



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

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



1-0040192

(51)⁷ A61K 9/00; A61K 47/18; C07K 16/28; (13) B
A61K 39/00; A61K 47/26

(21) 1-2019-05806 (22) 23/03/2018
(86) PCT/US2018/024032 23/03/2018 (87) WO/2018/187057 11/10/2018
(30) 62/482,270 06/04/2017 US
(45) 25/06/2024 435 (43) 25/02/2020 383A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591, United States of
America
(72) Qingyan HU (US); Dingjiang LIU (US).
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyển (INVENCO.,LTD)

(54) DƯỢC PHẨM DẠNG LỎNG CHỨA KHÁNG THỂ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI
PROTEIN CHẾT THEO CHƯƠNG TRÌNH CỦA NGƯỜI 1 VÀ KIT CHỨA DƯỢC
PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề xuất dược phẩm ổn định chứa kháng thể người gắn kết đặc hiệu với protein chết theo chương trình của người 1 (PD-1). Theo các phương án nhất định, dược phẩm chứa, ngoài kháng thể kháng PD-1, dung dịch đệm, axit amin, chất hoạt động bề mặt không ion, và đường. Dược phẩm theo sáng chế thể hiện mức độ ổn định đáng kể của kháng thể trong điều kiện chịu tác động và bảo quản.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dược phẩm kháng thể dùng để điều trị. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể người gắn kết đặc hiệu với protein chết theo chương trình của người-1 (PD-1).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các đại phân tử dùng để điều trị (ví dụ, các kháng thể) phải được bào chế theo cách không chỉ làm cho các phân tử này thích hợp để dùng cho bệnh nhân, mà còn phải vẫn giữ được độ ổn định của chúng trong quá trình bảo quản và sử dụng sau này. Ví dụ, các kháng thể dùng để điều trị ở dạng dung dịch lỏng dễ bị thoái biến, kết tụ hoặc dễ bị cải biến hóa học không mong muốn trừ khi dung dịch này được bào chế thích hợp. Độ ổn định của kháng thể trong chế phẩm dạng lỏng tùy thuộc vào không chỉ loại tá dược được sử dụng trong chế phẩm, mà còn phụ thuộc vào lượng và tỷ lệ các tá dược so với nhau. Hơn nữa, các quan ngại khác về độ ổn định phải được xem xét khi bào chế chế phẩm kháng thể dạng lỏng. Các ví dụ về các quan ngại khác bao gồm độ nhớt của dung dịch và nồng độ của kháng thể có thể được điều chỉnh theo chế phẩm nhất định, và chất lượng cảm quan hoặc vẻ bề ngoài của chế phẩm. Do đó, khi bào chế kháng thể dùng để điều trị, rất cần chú ý đến việc thu được chế phẩm vẫn ổn định, chứa kháng thể với nồng độ thích hợp, và có độ nhớt thích hợp cũng như là các đặc tính khác sao cho chế phẩm này thích hợp để dùng cho bệnh nhân.

Các kháng thể kháng protein chết theo chương trình của người-1 (PD-1) là một ví dụ về đại phân tử thích hợp dùng để điều trị mà đòi hỏi công thức bào chế thích hợp. Các kháng thể kháng PD-1 là hữu dụng để điều trị bệnh ung thư trên lâm sàng (ví dụ, bệnh ung thư phổi, u melanin, và bệnh ung thư não) và các bệnh nhiễm virus và các bệnh tự miễn. Các kháng thể kháng PD-1 được lấy làm ví dụ được mô

