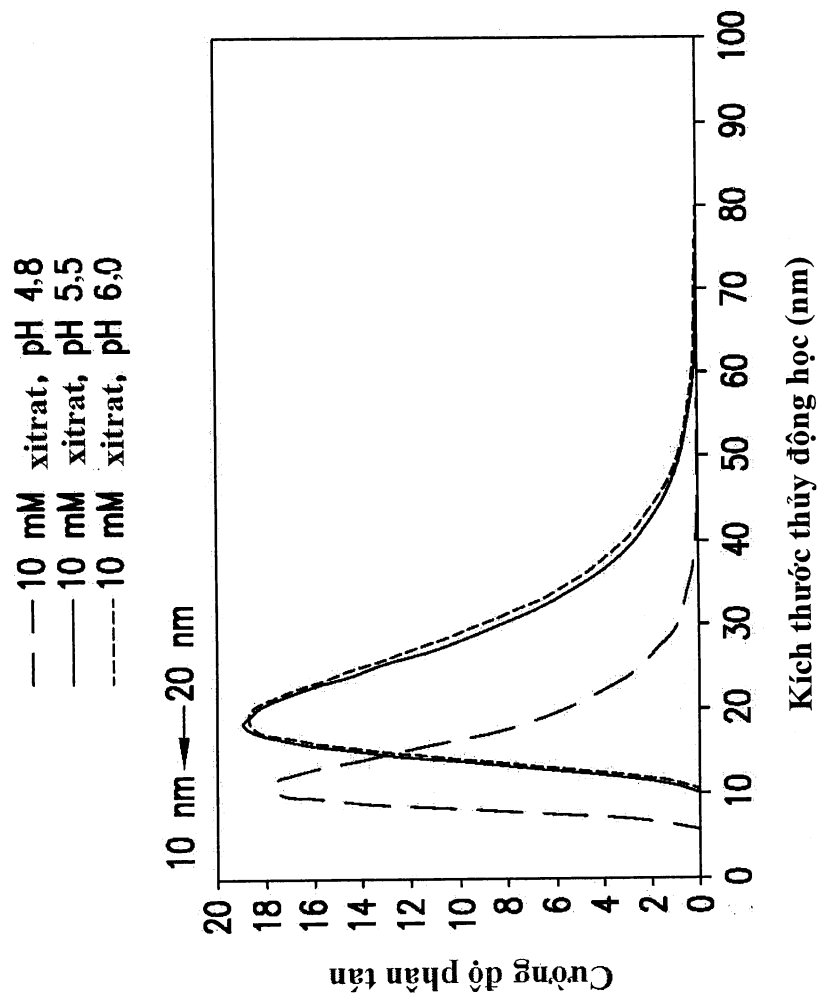
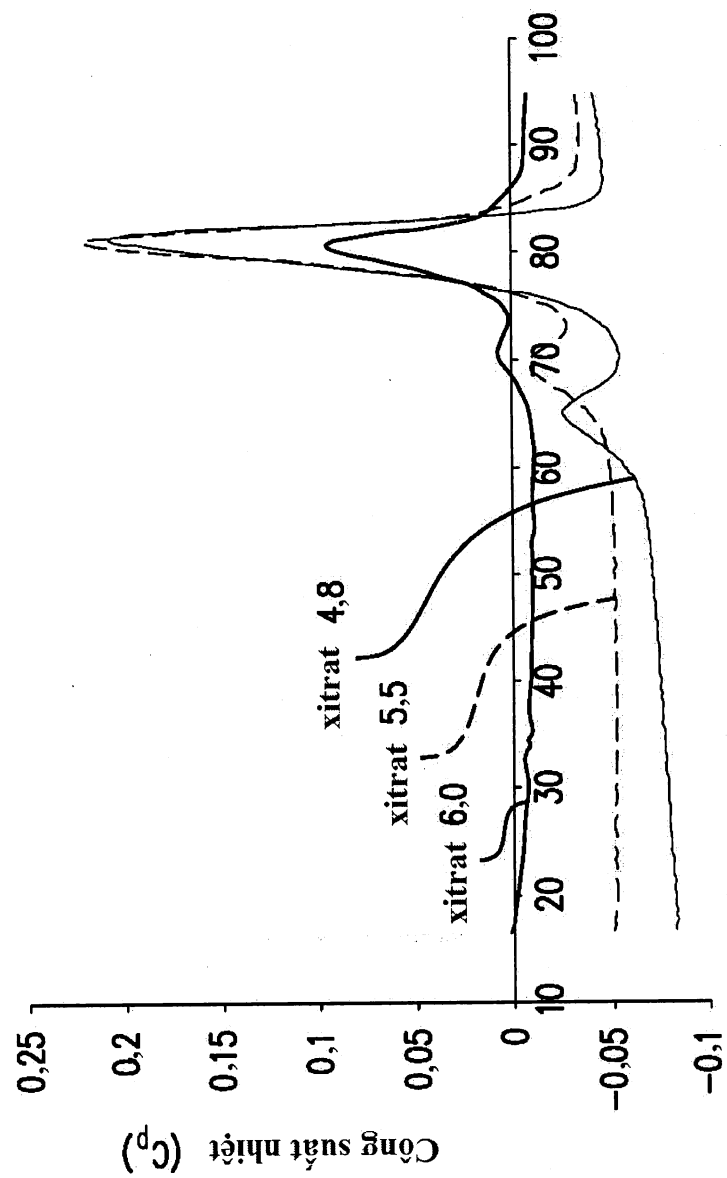


FIG.1D



Nhiệt độ (°C)