tả, không kể các đối tượng khác, trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 7101550, 7595048, 7488802, 7563869, 8008449, 8168757, 8216996, 20110008369, 20130017199, 20130022595, và trong công bố đơn quốc tế số WO2006121168, WO2009114335, WO2012145493, WO2013014668, WO2009101611, patent châu Âu số EP2262837, và EP2504028. Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US20140234296 bộc lộ chế phẩm đông khô chứa kháng thể kháng PD-1. Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2015203579 bộc lộ kháng thể kháng PD-1, nhưng không bộc lộ được phẩm dạng lỏng ổn định chứa kháng thể này cùng với histidin, polysorbat, sucroza, và prolin. Công bố đơn quốc tế số WO 2012135408 đề cập đến kháng thể kháng PD-1 pembrolizumab, và không bộc lộ kháng thể kháng PD-1 có các trình tự axit amin cụ thể được bộc lộ ở đây. Công bố đơn quốc tế số WO 2016168716 đề cập đến kháng thể kháng PD-1 nivolumab, và không bộc lộ kháng thể kháng PD-1 có các trình tự axit amin cụ thể được bộc lộ ở đây.

Mặc dù các kháng thể kháng PD-1 là đã biết, song vẫn còn nhu cầu trong lĩnh vực kỹ thuật này về được phẩm mới chứa các kháng thể kháng PD-1 đủ ổn định và thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đáp ứng được nhu cầu nêu trên bằng cách tạo ra được phẩm ổn định chứa kháng thể người gắn kết đặc hiệu với protein chết theo chương trình của người 1 (PD-1) như được xác định trong yêu cầu bảo hộ.

Theo một khía cạnh, được phẩm ổn định dạng lỏng có độ nhớt thấp được đề cập, chứa: (i) kháng thể người gắn kết đặc hiệu với protein chết theo chương trình của người 1 (PD-1); (ii) dung dịch đệm; (iii) đồng dung môi hữu cơ; (iv) chất làm ổn định; và (v) chất cải biến độ nhớt như được xác định trong yêu cầu bảo hộ.

Theo các phương án khác, kháng thể được đề xuất ở nồng độ nằm trong khoảng từ $5 \pm 0,75\text{mg/mL}$ đến $250 \pm 37,5\text{mg/mL}$. Theo một phương án, kháng thể được đề xuất ở nồng độ $12,5\text{mg/mL} \pm 1,85\text{mg/mL}$, hoặc $12,5\text{mg/mL}$. Theo một phương án, kháng thể được đề xuất ở nồng độ $25\text{mg/mL} \pm 3,75\text{mg/mL}$, hoặc khoảng 25mg/mL . Theo một phương án khác, kháng thể được đề xuất ở nồng độ $50\text{mg/mL} \pm 7,5\text{mg/mL}$, hoặc 50mg/mL . Theo một phương án khác, kháng thể được

đề xuất ở nồng độ $100\text{mg/mL} \pm 15\text{mg/mL}$, hoặc 100mg/mL . Theo một phương án, kháng thể được đề xuất ở nồng độ $150\text{mg/mL} \pm 22,5\text{mg/mL}$, hoặc 150mg/mL . Theo một phương án khác, kháng thể được đề xuất ở nồng độ $175\text{mg/mL} \pm 26,25\text{mg/mL}$, hoặc 175mg/mL . Theo một phương án khác, kháng thể được đề xuất ở nồng độ $200\text{mg/mL} \pm 30\text{mg/mL}$, hoặc 200mg/mL .

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng PD-1 được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số: 20150203579. Kháng thể kháng PD-1 chứa (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region-HCVR) chứa vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nặng 1, 2 và 3 (HCDR1-HCDR2-HCDR3) mỗi vùng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5, tương ứng; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region-LCVR) chứa vùng các vùng quyết định hỗ trợ của chuỗi nhẹ 1, 2 và 3 (LCDR1-LCDR2-LCDR3) mỗi vùng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8, tương ứng. Theo một phương án, kháng thể chứa HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Theo một phương án, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 9 và 11; và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, kháng thể chứa HCVR có 90% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 1. Theo một phương án, kháng thể chứa LCVR có 90% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 2. Theo một phương án, kháng thể chứa HCVR có 90% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 1 và LCVR có 90% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 2.

Độ pH của chế phẩm dạng lỏng là $\text{pH } 6,0 \pm 0,3$.