FIG.1E

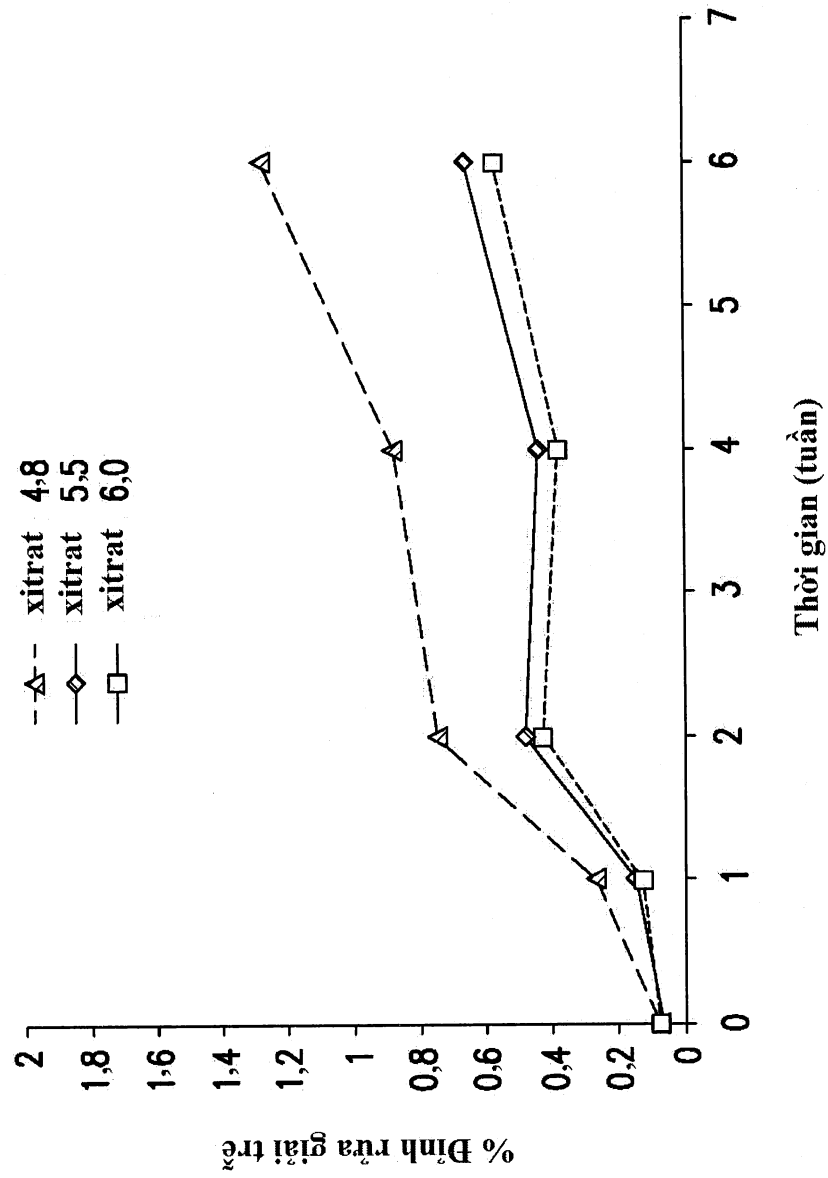


FIG.1F

7/46

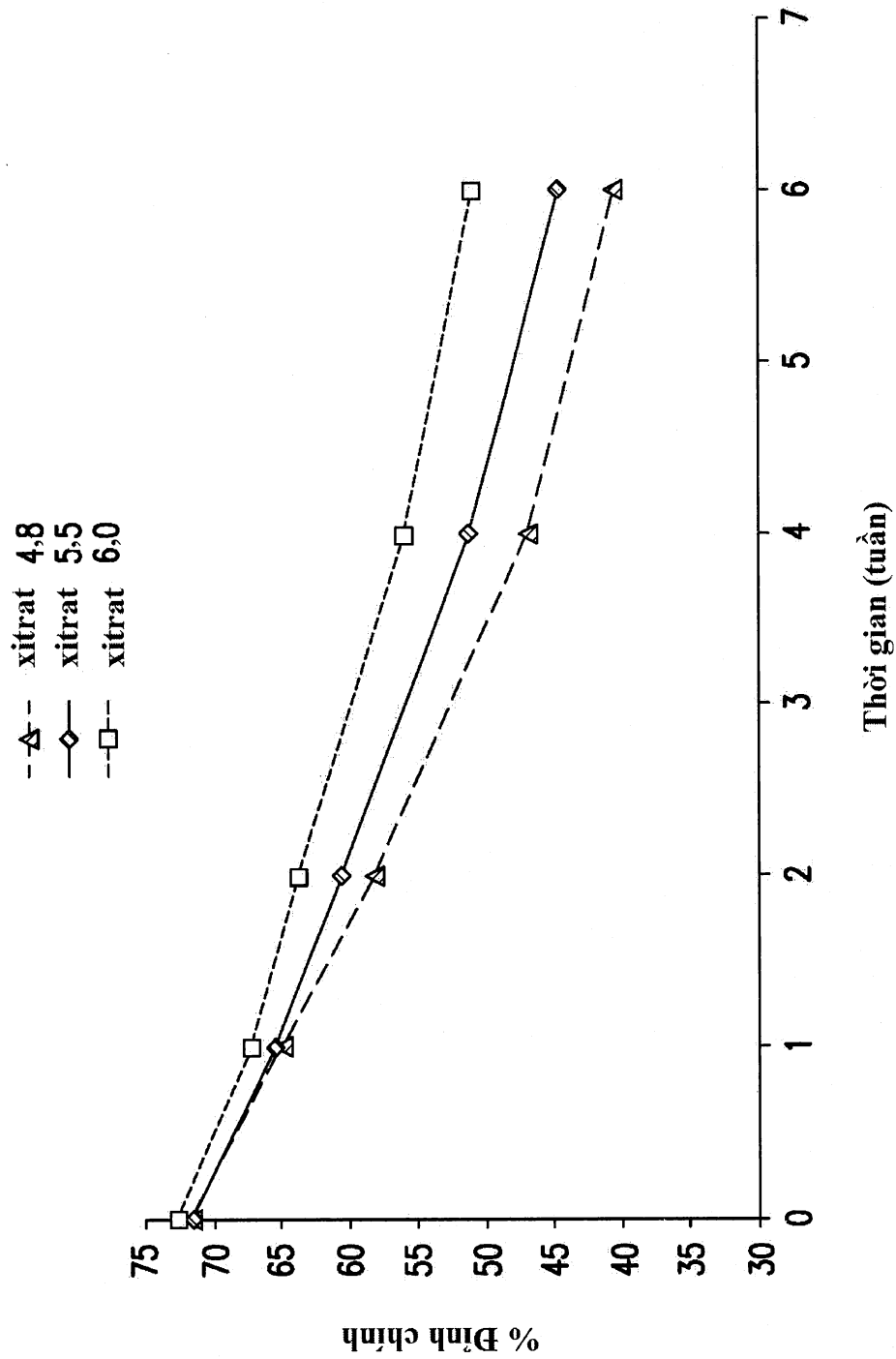


FIG.1G

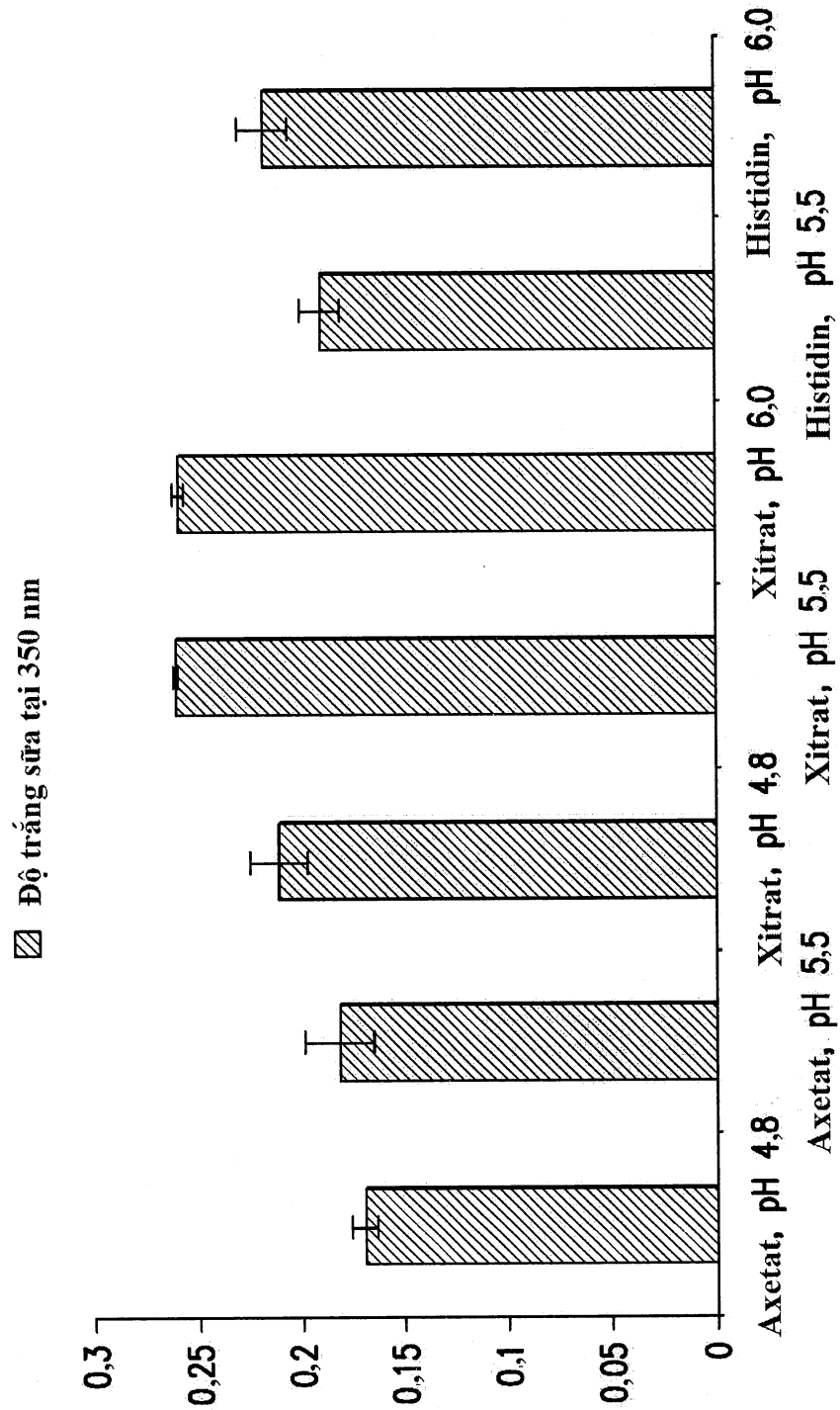


FIG.1H

9/46

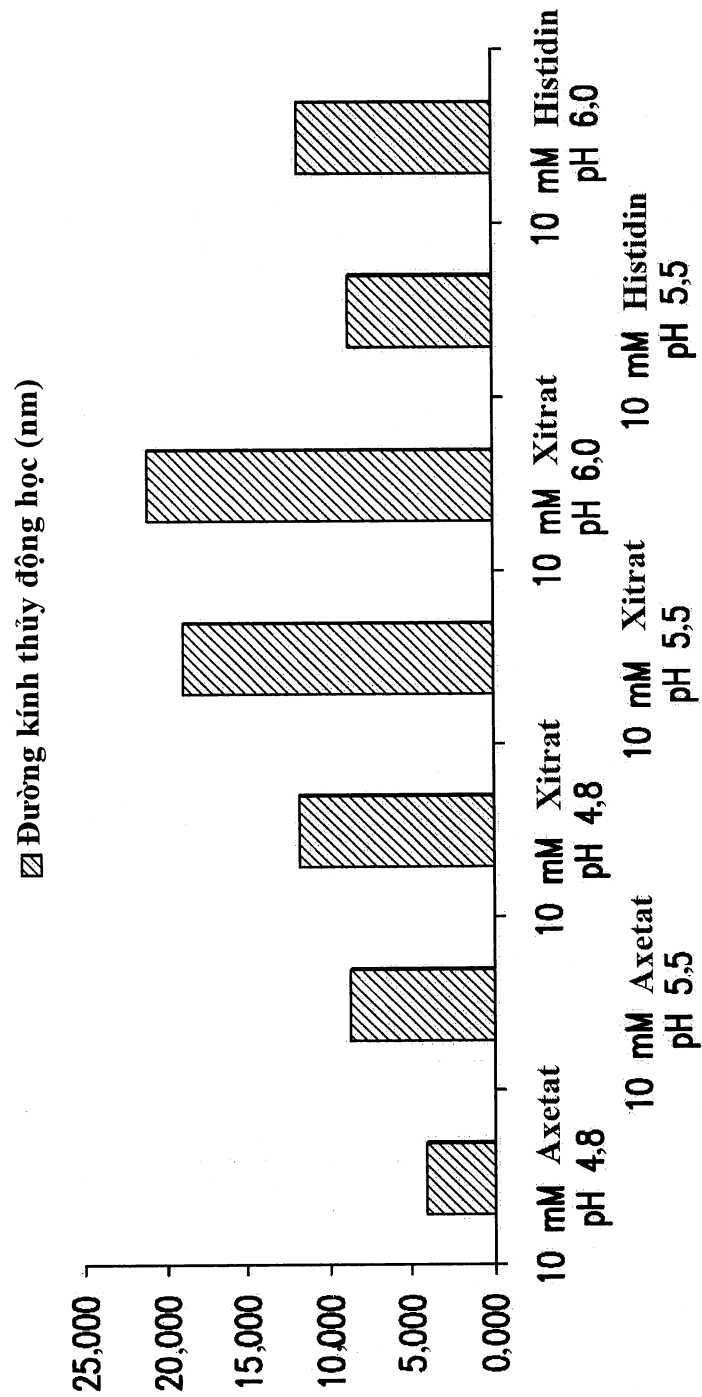


FIG.11

10/46

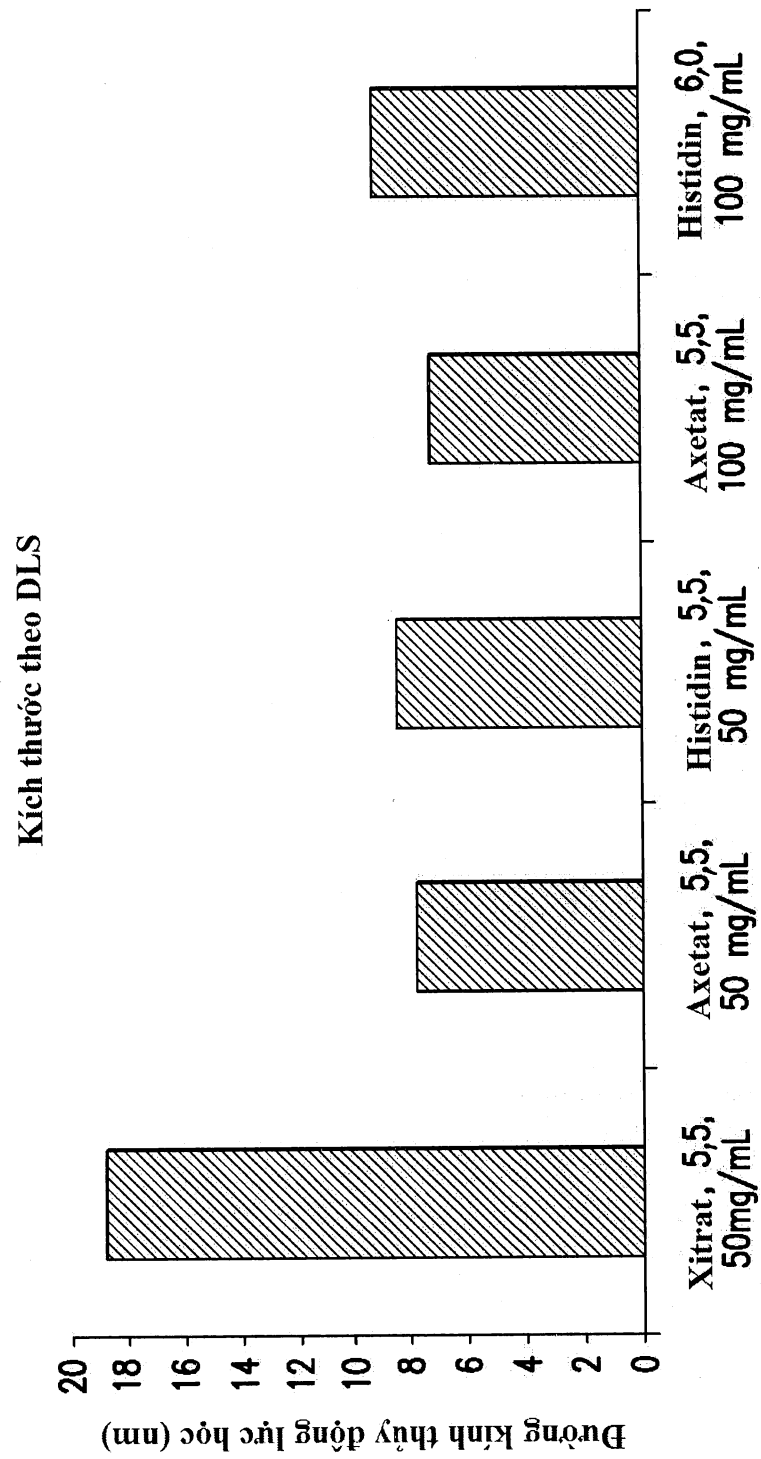
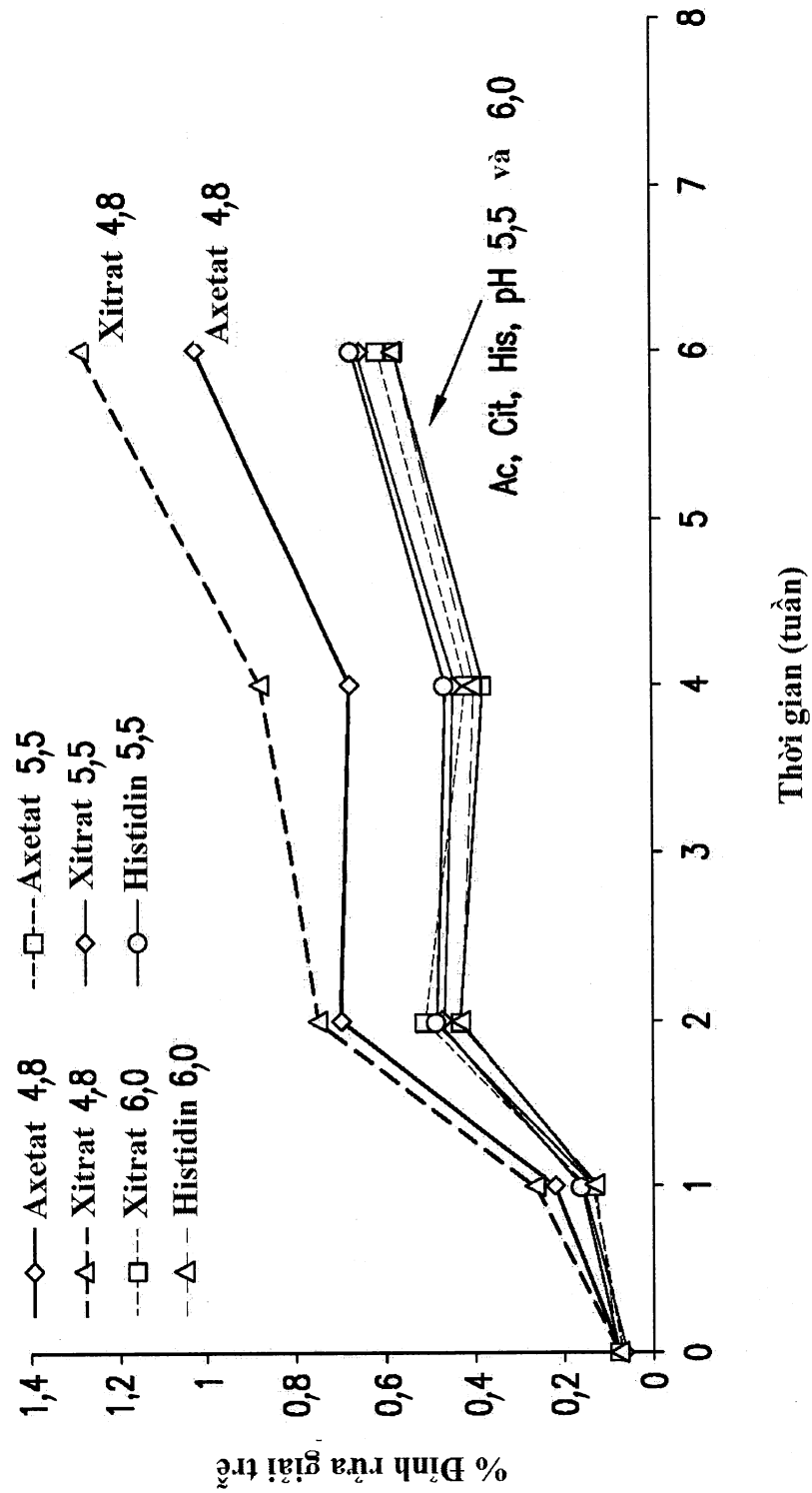


FIG.1J



Thời gian (tuần)

FIG.1K

12/46

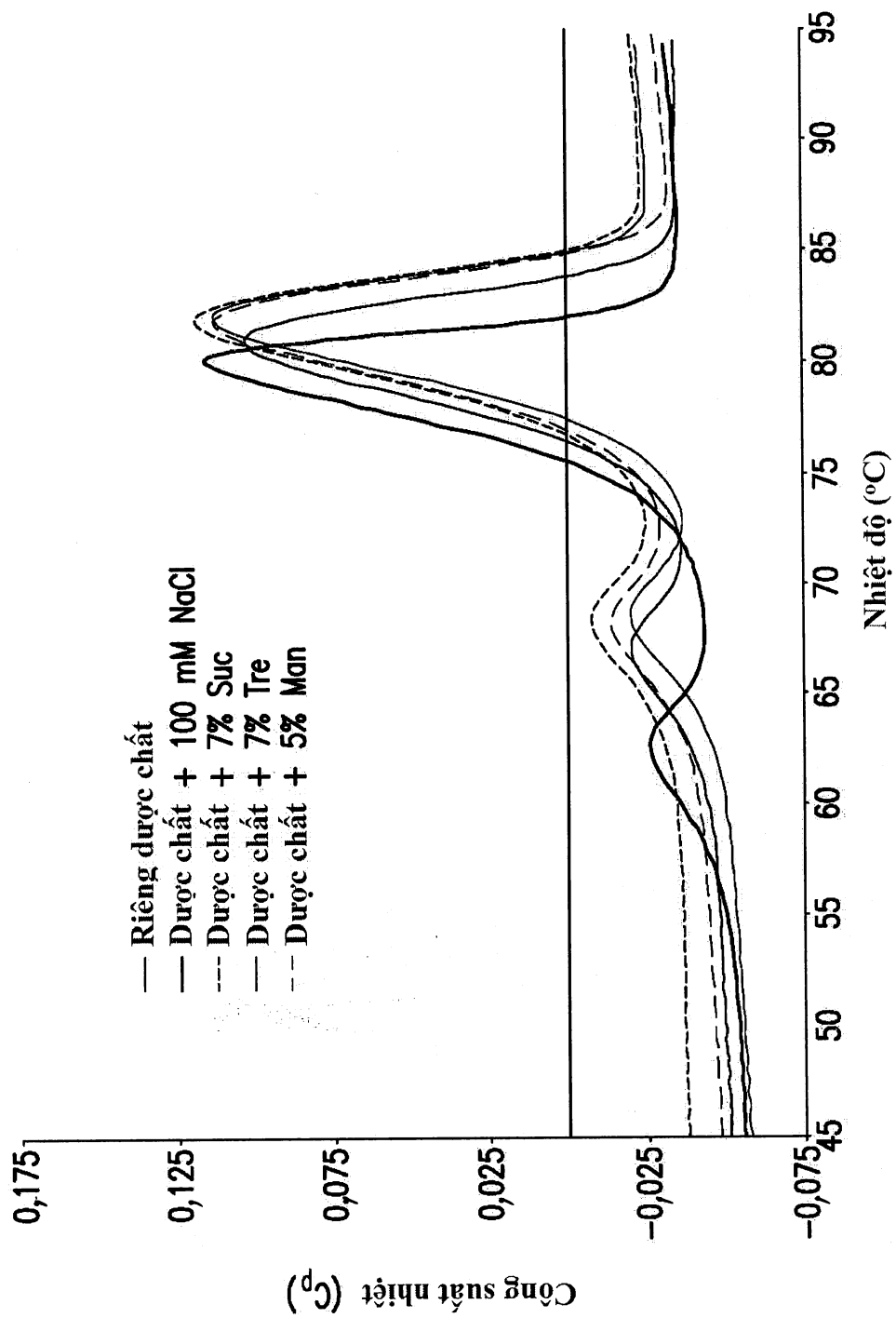


FIG.2A

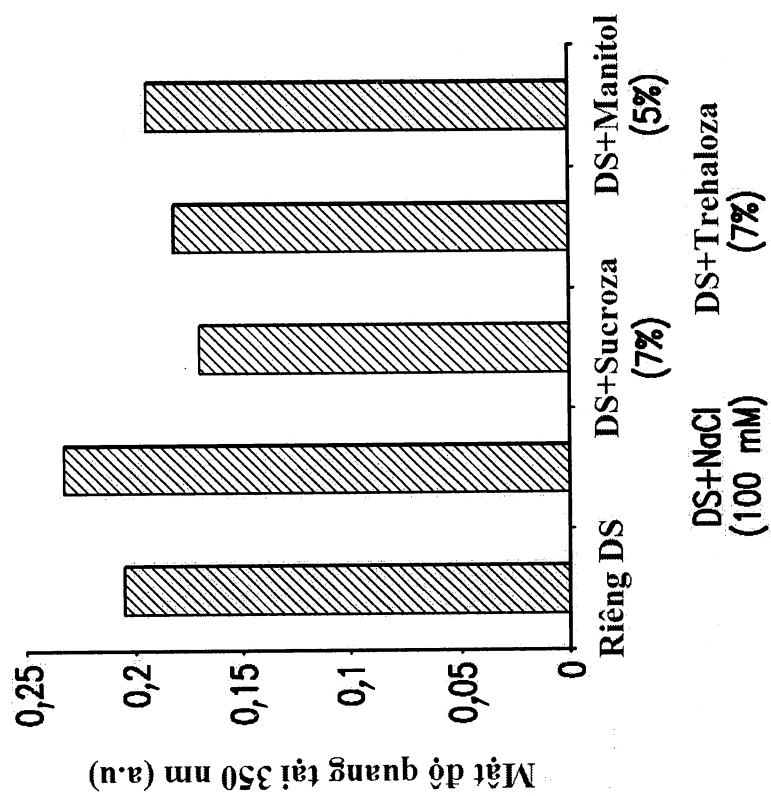
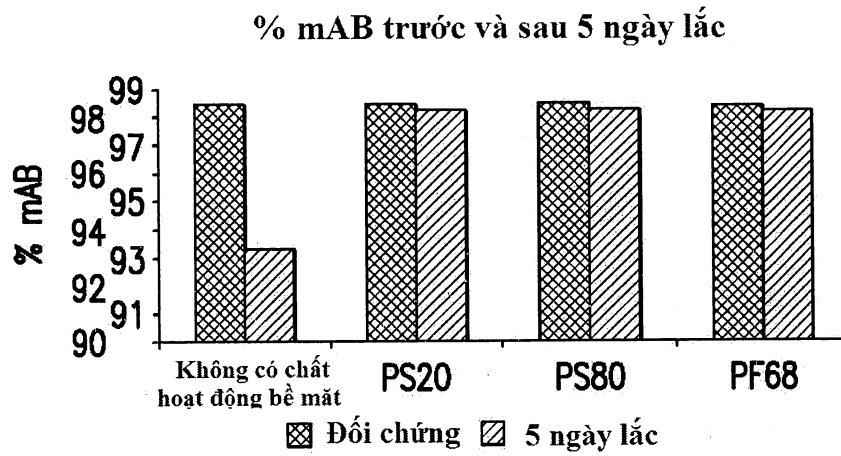
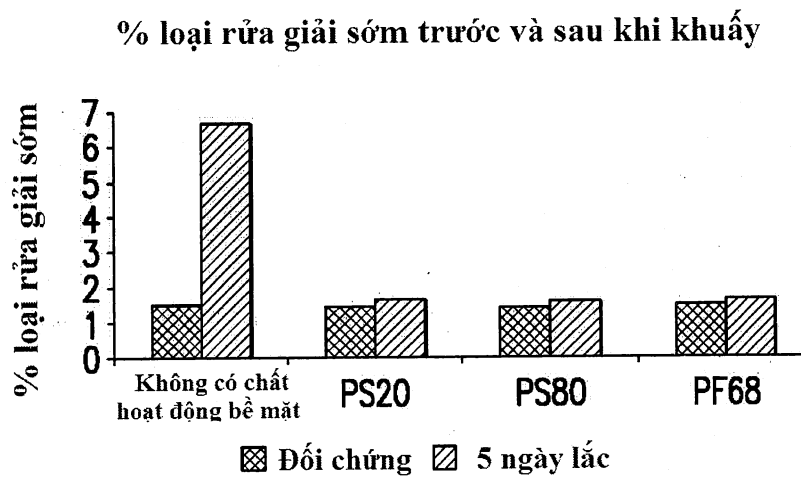