Dung dịch đệm bao gồm histidin. Theo các phương án nhất định, dung dịch đệm histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ $5\text{mM} \pm 1\text{mM}$ đến $50\text{mM} \pm 10\text{mM}$, tốt hơn là nằm trong khoảng từ $5\text{mM} \pm 1\text{mM}$ đến $25\text{mM} \pm 5\text{mM}$. Theo một phương án, dung dịch đệm histidin có nồng độ $10\text{mM} \pm 2\text{mM}$ hoặc 10mM . Theo một phương

án, dung dịch đệm histidin có nồng độ $20\text{mM} \pm 4\text{mM}$ hoặc 20mM . Theo một phương án, dung dịch đệm histidin có nồng độ $40\text{nM} \pm 8\text{mM}$ hoặc 40nM . Theo các phương án nhất định, dung dịch đệm histidin chứa L-histidin và L-histidin monohydroclorua monohydrat. Theo một phương án, L-histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ $2\text{mM} \pm 0,4\text{mM}$ đến $25\text{mM} \pm 5\text{mM}$, tốt hơn là nằm trong khoảng từ $4\text{mM} \pm 0,8\text{mM}$ đến $20\text{mM} \pm 4\text{mM}$. Theo một phương án, L-histidin monohydroclorua monohydrat có nồng độ nằm trong khoảng từ $2\text{mM} \pm 0,4\text{mM}$ đến $25\text{mM} \pm 5\text{mM}$, tốt hơn là nằm trong khoảng từ $4\text{mM} \pm 0,8\text{mM}$ đến $20\text{mM} \pm 4\text{mM}$. Theo một phương án, dung dịch đệm chứa L-histidin ở nồng độ $4,8\text{mM} \pm 0,96\text{mM}$ và L-histidin monohydroclorua monohydrat ở nồng độ $5,2\text{mM} \pm 1,04\text{mM}$. Theo một phương án, dung dịch đệm histidin ở nồng độ $10\text{mM} \pm 2\text{mM}$, trong đó histidin bao gồm L-histidin ở nồng độ $4,8\text{mM} \pm 0,96\text{mM}$ và L-histidin monohydroclorua monohydrat ở nồng độ bằng $5,2\text{mM} \pm 1,04\text{mM}$.

Theo các phương án nhất định, đồng dung môi hữu cơ là polyme không ion chứa gốc polyoxyetylen. Theo một phương án, dung môi hữu cơ là chất hoạt động bề mặt. Theo một vài phương án, đồng dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều chất bất kỳ trong số các chất polysorbat, poloxame 188 và polyetylen glycol 3350. Theo một phương án, đồng dung môi hữu cơ là polysorbat 80. Theo một phương án, đồng dung môi hữu cơ là polysorbat 20.

Theo một phương án, đồng dung môi hữu cơ có nồng độ nằm trong khoảng từ $0,01\% \pm 0,005\%$ đến $1\% \pm 0,5\%$ “khối lượng so với thể tích” hoặc “w/v”, trong đó, ví dụ, $0,1\text{g/ml} = 10\%$ và $0,01\text{g/ml} = 1\%$. Theo các phương án nhất định, dung môi hữu cơ là polysorbat có nồng độ nằm trong khoảng từ $0,05\% \pm 0,025\%$ đến $0,5\% \pm 0,25\%$ (w/v). Theo một phương án, đồng dung môi hữu cơ là polysorbat 80, có nồng độ bằng $0,2\% \pm 0,1\%$ w/v, hoặc $0,2\%$. Theo một phương án khác, đồng dung môi hữu cơ là polysorbat 80, có nồng độ $0,1\% \pm 0,05\%$ w/v hoặc $0,1\%$ w/v. Theo một phương án, đồng dung môi hữu cơ là polysorbat 20, có nồng độ bằng $0,2\% \pm 0,1\%$ w/v, hoặc $0,2\%$. Theo một phương án khác, đồng dung môi hữu cơ là polysorbat 20, có nồng độ bằng $0,1\% \pm 0,05\%$ w/v hoặc $0,1\%$ w/v.