FIG.2B

14/46

**FIG.3A****FIG.3B**

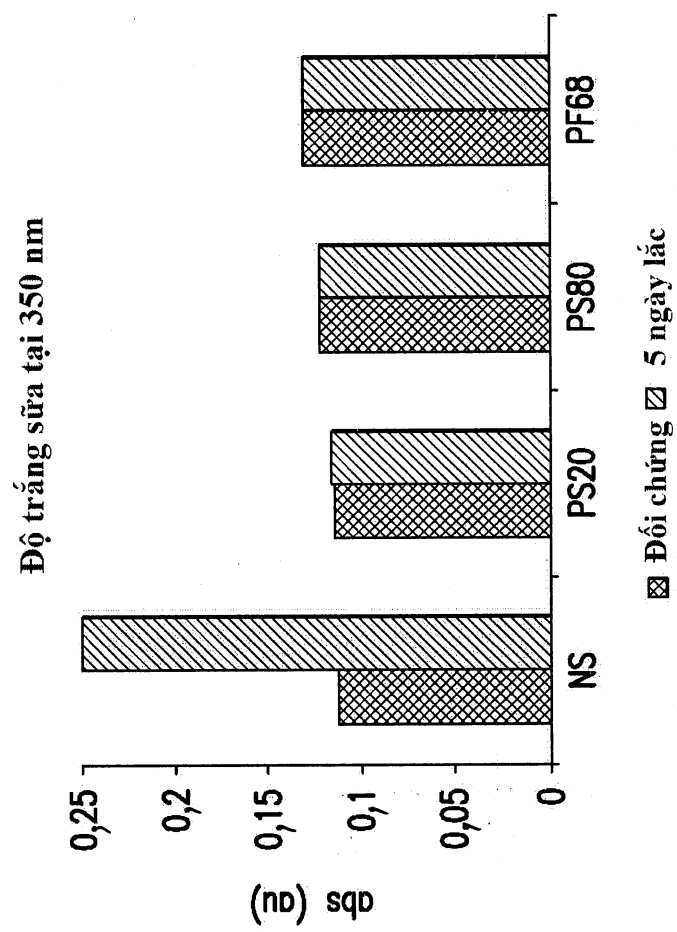


FIG.3C

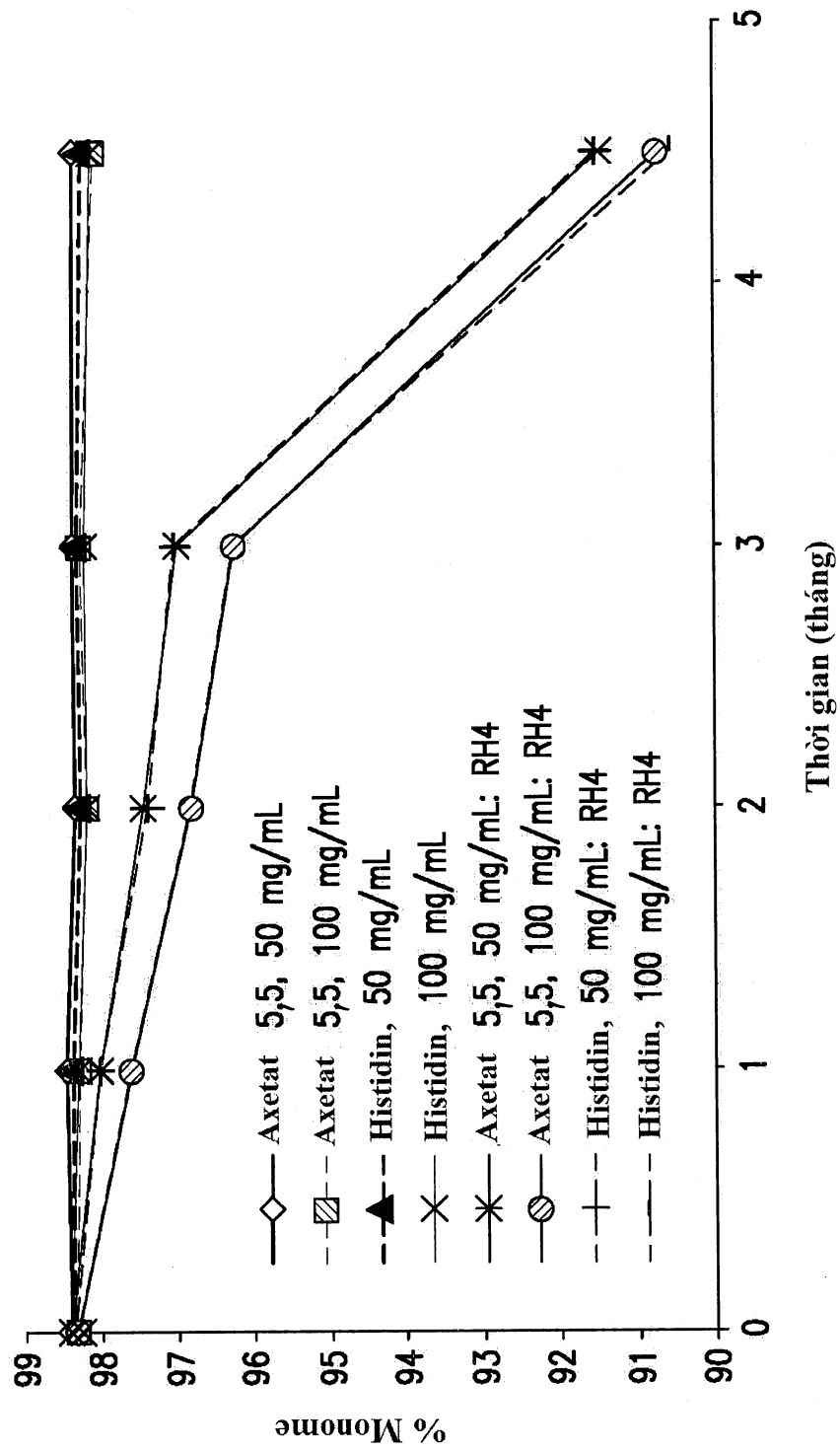


FIG.4A

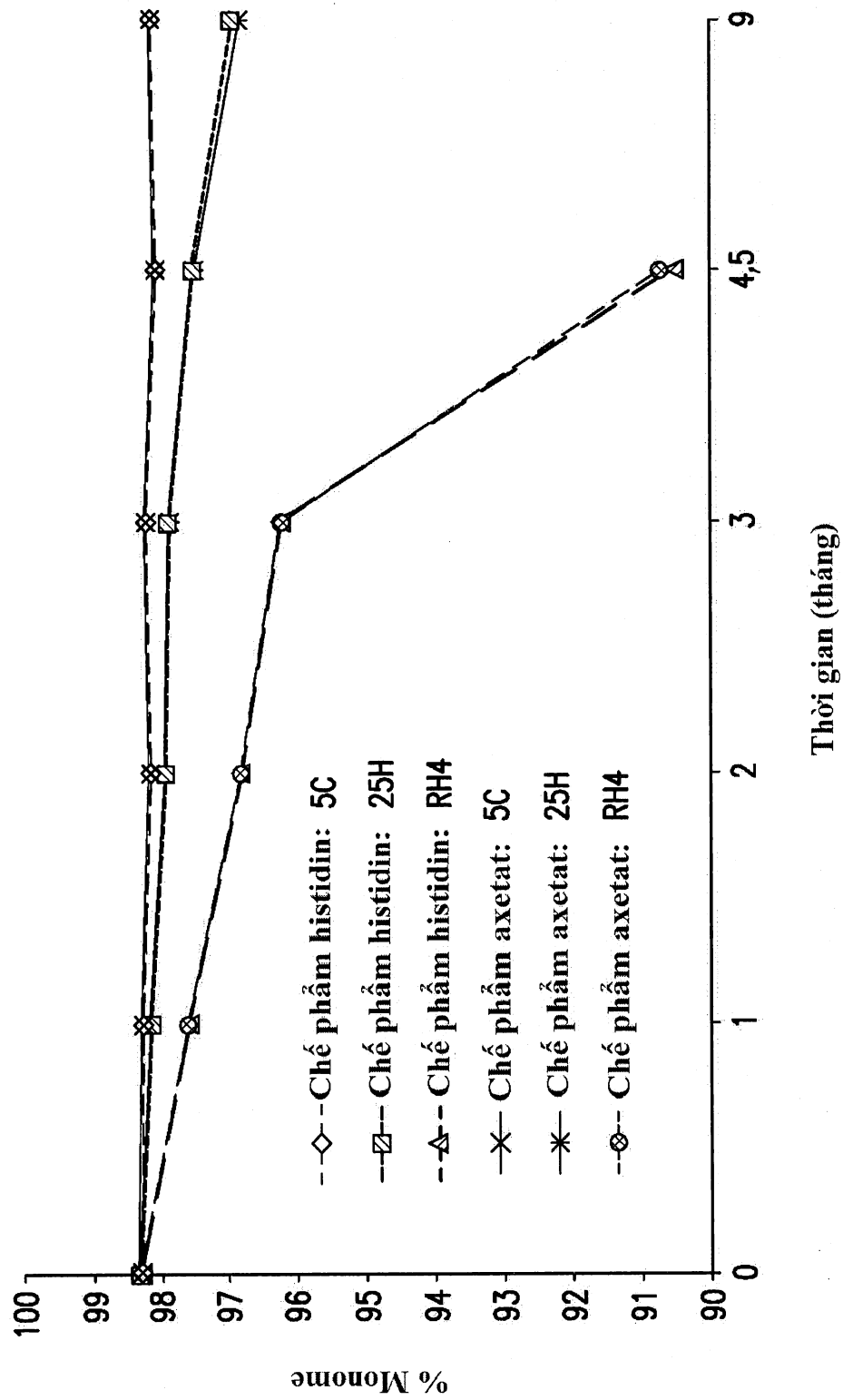


FIG.4B

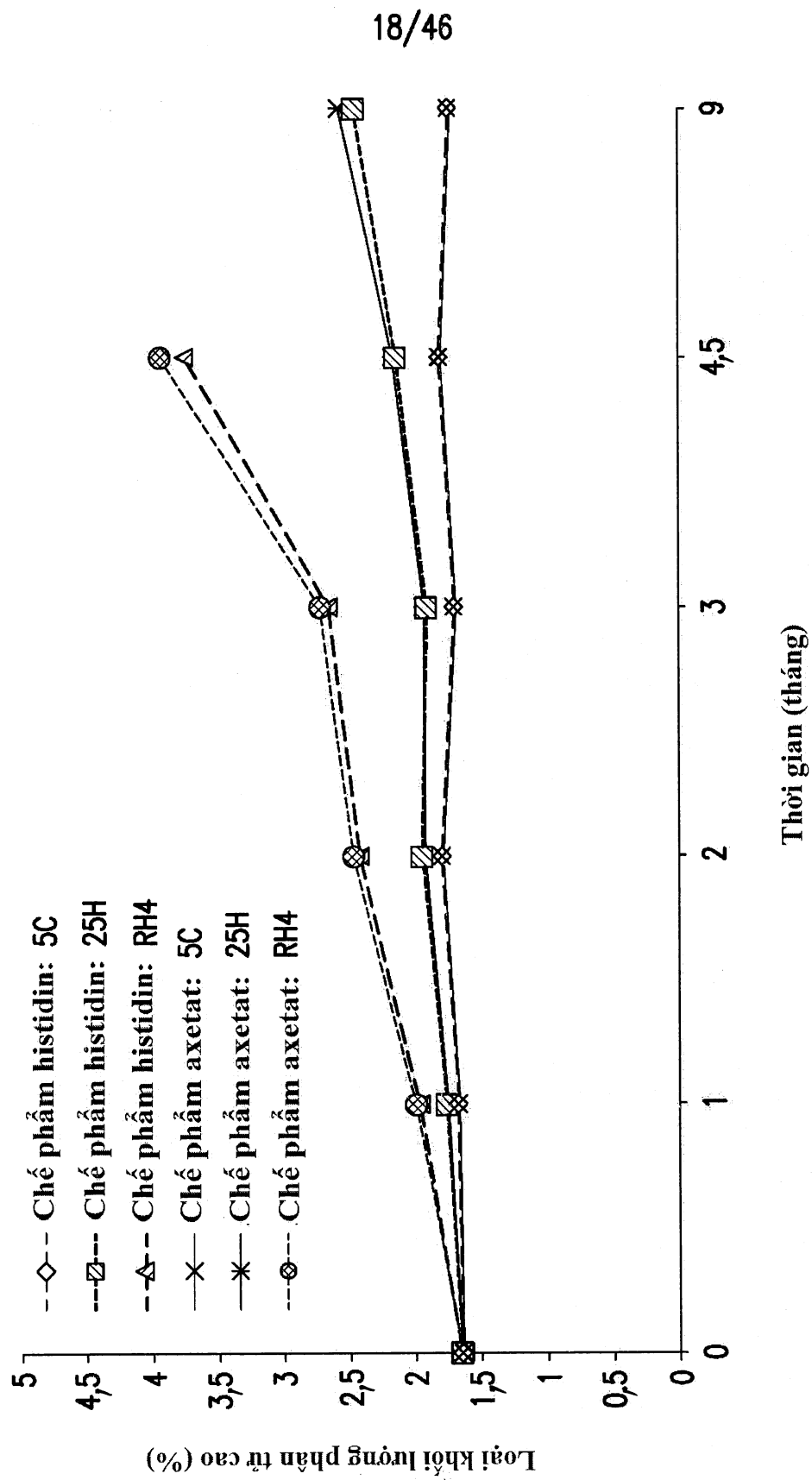


FIG.4C

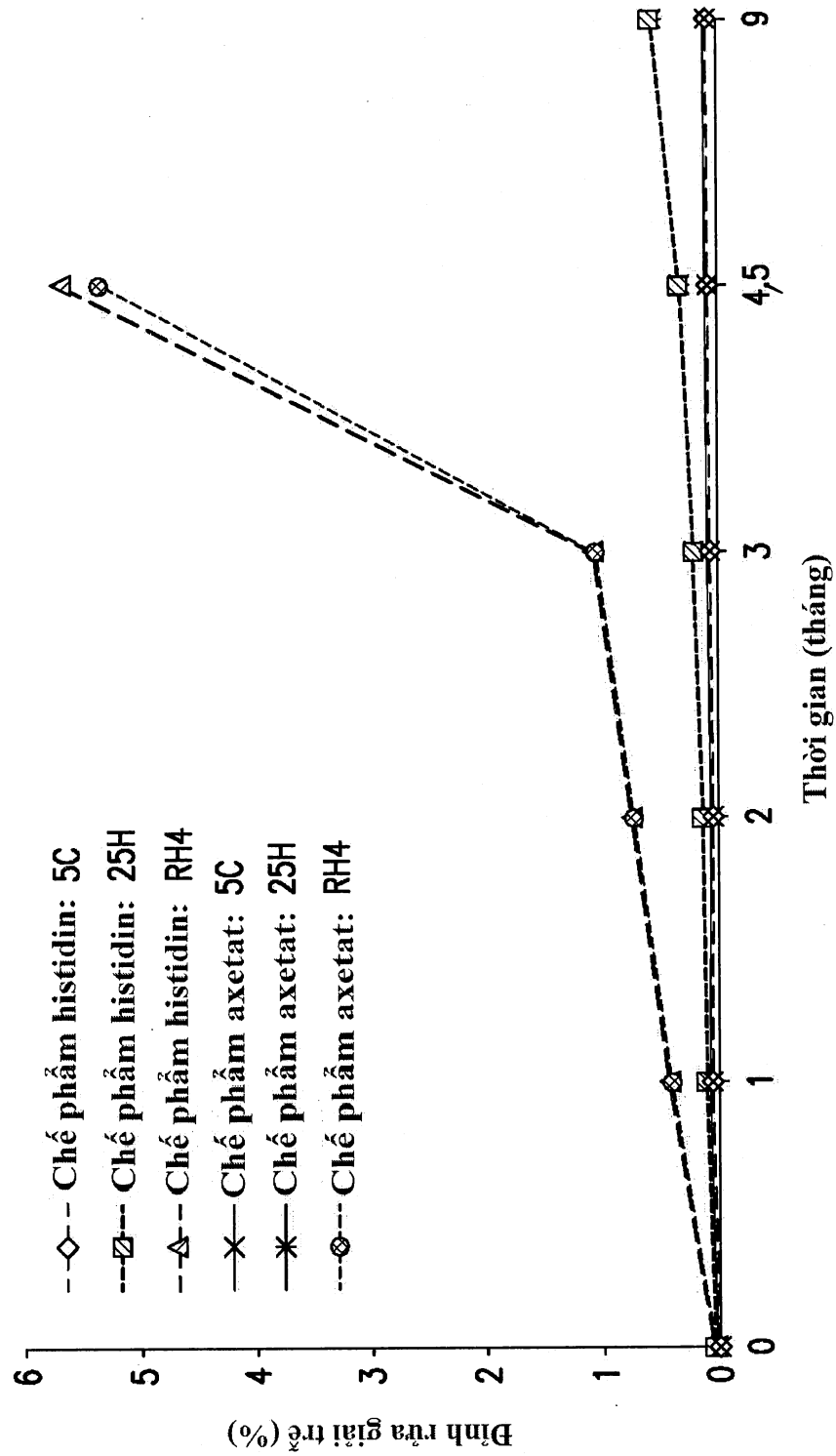


FIG.4D

20/46

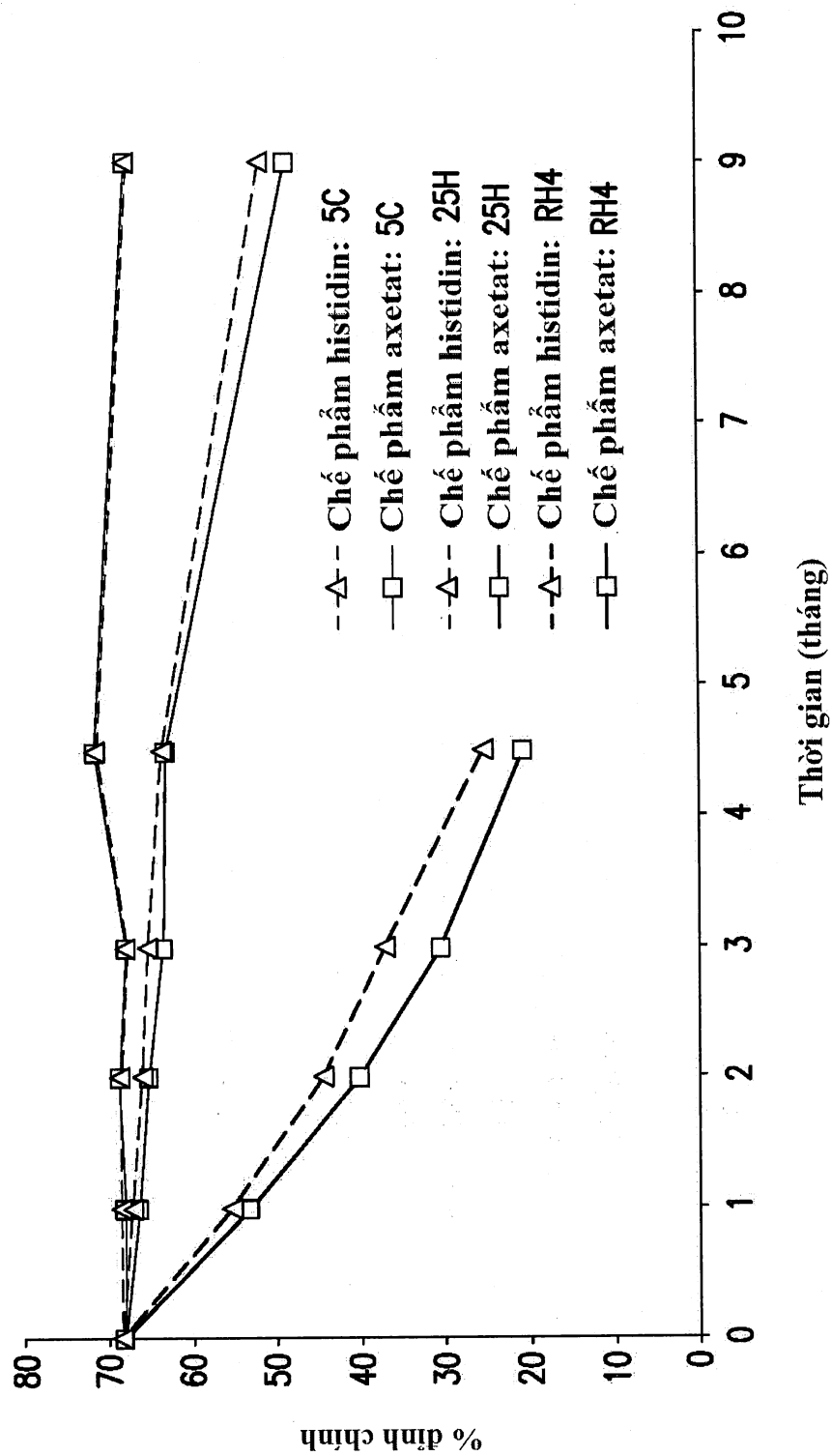


FIG.4E

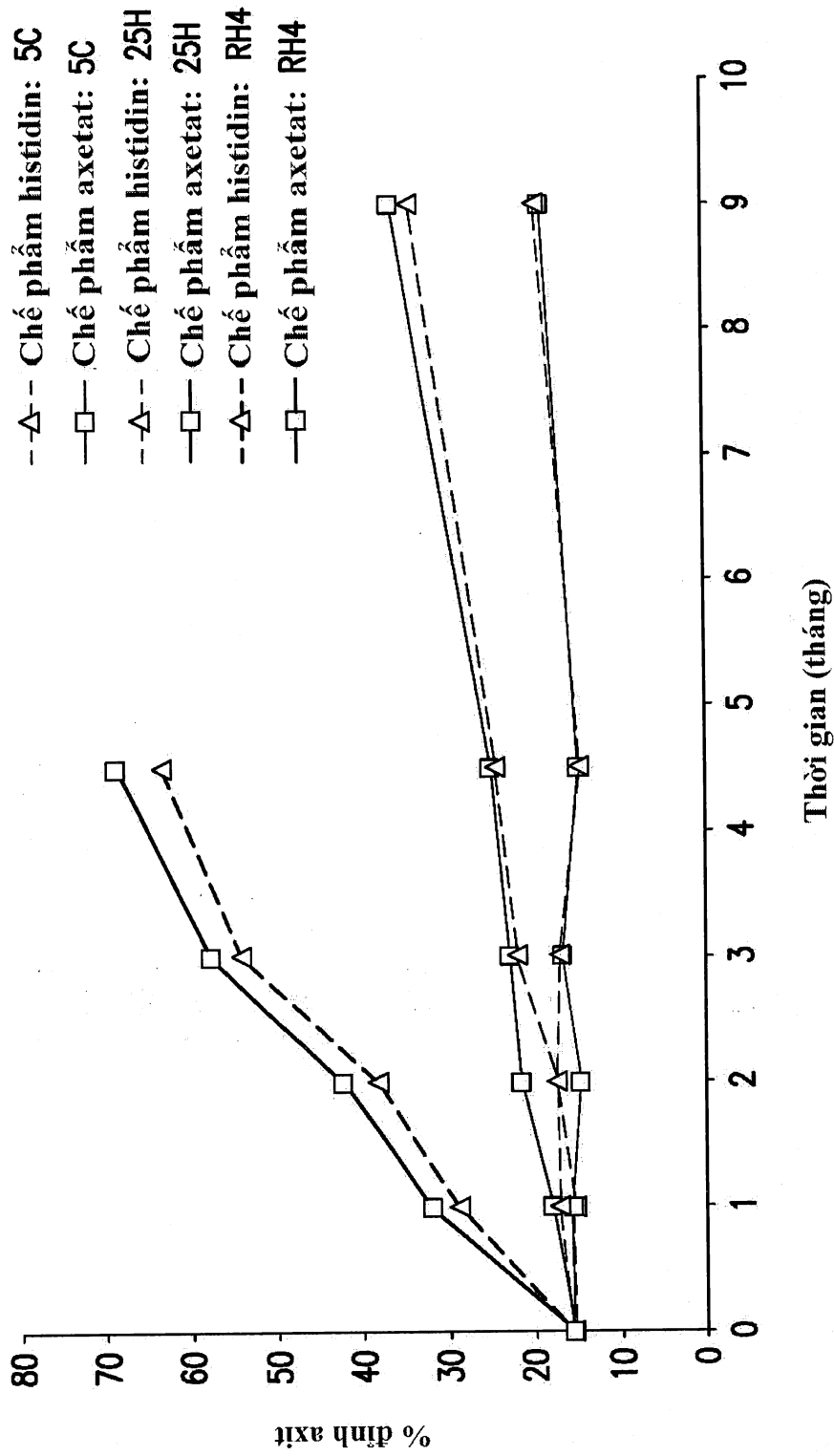


FIG.4F

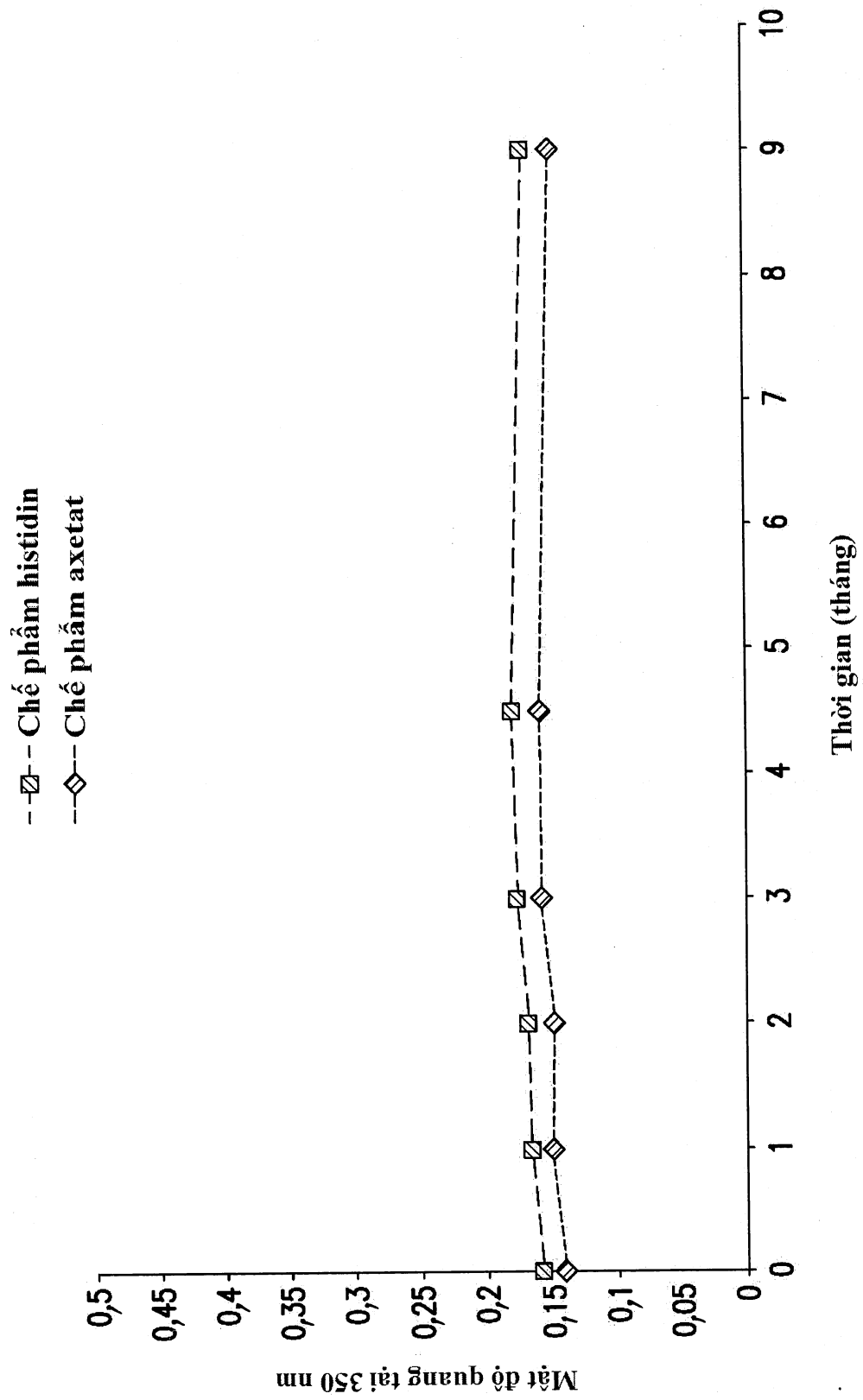


FIG.4G

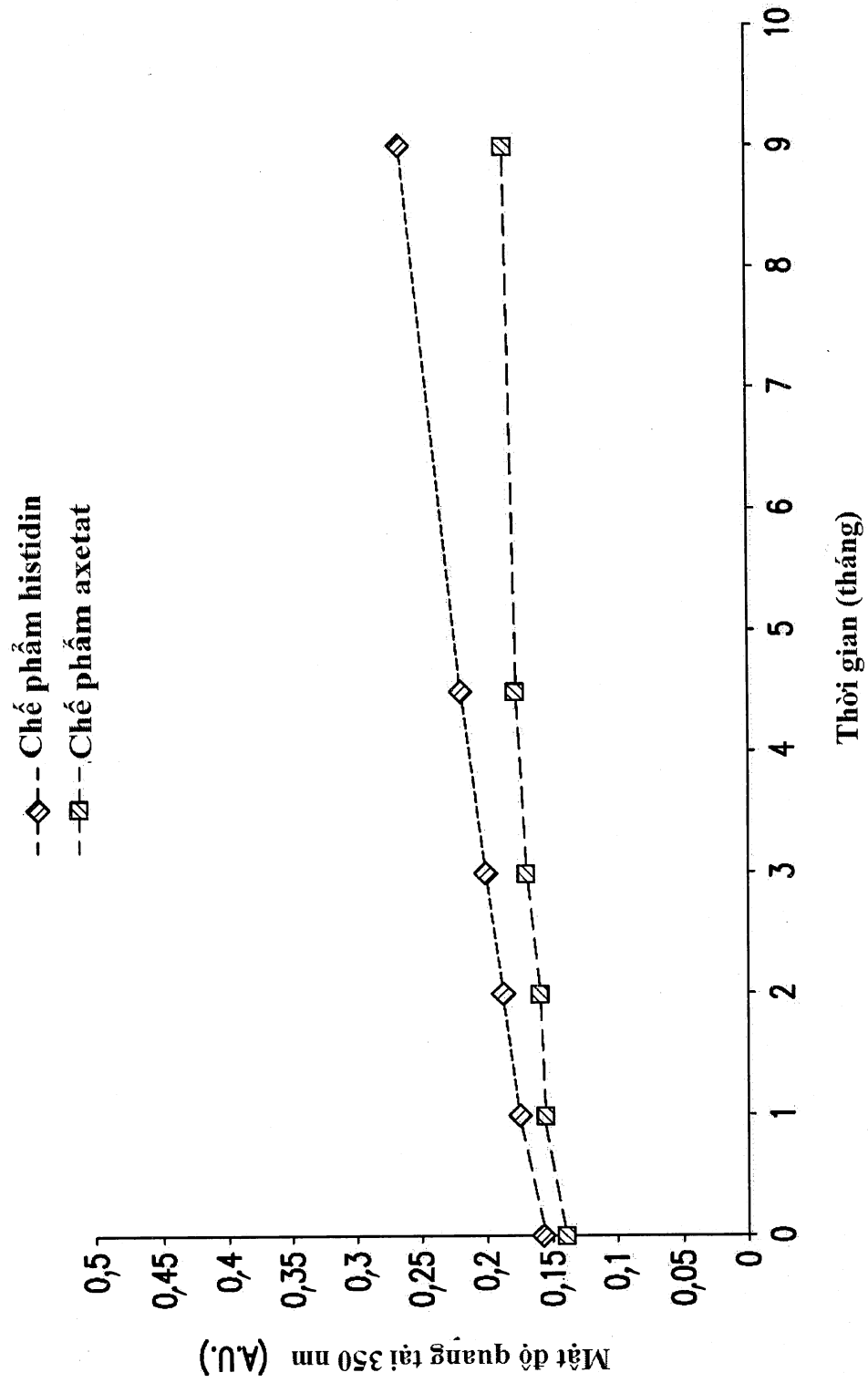


FIG.4H

24/46

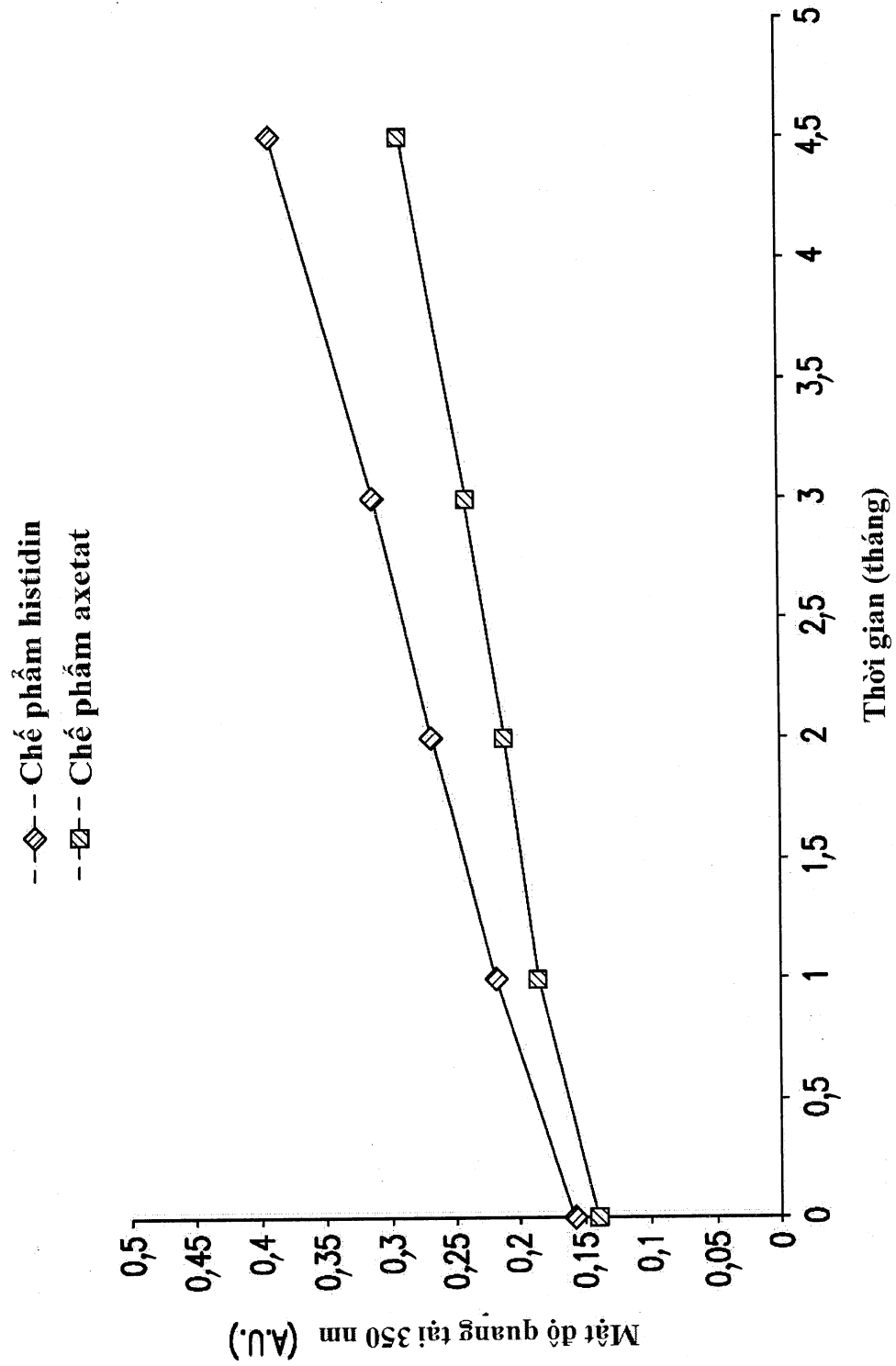


FIG.4I

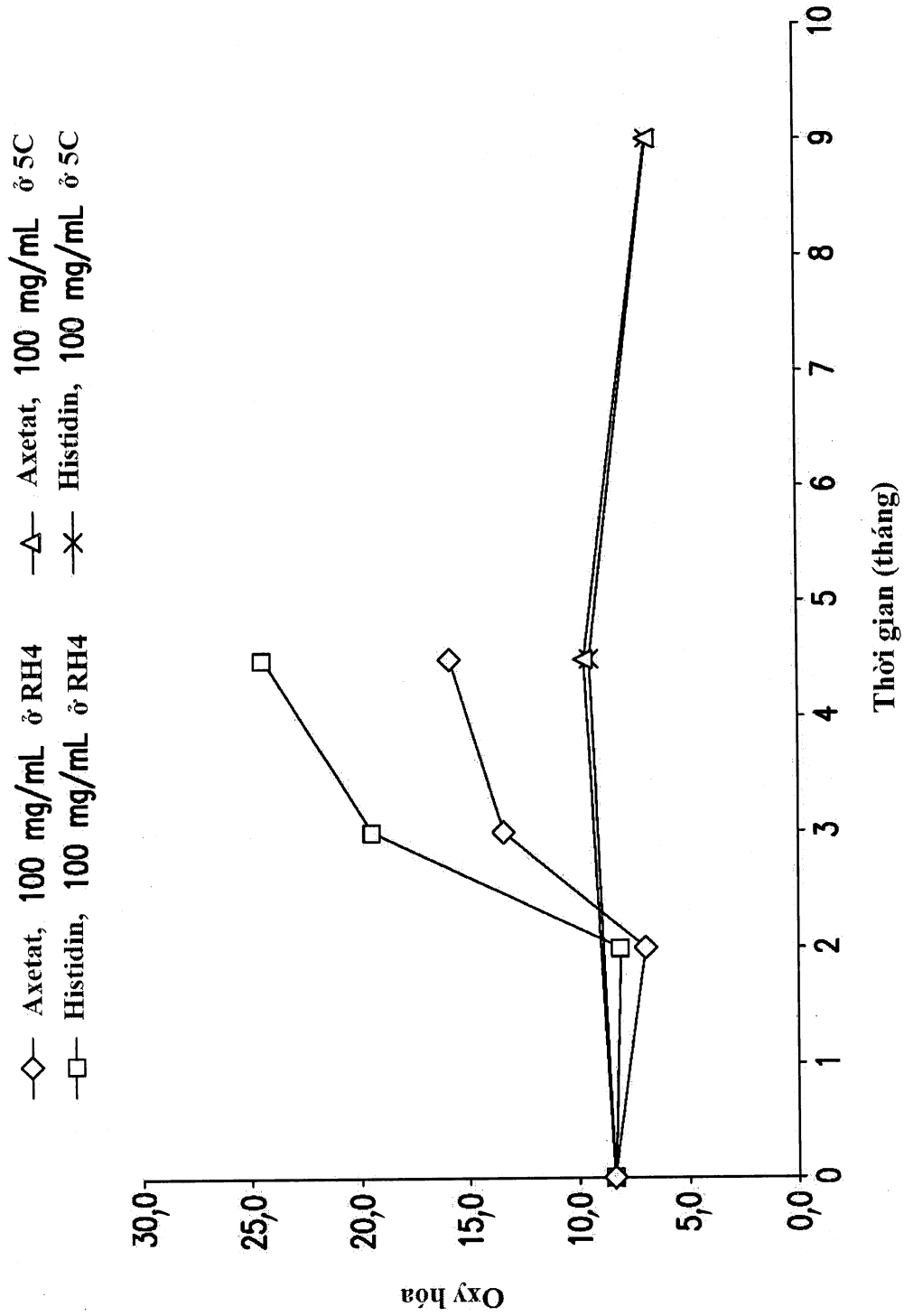


FIG.4J

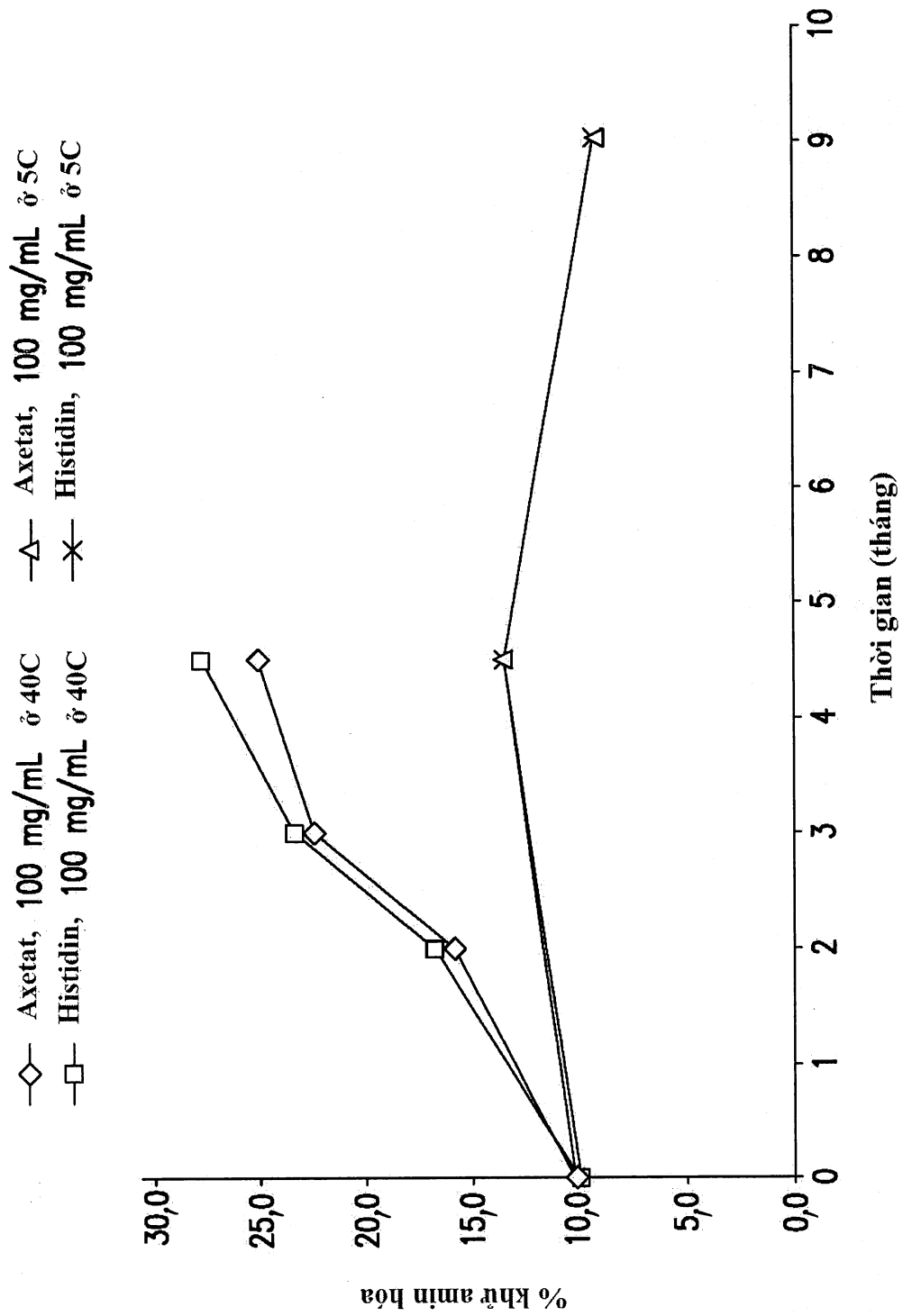


FIG.4K

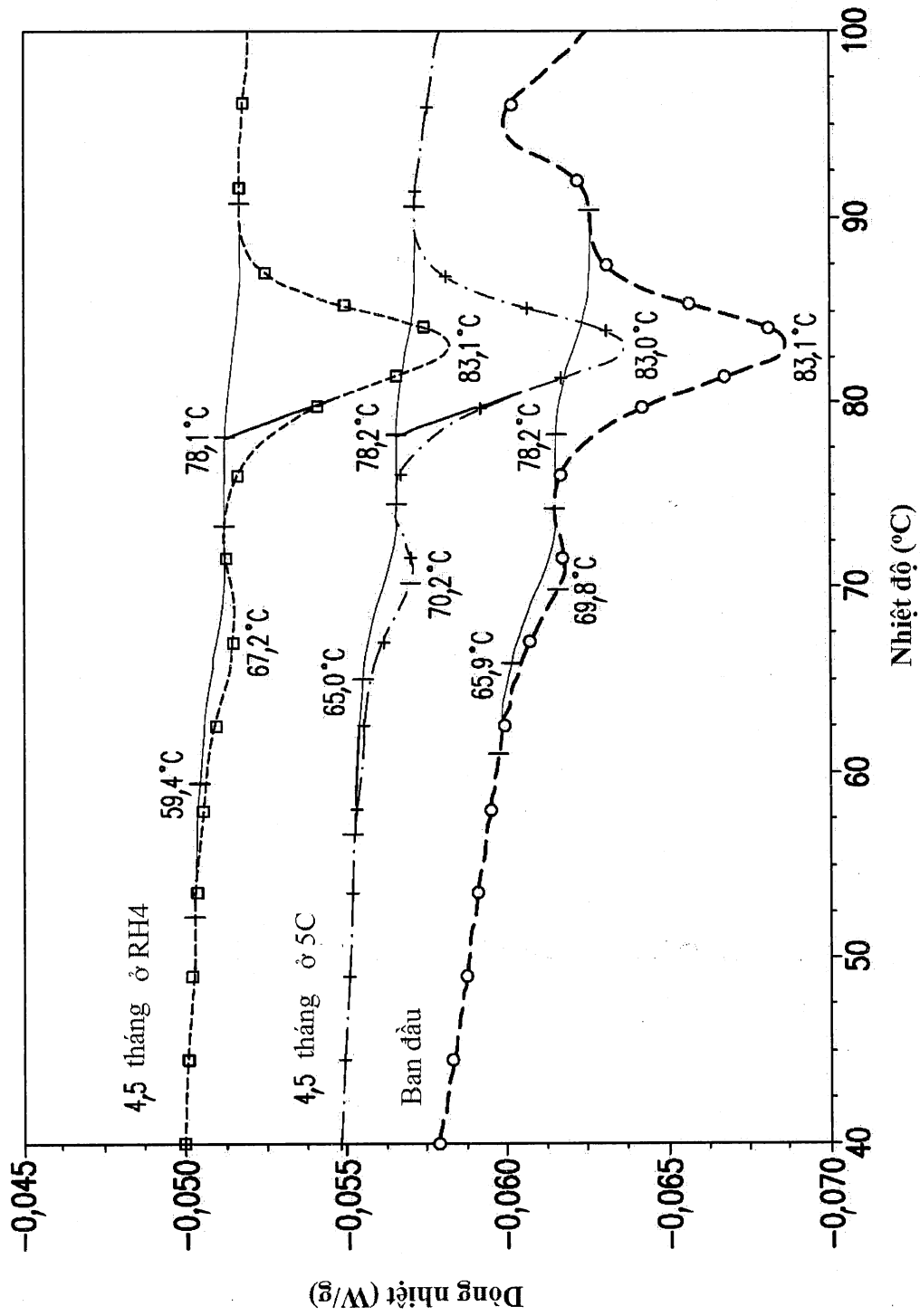


FIG.4L

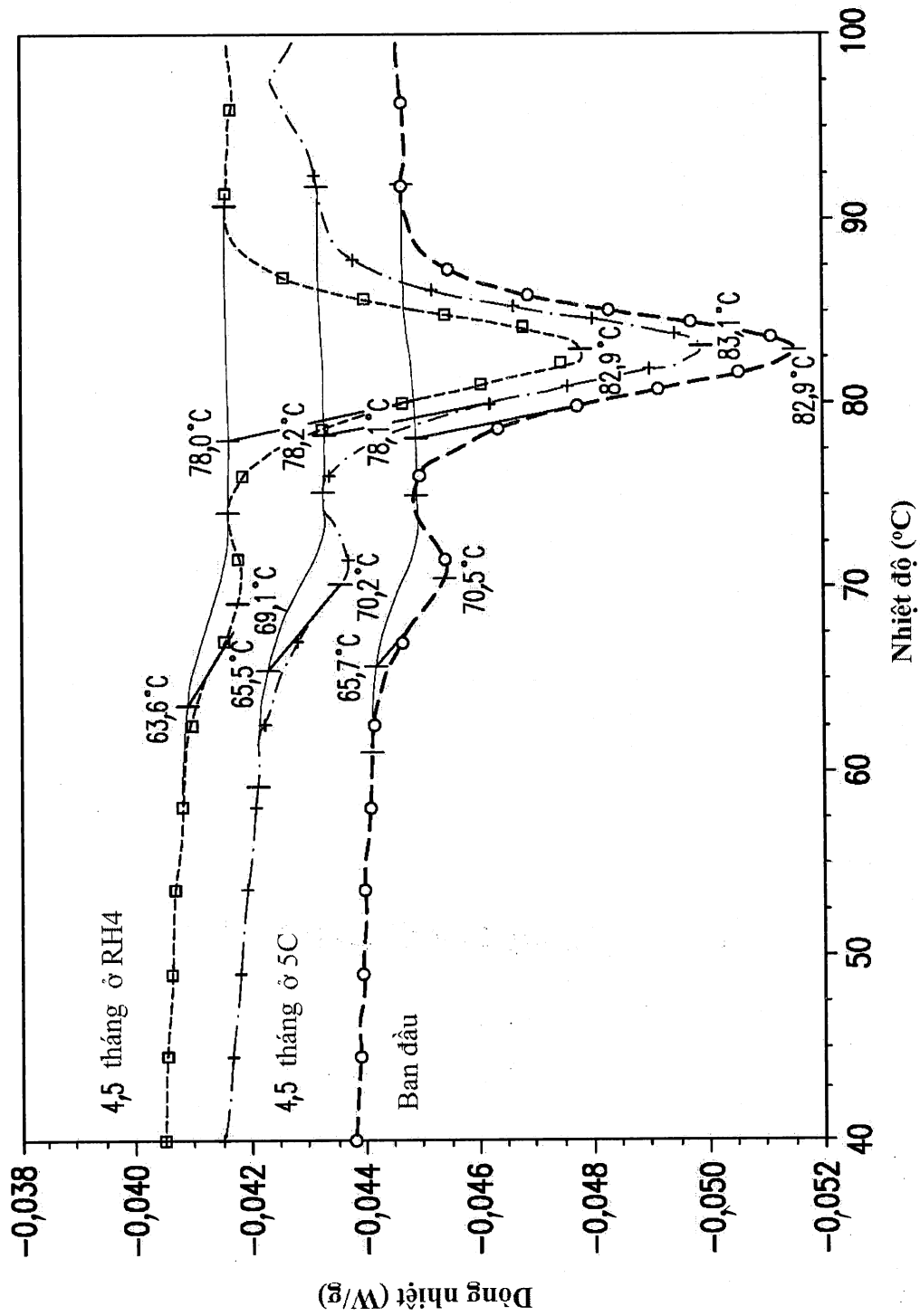


FIG.4M

29/46

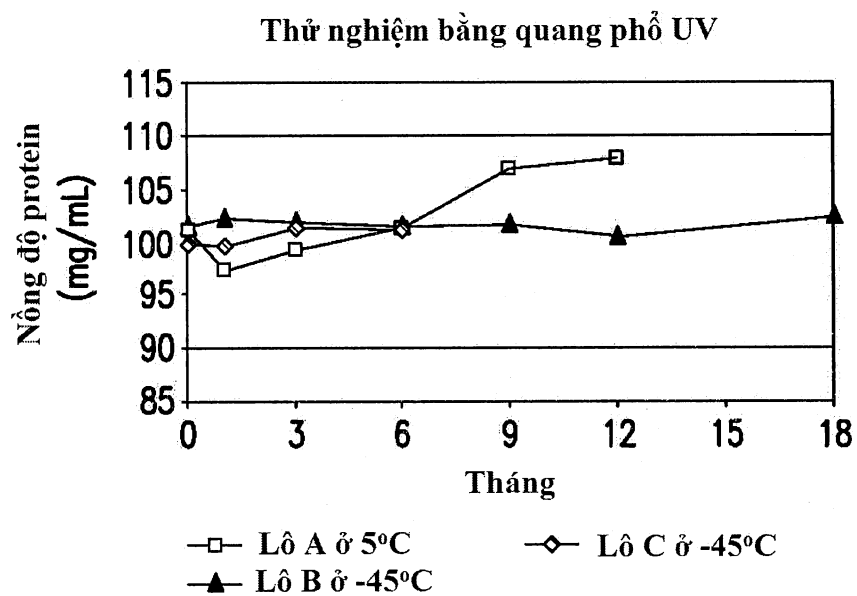