Chất làm ổn định là đường mà là sucroza. Theo các phương án khác, chất làm ổn định có nồng độ nằm trong khoảng từ $1\% \pm 0,2\%$ w/v đến $20\% \pm 4\%$ w/v, từ

5% $\pm$ 1% w/v đến 15% $\pm$ 3% w/v, hoặc từ 1% $\pm$ 0,2% đến 10% $\pm$ 2% w/v. Theo một phương án, chất làm ổn định là sucroza có nồng độ bằng 5% $\pm$ 1% w/v hoặc 5% w/v. Theo một phương án khác, chất làm ổn định là sucroza có nồng độ bằng 9% $\pm$ 1,8% w/v hoặc 9% w/v. Theo một phương án khác, chất làm ổn định là sucroza có nồng độ bằng 10% $\pm$ 2% w/v hoặc 10% w/v.

Theo một phương án, chất cải biến độ nhớt là L-prolin. Theo các phương án nhất định, chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ 1% $\pm$ 0,2% đến 5% $\pm$ 1% w/v. Theo một phương án, chất cải biến độ nhớt là prolin có nồng độ bằng 1,5% $\pm$ 0,3% hoặc khoảng 1,5%. Theo một phương án, chất cải biến độ nhớt là prolin có nồng độ bằng 3% $\pm$ 0,6%, hoặc khoảng 3%.

Theo các phương án nhất định, độ nhớt của dược phẩm dạng lỏng ở 25°C là nhỏ hơn hoặc bằng 15 cPoise $\pm$ 10%, trong đó 1 cP tương đương với 1 mPas. Theo các phương án nhất định, độ nhớt ở 25°C là nằm trong khoảng từ 1,0 cPoise $\pm$ 10% đến 20 cPoise $\pm$ 10%. Theo các phương án nhất định, độ nhớt của dược phẩm dạng lỏng là $\leq$ 15 cPoise. Theo các phương án nhất định, độ nhớt của dược phẩm dạng lỏng là $\leq$ 20 cPoise. Theo các phương án nhất định, độ nhớt của dược phẩm dạng lỏng là $\leq$ 10 cPoise. Theo các phương án nhất định, độ nhớt ở 25°C là 5 cPoise $\pm$ 10%, 6,0 cPoise $\pm$ 10%, 7,0 cPoise $\pm$ 10%, 7,1 cPoise $\pm$ 10%, 7,2 cPoise $\pm$ 10%, 7,9 cPoise $\pm$ 10%, 8,3 cPoise $\pm$ 10%, 9,0 cPoise $\pm$ 10%, 9,6 cPoise $\pm$ 10%, 10,0 cPoise $\pm$ 10%, 10,6 cPoise $\pm$ 10%, 11,4 cPoise $\pm$ 10%, 11,6 cPoise $\pm$ 10%, 11,8 cPoise $\pm$ 10%, 12,0 cPoise $\pm$ 10%, 13,0 cPoise $\pm$ 10%, 14,0 cPoise $\pm$ 10%, 15,0 cPoise $\pm$ 10%, hoặc 16 cPoise $\pm$ 10%.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm ổn định dạng lỏng có độ nhớt thấp, chứa: (i) kháng thể người gắn kết đặc hiệu với PD-1 của người với nồng độ nằm trong khoảng từ 5 $\pm$ 0,75mg/mL đến 250 $\pm$ 37,5mg/mL; (ii) dung dịch đệm histidin với nồng độ nằm trong khoảng từ 0mM đến 40 $\pm$ 8mM; (iii) polysorbat 80 với nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến 0,5% $\pm$ 0,25% (w/v); (iv) sucroza với nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến 15% $\pm$ 3% (w/v); và (v) prolin với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 5% $\pm$ 1%, ở pH nằm trong khoảng từ 5,3 đến 6,7; trong đó kháng thể kháng PD-1 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ

(LCVR) sao cho tổ hợp HCVR/LCVR chứa các vùng quyết định hỗ trợ của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3), mà bao gồm trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 3-4-5/SEQ ID NO: 6-7-8, tương ứng. Theo một phương án, kháng thể kháng PD-1 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2, tương ứng. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD1 chứa vùng Fc được chọn từ nhóm bao gồm các isotyp IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4 của người. Theo một phương án, kháng thể bao gồm isotyp IgG4 của người. Theo một phương án, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 9 và 11; và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, kháng thể có khối lượng phân tử bằng $143 \text{ kDa} \pm 5 \text{ kDa}$.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm dạng lỏng có độ nhớt thấp chứa: (i) kháng thể người gắn kết đặc hiệu với PD-1 người với nồng độ nằm trong khoảng từ $5 \pm 0,75 \text{ mg/mL}$ đến $250 \pm 37,5 \text{ mg/mL}$; (ii) dung dịch đệm histidin với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 mM đến $40 \pm 8 \text{ mM}$; (iii) polysorbat 80 với nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến $0,5\% \pm 0,25\%$ (w/v); (iv) sucroza với nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến $15\% \pm 3\%$ (w/v); và (v) prolin với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến $5\% \pm 1\%$, ở pH nằm trong khoảng từ $5,3$ đến $6,7$; trong đó kháng thể kháng PD-1 chứa HCVR và LCVR, trong đó HCVR có 90% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 1 và/hoặc LCVR có 90% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 2. Theo một phương án, kháng thể kháng PD-1 chứa HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Theo một phương án, kháng thể kháng PD-1 chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 9 và 11; và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm dạng lỏng ổn định, có độ nhớt thấp chứa:

(i) kháng thể người gắn kết đặc hiệu với PD-1 người với nồng độ nằm trong khoảng từ $5 \pm 0,75\text{mg/mL}$ đến $250 \pm 37,5\text{mg/mL}$; (ii) dung dịch đệm histidin với nồng độ nằm trong khoảng từ 0mM đến $40 \pm 8\text{mM}$; (iii) polysorbat 80 với nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến $0,5\% \pm 0,25\%$ (w/v); (iv) sucroza với nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến $15\% \pm 3\%$ (w/v); và (v) prolin với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến $5\% \pm 1\%$, ở pH nằm trong khoảng từ 5,3 đến 6,7; trong đó kháng thể kháng PD-1 chứa HCVR và LCVR, trong đó HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 có không quá 5 axit amin thay thế, và trong đó LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 có không quá hai axit amin thay thế. Theo một phương án, kháng thể kháng PD-1 chứa HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Theo một phương án, kháng thể kháng PD-1 chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 9 và 11; và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo các phương án nhất định, được phẩm theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên có đặc tính được chọn từ nhóm bao gồm: (i) được phẩm ổn định khi bảo quản trong thời gian dài ở nhiệt độ 25°C , 5°C , -20°C , -30°C và -80°C , như được mô tả ở đây; (ii) được phẩm ổn định với tác động khuấy như được mô tả ở đây; (iii) được phẩm có độ nhớt thấp (độ nhớt nhỏ hơn 20 cPoise, tốt hơn là nhỏ hơn 15 cPoise); (iii) được phẩm ổn định ngay cả khi nồng độ tá dược trong được phẩm thay đổi lên đến $\pm 50\%$, như được mô tả ở đây; (iv) được phẩm là đẳng thẩm thấu với các điều kiện sinh lý; (v) được phẩm ổn định và tương thích với các thủ thuật và thiết bị dùng qua đường tĩnh mạch; và (vi) được phẩm ổn định khi bảo quản trong một khoảng thời gian dài trong lọ thủy tinh hoặc trong bơm tiêm nạp sẵn.