FIG.5A

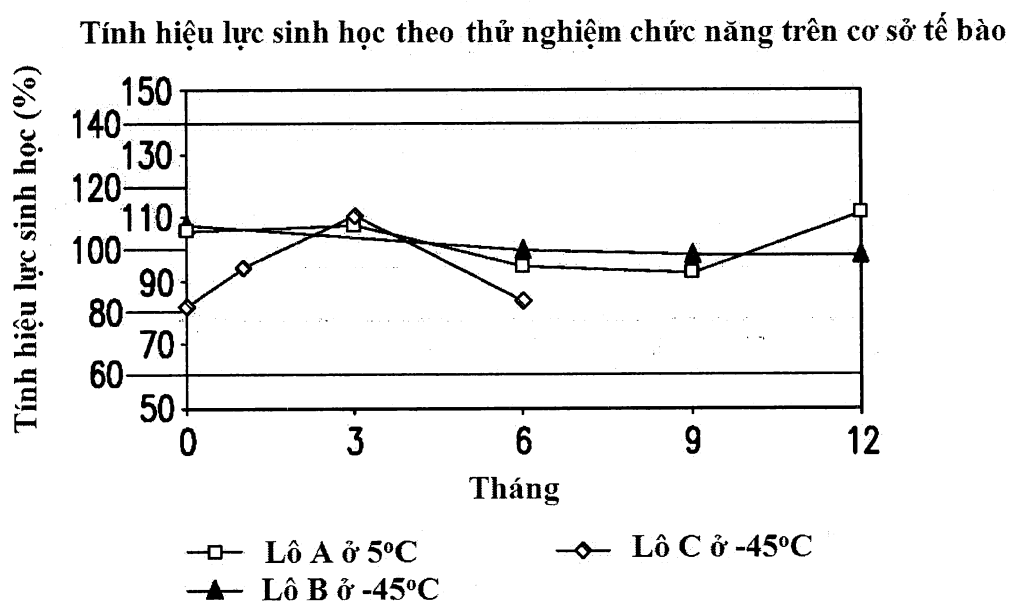


FIG.5B

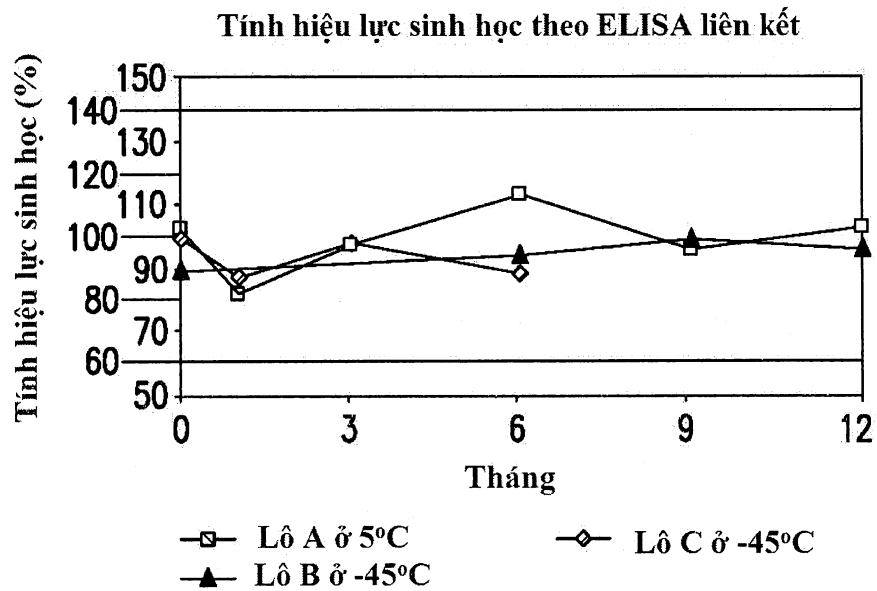


FIG.5C

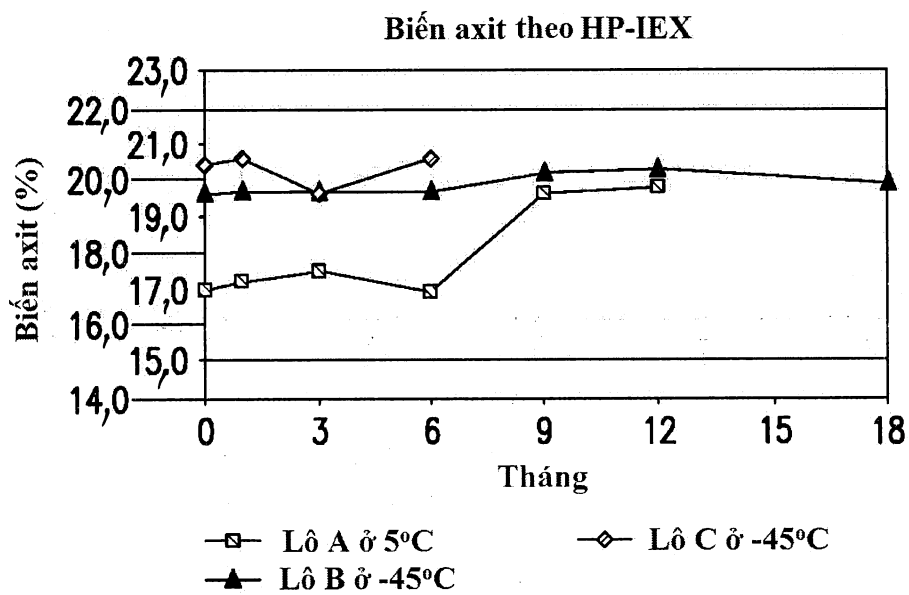


FIG.5D

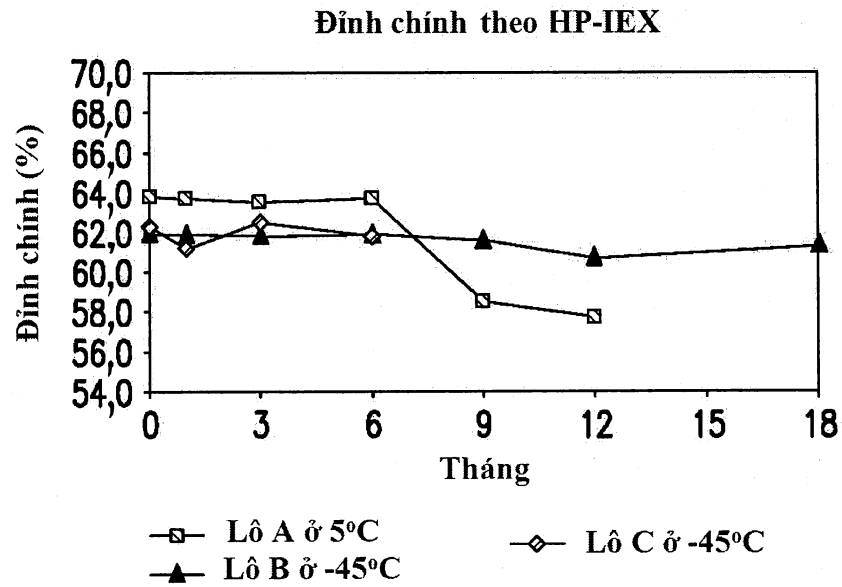


FIG.5E

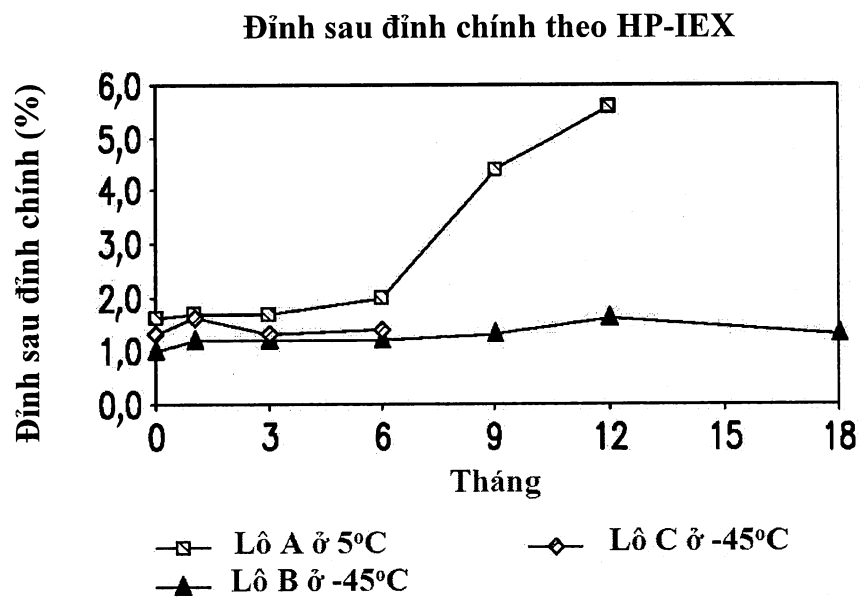


FIG.5F

32/46

Biến bazơ theo HP-IEX

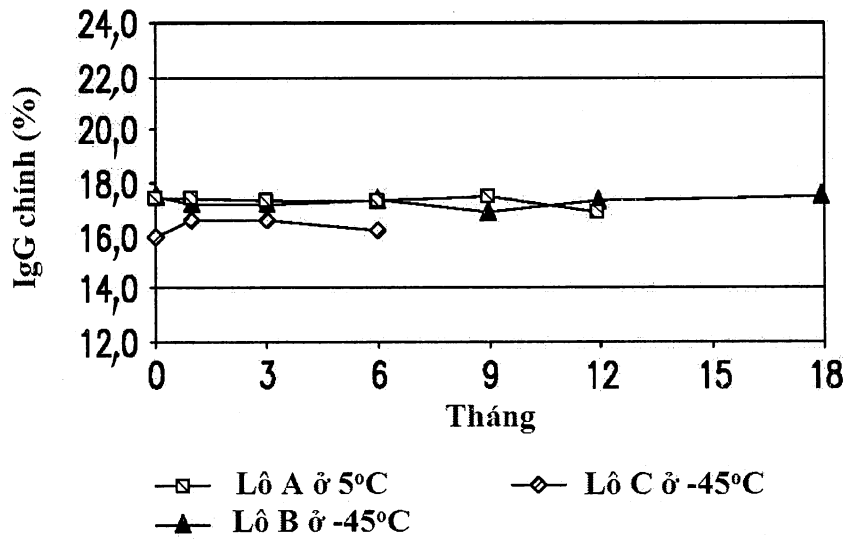


FIG.5G

Monome theo HP-SEC

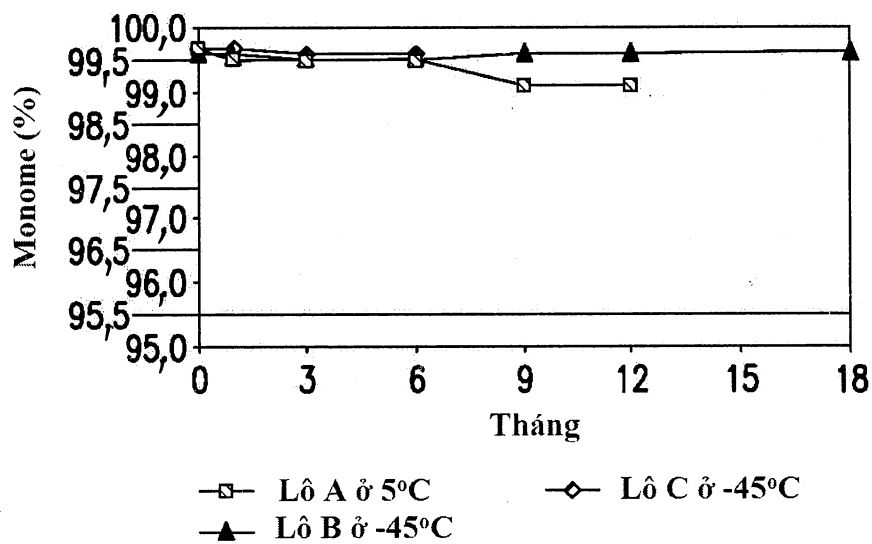


FIG.5H

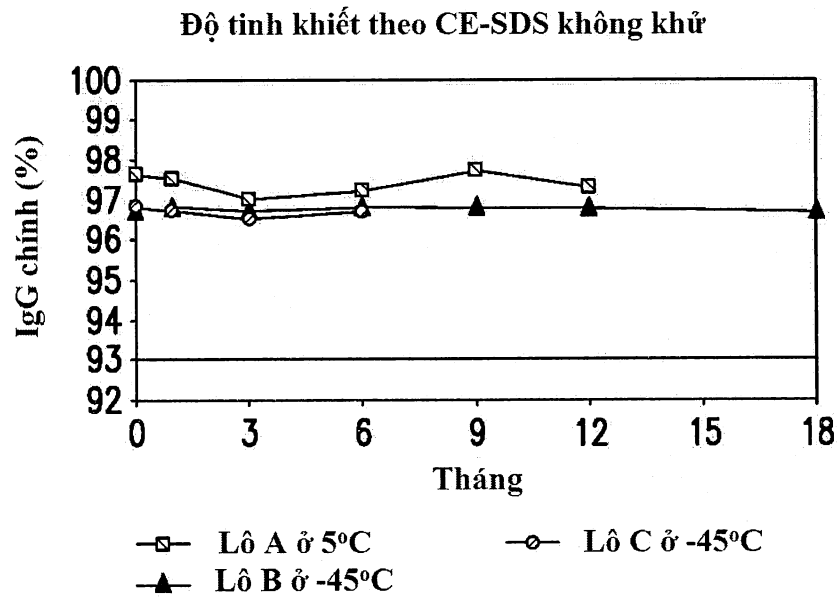


FIG.5I

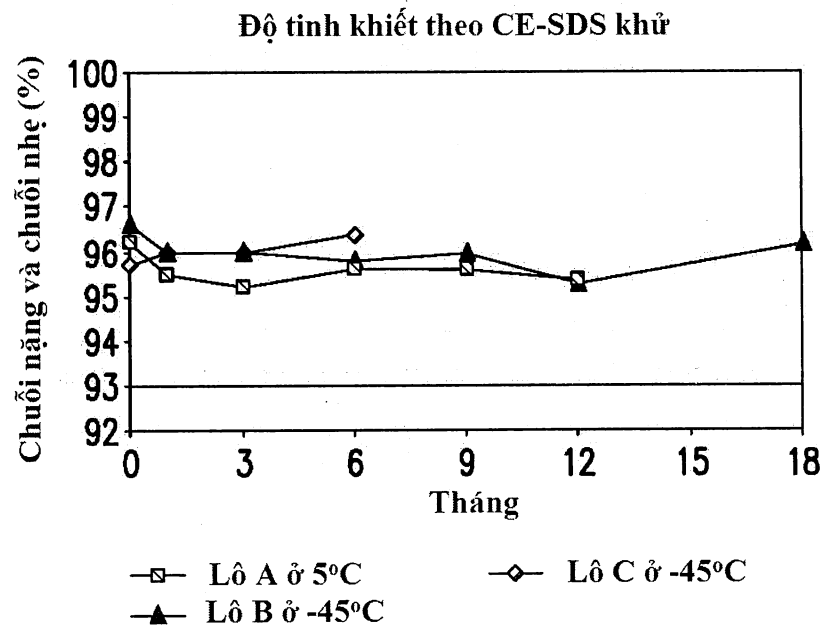


FIG.5J

34/46

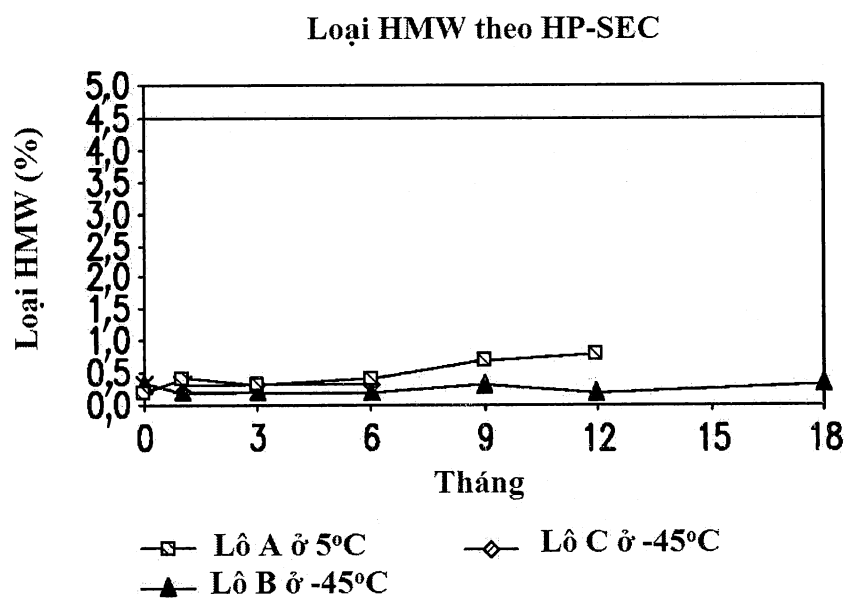


FIG.5K

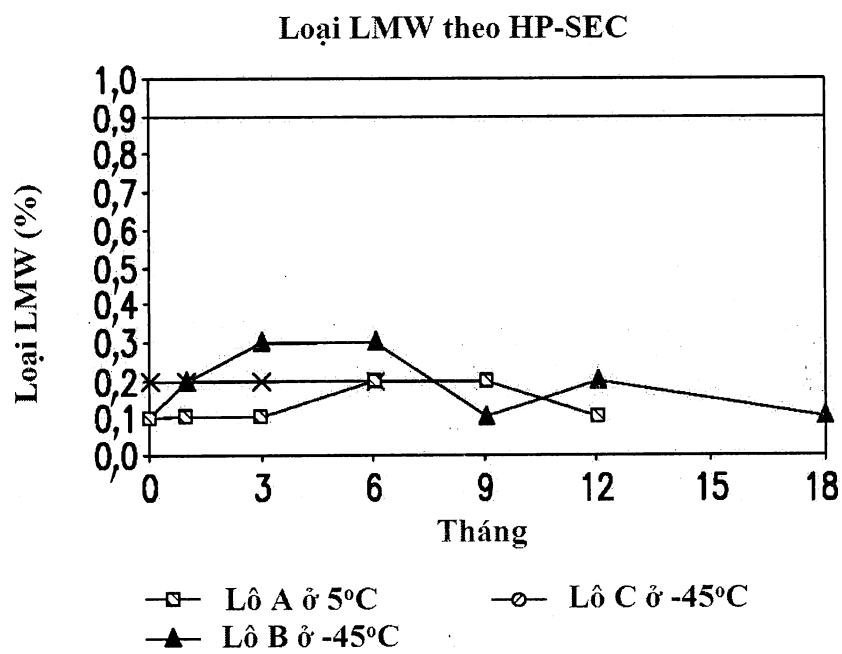


FIG.5L

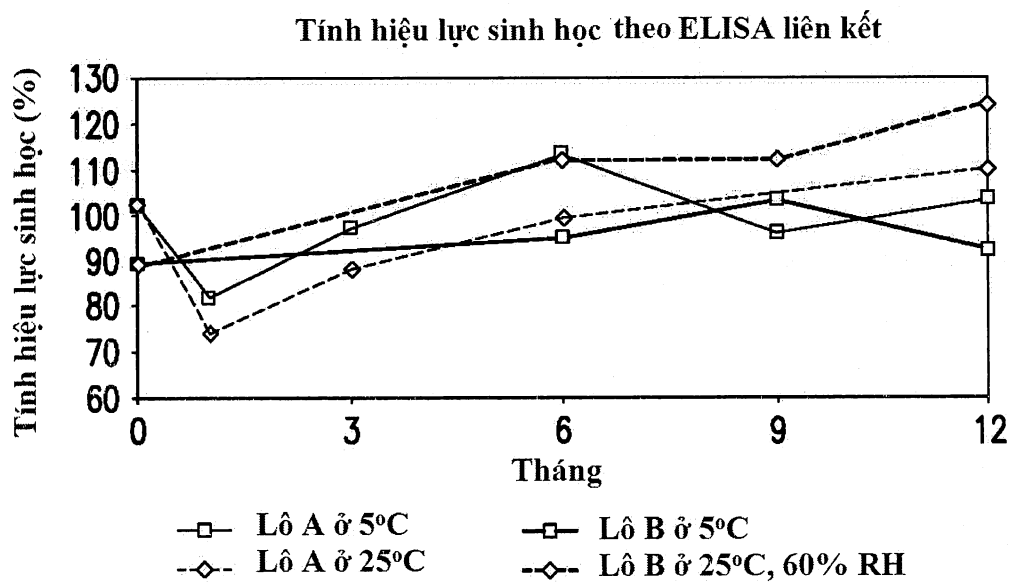


FIG.6A

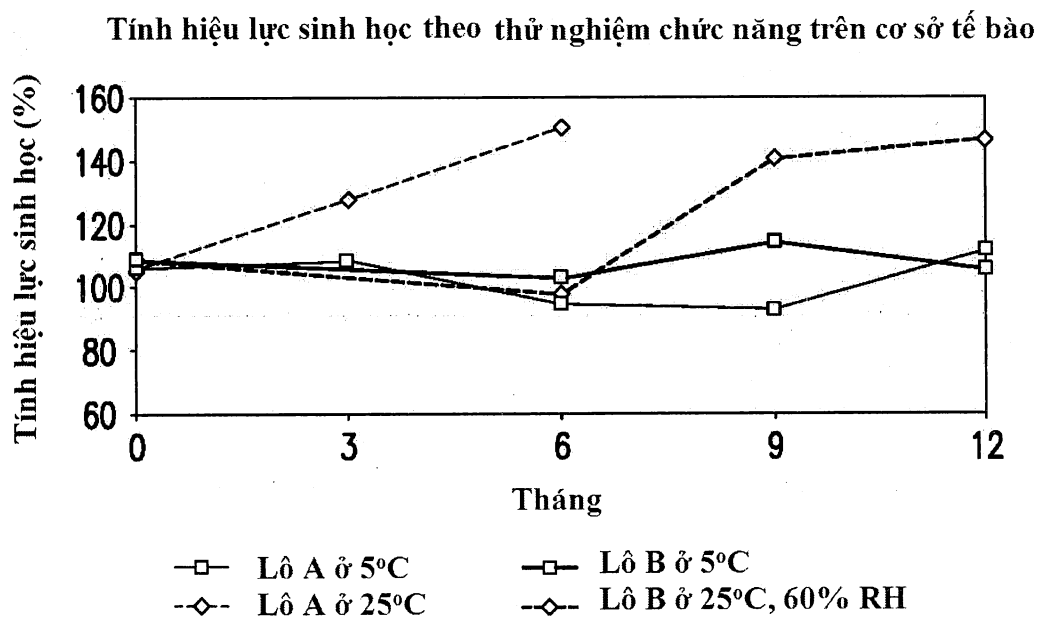


FIG.6B

36/46

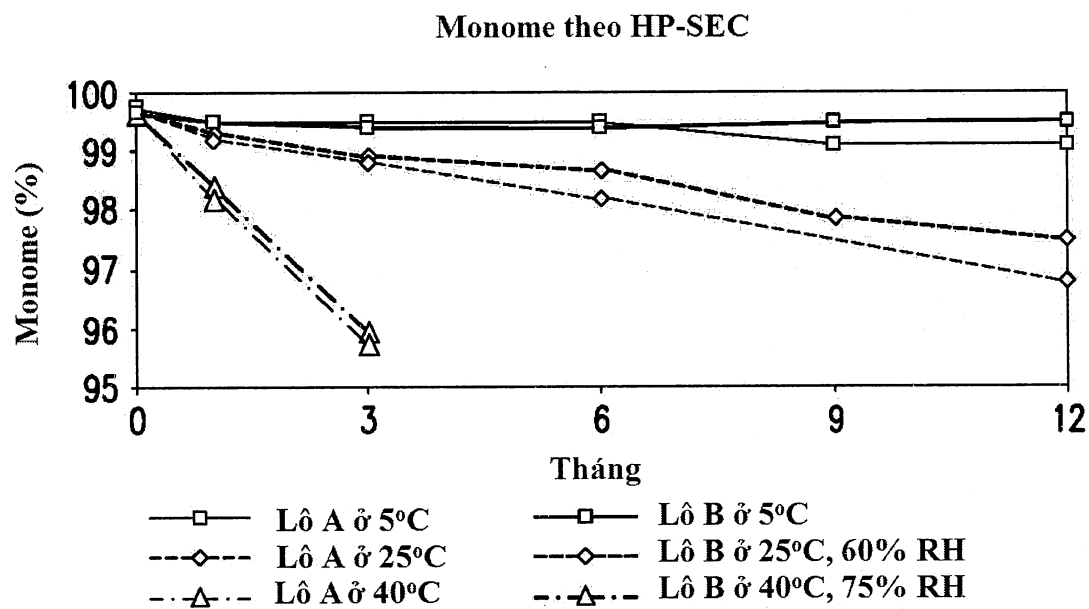


FIG.6C

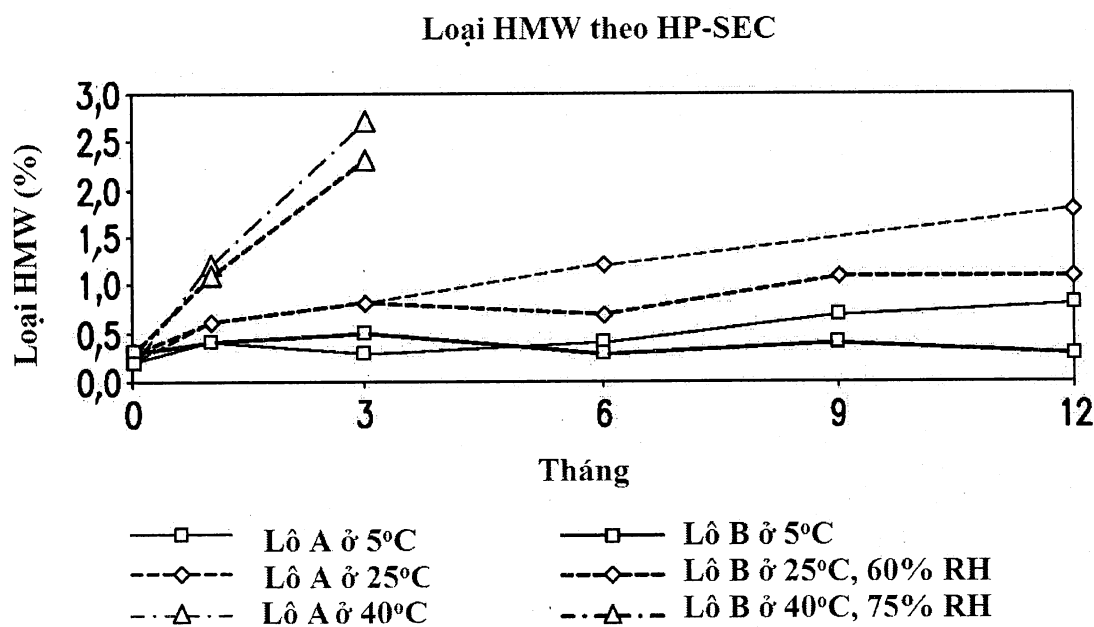


FIG.6D

37/46

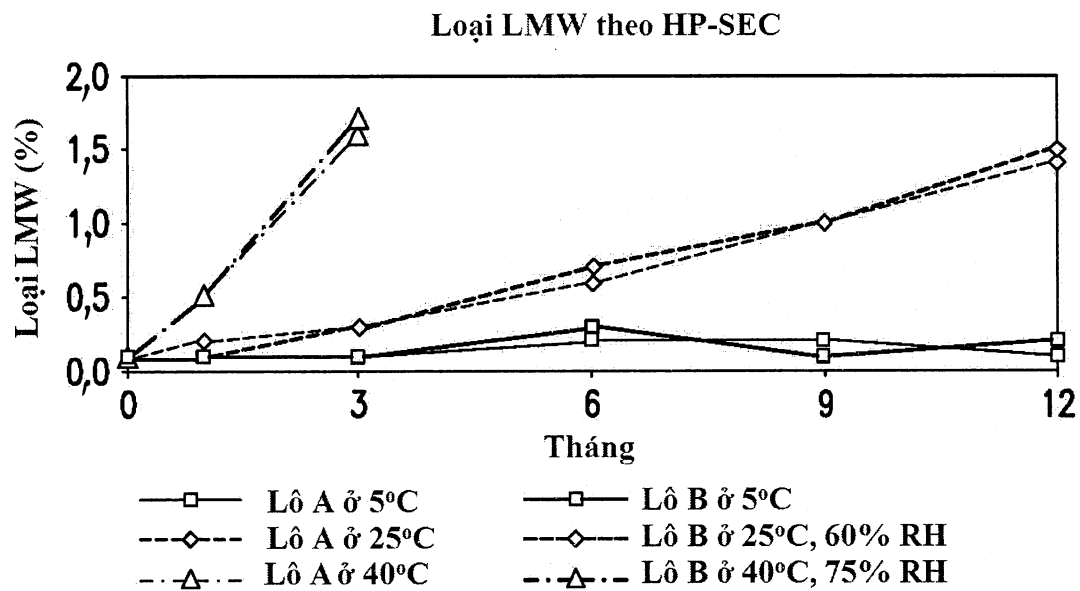


FIG.6E

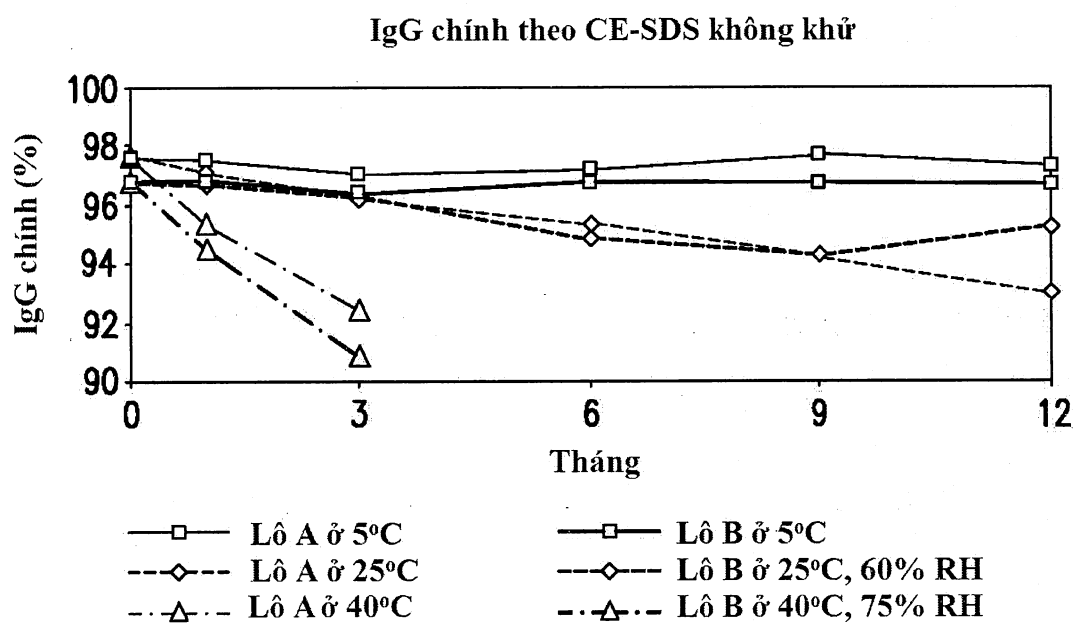


FIG.6F

38/46

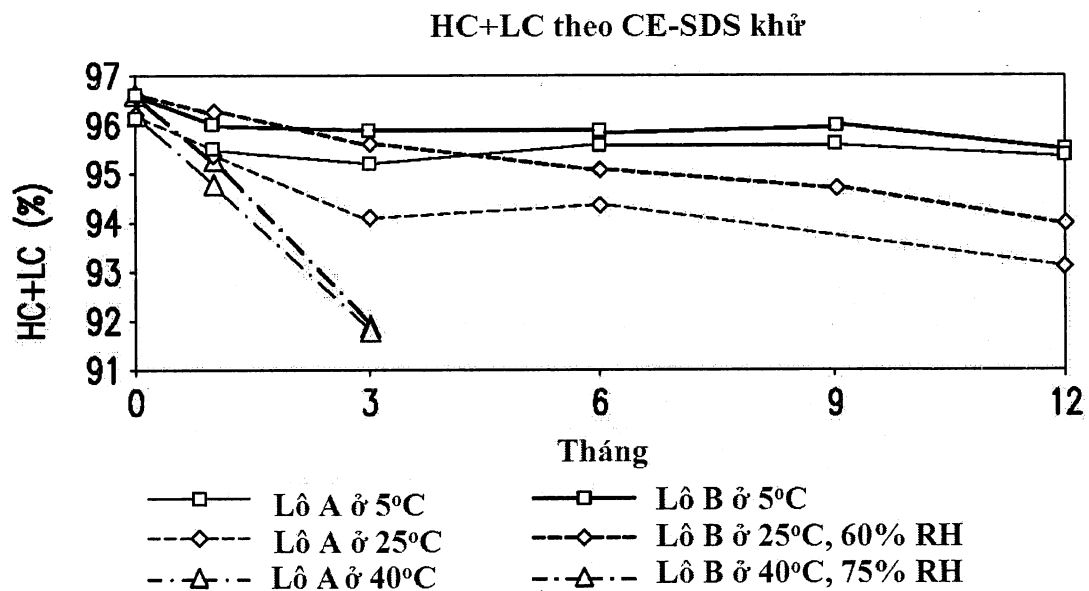


FIG.6G

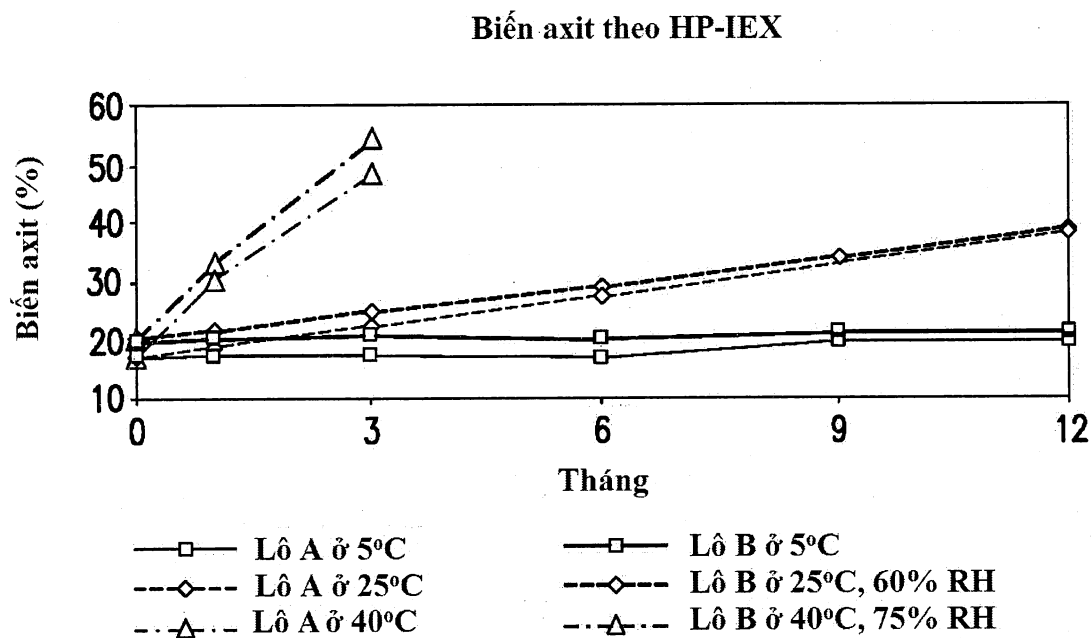


FIG.6H

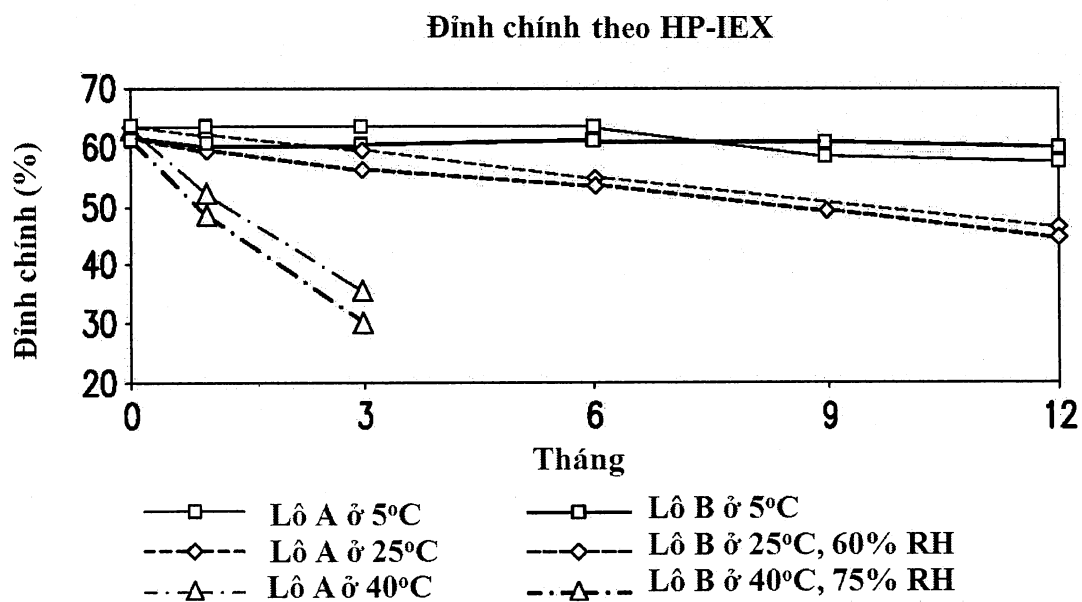


FIG.6I

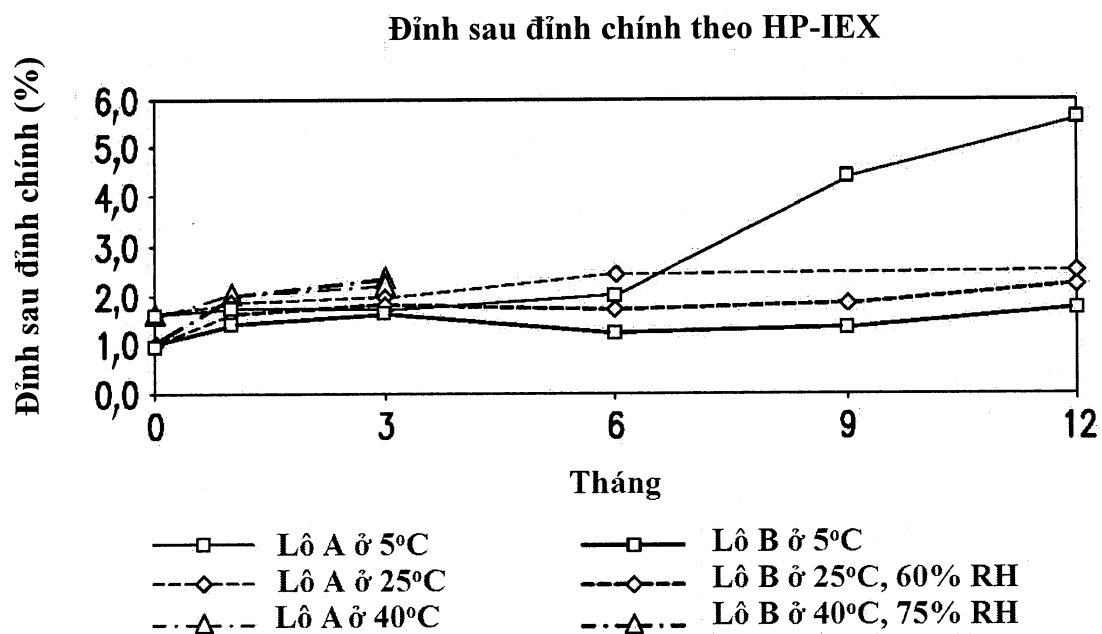
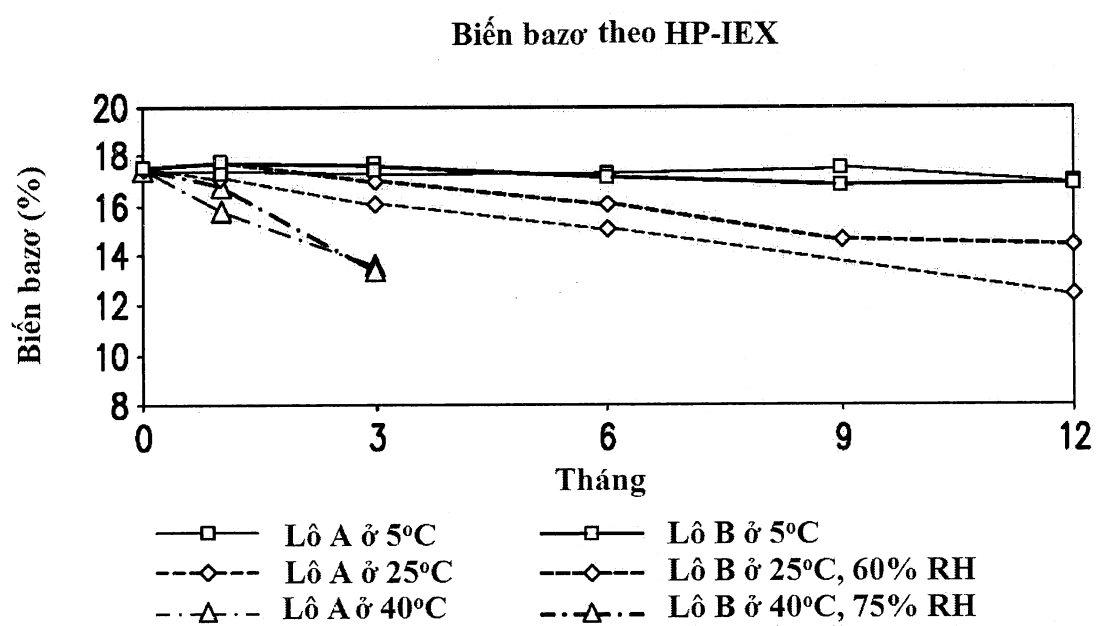


FIG.6J

**FIG.6K**

41/46

Thử nghiệm bằng quang phổ UV

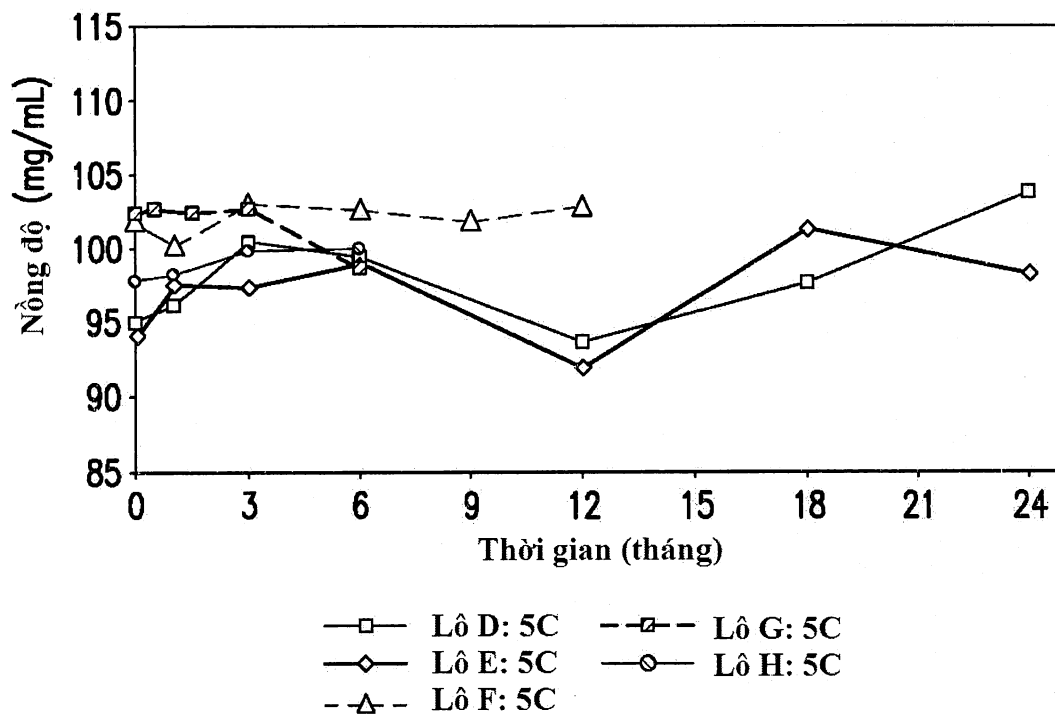


FIG.7A

Tính hiệu lực sinh học bằng thử nghiệm chức năng trên cơ sở tế bào

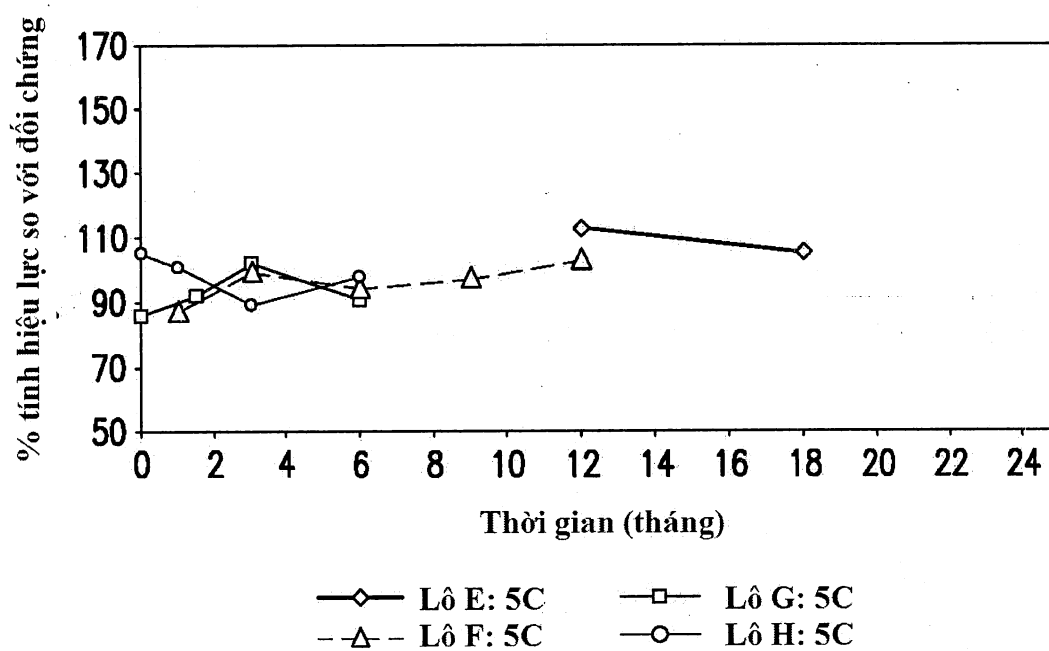


FIG.7B

42/46

Tính hiệu lực sinh học theo ELISA liên kết

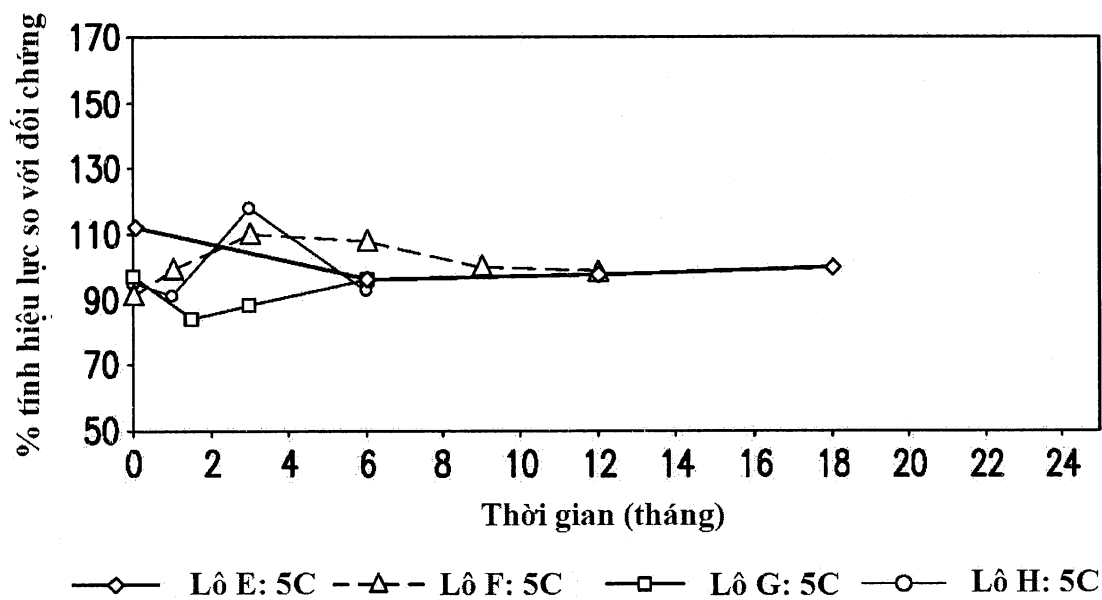


FIG.7C

Loại khối lượng phân tử cao HP-SEC

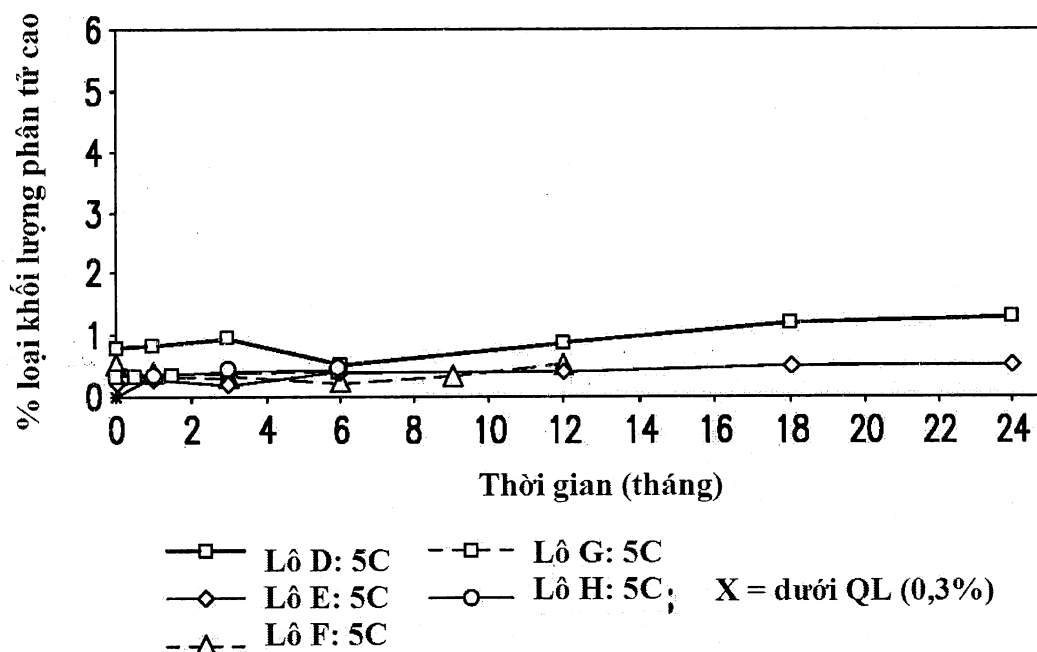


FIG.7D

43/46

Monome HP-SEC

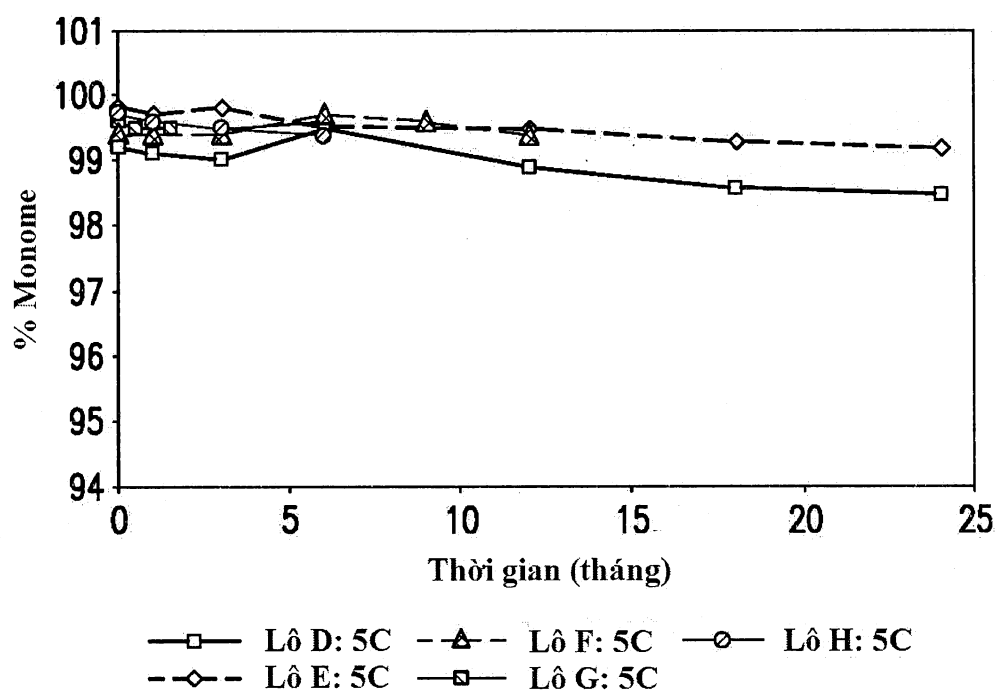


FIG.7E

Loại khối lượng phân tử thấp HP-SEC

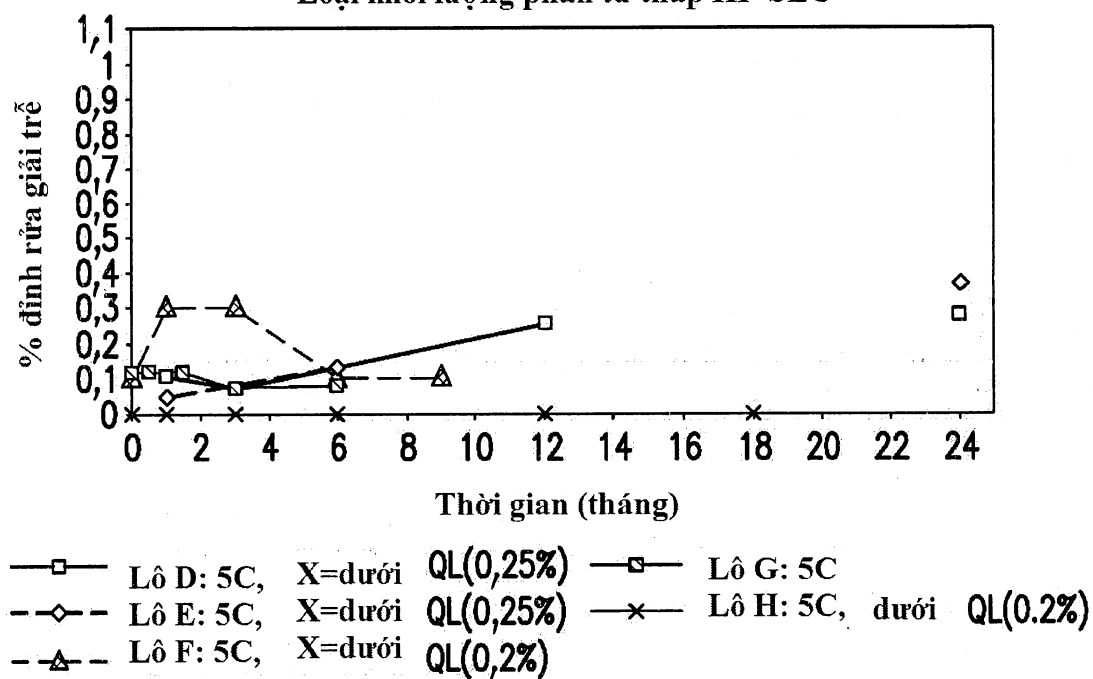


FIG.7F

44/46

Đỉnh chính HP-IEX

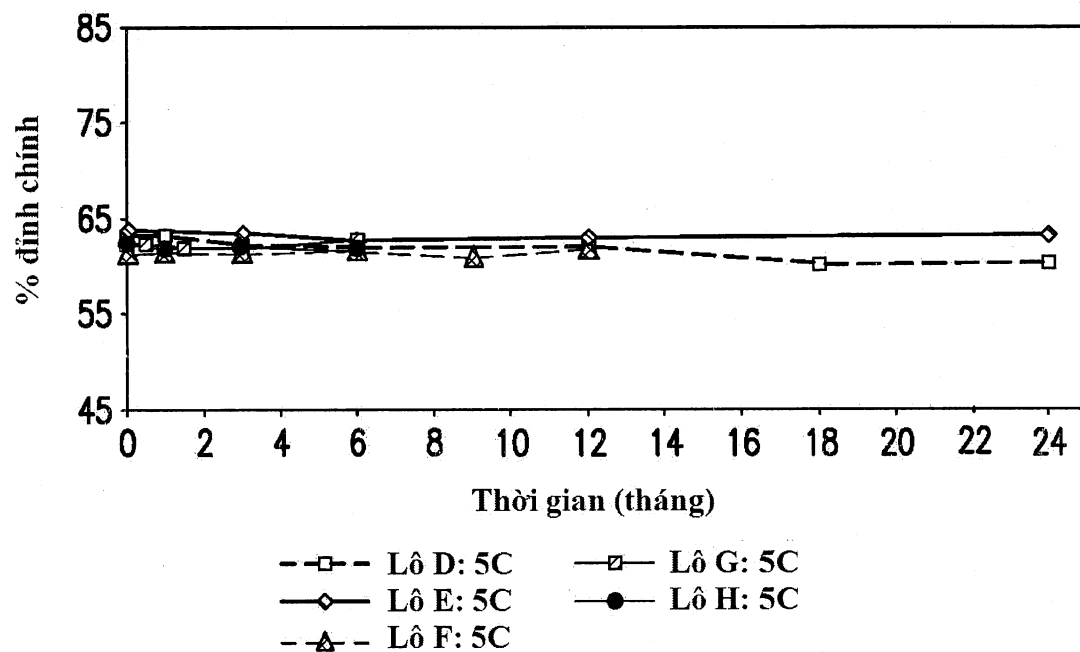


FIG.7G

Biến axit HP-IEX

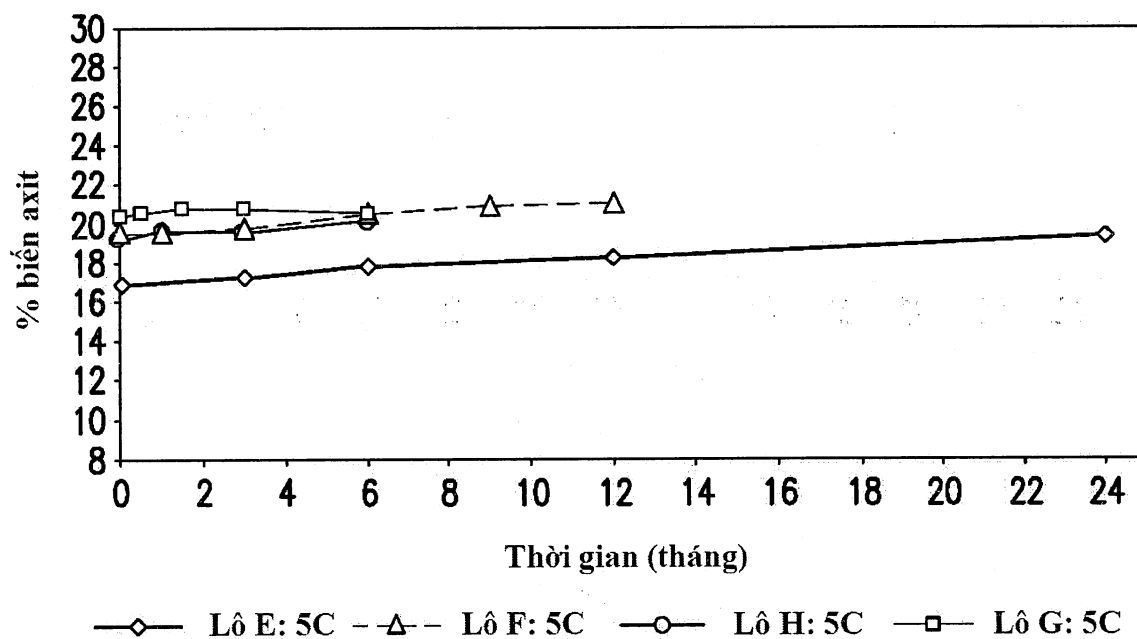


FIG.7H

45/46

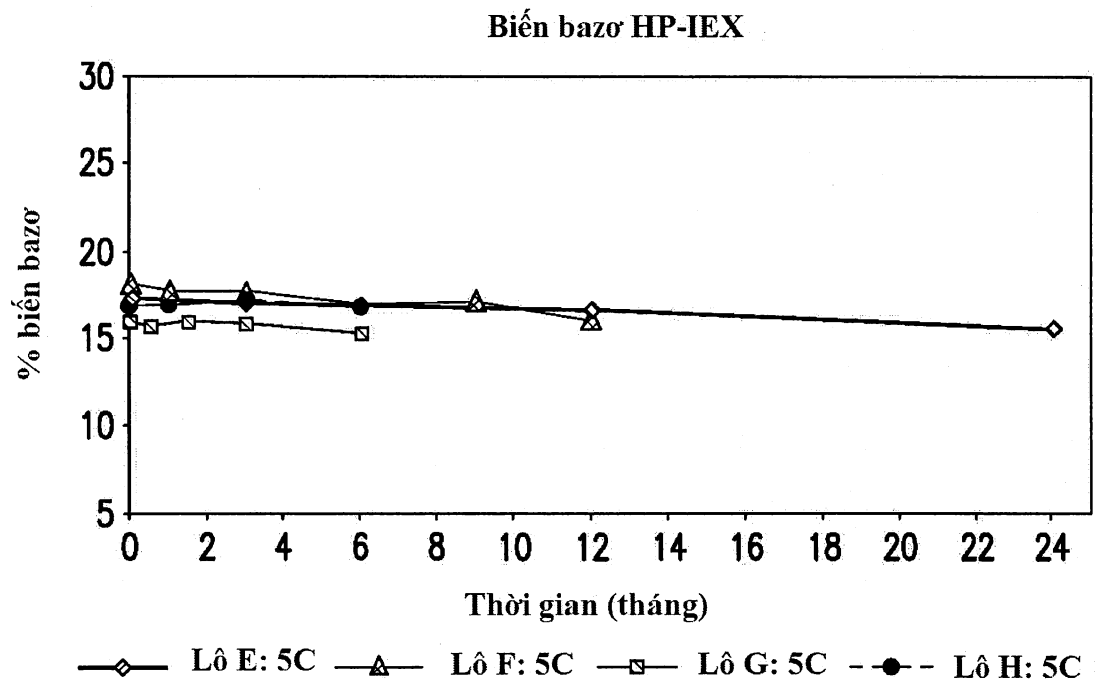


FIG. 7I

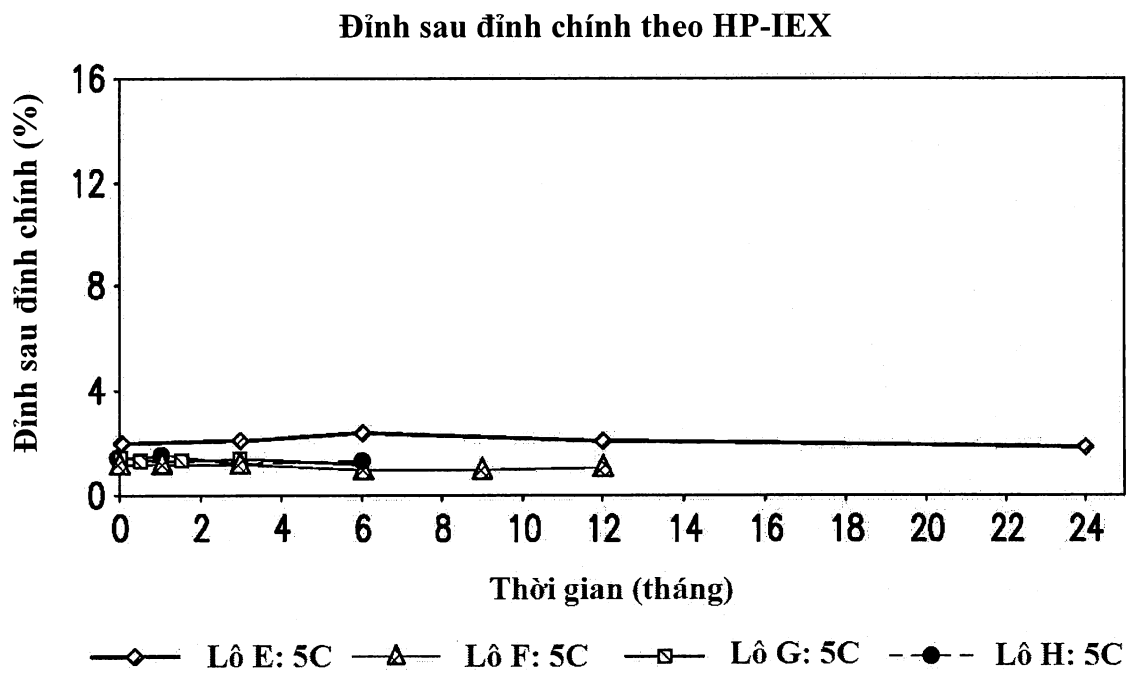


FIG. 7J

46/46

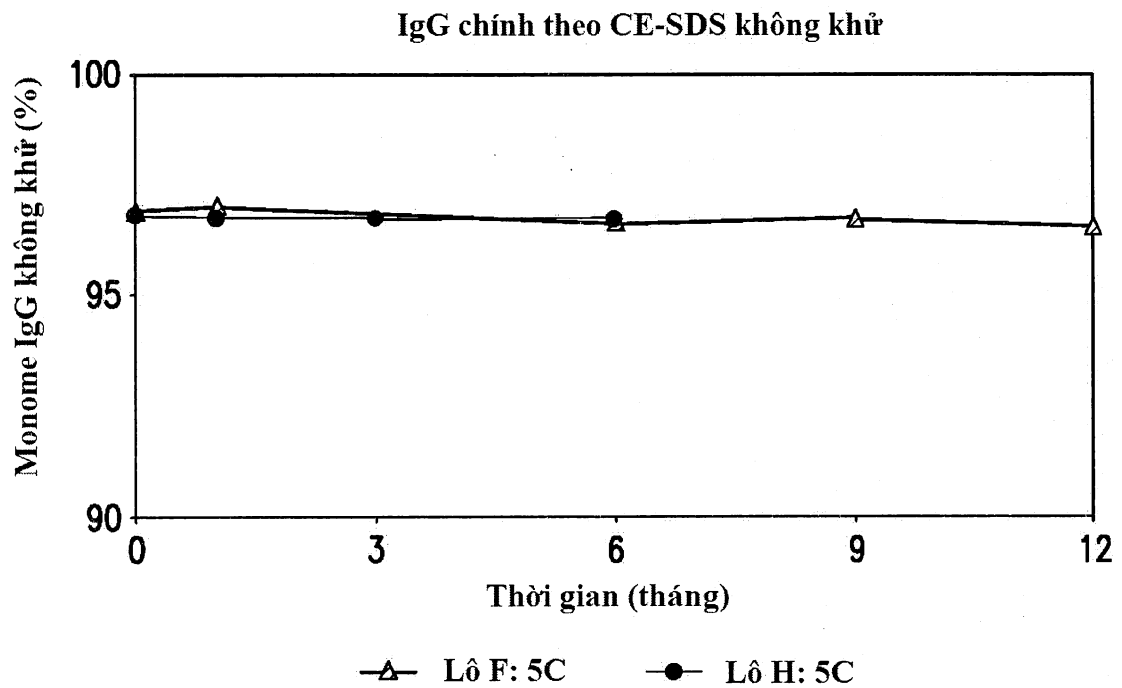


FIG.7K

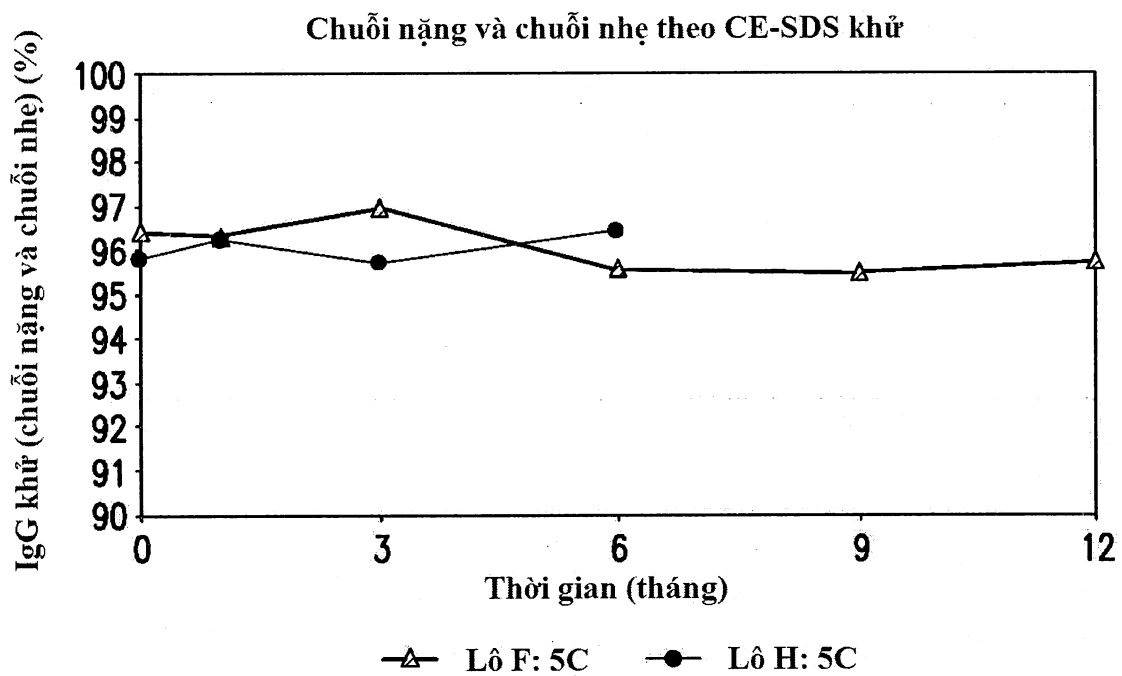


FIG.7L