Theo các phương án nhất định của khía cạnh này, được phẩm dạng lỏng ổn định được đề xuất chứa: (i) kháng thể người gắn kết đặc hiệu với PD-1 của người với nồng độ nằm trong khoảng từ $5 \pm 0,75\text{mg/mL}$ đến $250 \pm 37,5\text{mg/mL}$; (ii) dung dịch đệm histidin với nồng độ nằm trong khoảng từ $5\text{mM} \pm 1\text{mM}$ đến $20 \pm 4\text{mM}$; (iii) polysorbat 80 với nồng độ nằm trong khoảng từ $0,05\% \pm 0,025\%$ đến $0,3\% \pm 0,15\%$ (w/v); (iv) sucroza với nồng độ nằm trong khoảng từ $1\% \pm 0,2\%$ đến $10\% \pm$

2% (w/v); và (v) prolin với nồng độ nằm trong khoảng từ $1\% \pm 0,2\%$ đến $5\% \pm 1\%$, ở pH 6,0, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cặp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2. Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng ổn định theo khía cạnh này có độ nhớt nhỏ hơn 15 cP. Theo một phương án, $\geq 90\%$ kháng thể có khối lượng phân tử bằng $143 \text{ kDa} \pm 1 \text{ kDa}$. Theo một phương án, dược phẩm có độ nhớt nhỏ hơn 20 cP, nhỏ hơn 15 cP, hoặc nhỏ hơn 10 cP. Theo một phương án, hơn 96% kháng thể vẫn có cấu hình nguyên thể khi bảo quản trong 12 tháng ở 5°C . Theo một phương án, ít nhất hoặc hơn 97% kháng thể vẫn có cấu hình nguyên thể khi bảo quản ở -80°C , -30°C và/hoặc -20°C trong 6 tháng.

Theo một phương án của khía cạnh này, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa (i) kháng thể kháng PD-1 với nồng độ $25 \pm 3,75\text{mg/mL}$; (ii) dung dịch đệm histidin $10 \pm 2\text{mM}$; (iii) polysorbat 80 với nồng độ $0,2\% \pm 0,1\%$ (w/v); (iv) prolin với nồng độ $1,5\% \pm 0,3\%$ (w/v); và (v) sucroza với nồng độ $5\% \pm 1\%$ (w/v), ở pH bằng $6,0 \pm 0,3$, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cặp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2.

Theo một phương án của khía cạnh này, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa (i) kháng thể kháng PD-1 với nồng độ $25 \pm 3,75\text{mg/mL}$; (ii) L-histidin với nồng độ $4,8\text{mM} \pm 0,96\text{mM}$; (iii) L-histidin monohydroclorua monohydrat với nồng độ $5,2\text{mM} \pm 1,04\text{mM}$; (iv) polysorbat 80 với nồng độ $0,2\% \pm 0,1\%$ (w/v); (v) prolin với nồng độ $1,5\% \pm 0,3\%$ (w/v); và (vi) sucroza với nồng độ $5\% \pm 1\%$ (w/v), ở pH bằng $6,0 \pm 0,3$, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cặp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2.

Theo một phương án của khía cạnh này, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa (i) kháng thể kháng PD-1 với nồng độ $50 \pm 7,5\text{mg/mL}$; (ii) dung dịch đệm histidin với nồng độ $10 \pm 2\text{mM}$; (iii) polysorbat 80 với nồng độ $0,2\% \pm 0,1\%$ (w/v); (iv) prolin với nồng độ $1,5\% \pm 0,3\%$ (w/v); và (v) sucroza với nồng độ $5\% \pm 1\%$ (w/v), ở pH bằng $6,0 \pm 0,3$, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cặp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2. Theo một phương án về dược phẩm cụ thể này, độ nhớt là nhỏ hơn 10 cPoise.

Theo một phương án của khía cạnh này, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa (i) kháng thể kháng PD-1 với nồng độ $50 \pm 7,5\text{mg/mL}$; (ii) L-histidin với nồng độ

4,8mM $\pm$ 0,96mM; (iii) L-histidin monohydroclorua monohydrat với nồng độ 5,2mM $\pm$ 1,04mM; (iv) polysorbat 80 với nồng độ 0,2% $\pm$ 0,1% (w/v); (v) prolin với nồng độ 1,5% $\pm$ 0,3% (w/v); và (vi) sucroza với nồng độ 5% $\pm$ 1% (w/v), ở pH bằng 6,0 $\pm$ 0,3, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cặp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2.

Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa (i) kháng thể kháng PD-1 với nồng độ 100 $\pm$ 15mg/mL; (ii) dung dịch đệm histidin với nồng độ 10 $\pm$ 2mM; (iii) polysorbat 80 với nồng độ 0,2% $\pm$ 0,1% (w/v); (iv) prolin với nồng độ 1,5% $\pm$ 0,3% (w/v); và (v) sucroza với nồng độ 5% $\pm$ 1% (w/v), ở pH bằng 6,0 $\pm$ 0,3, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cặp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2. Theo một phương án về dược phẩm cụ thể này, độ nhớt là nhỏ hơn 10 cPoise.

Theo một phương án của khía cạnh này, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa (i) kháng thể kháng PD-1 với nồng độ 100 $\pm$ 15mg/mL; (ii) L-histidin với nồng độ 4,8mM $\pm$ 0,96mM; (iii) L-histidin monohydroclorua monohydrat với nồng độ 5,2mM $\pm$ 1,04mM; (iv) polysorbat 80 với nồng độ 0,2% $\pm$ 0,1% (w/v); (v) prolin với nồng độ 1,5% $\pm$ 0,3% (w/v); và (vi) sucroza với nồng độ 5% $\pm$ 1% (w/v), ở pH bằng 6,0 $\pm$ 0,3, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cặp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2.

Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa (i) kháng thể kháng PD-1 với nồng độ 150 $\pm$ 22,5mg/mL; (ii) dung dịch đệm histidin với nồng độ 10 $\pm$ 2mM; (iii) polysorbat 80 với nồng độ 0,2% $\pm$ 0,1% (w/v); (iv) sucroza với nồng độ 10% $\pm$ 2% (w/v); và (v) prolin với nồng độ 1,5% $\pm$ 0,3% (w/v), ở pH bằng 6,0 $\pm$ 0,3, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cặp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2. Theo một phương án về dược phẩm cụ thể này, độ nhớt là nhỏ hơn 20 cPoise, tốt hơn là nhỏ hơn 15 cPoise.

Theo một phương án của khía cạnh này, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa (i) kháng thể kháng PD-1 với nồng độ 150 $\pm$ 22,5mg/mL; (ii) L-histidin với nồng độ 4,8mM $\pm$ 0,96mM; (iii) L-histidin monohydroclorua monohydrat với nồng độ 5,2mM $\pm$ 1,04mM; (iv) polysorbat 80 với nồng độ 0,2% $\pm$ 0,1% (w/v); (v) prolin với nồng độ 1,5% $\pm$ 0,3% (w/v); và (vi) sucroza với nồng độ 5% $\pm$ 1% (w/v), ở pH

bằng $6,0 \pm 0,3$, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cấp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2.

Theo một phương án của khía cạnh này, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa (i) kháng thể kháng PD-1 với nồng độ $175 \pm 26,25\text{mg/mL}$; (ii) dung dịch đệm histidin với nồng độ $10 \pm 2\text{mM}$; (iii) polysorbat 80 với nồng độ $0,2\% \pm 0,1\%$ (w/v); (iv) sucroza với nồng độ $5\% \pm 1\%$ (w/v); và (v) prolin với nồng độ $1,5\% \pm 0,3\%$ (w/v), ở pH bằng $6,0 \pm 0,3$, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cấp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2. Theo một phương án về dược phẩm cụ thể này, độ nhớt là nhỏ hơn 20 cPoise, tốt hơn là nhỏ hơn 15 cPoise.

Theo một phương án của khía cạnh này, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa (i) kháng thể kháng PD-1 với nồng độ $175 \pm 26,25\text{mg/mL}$; (ii) L-histidin với nồng độ $4,8\text{mM} \pm 0,96\text{mM}$; (iii) L-histidin monohydroclorua monohydrat với nồng độ $5,2\text{mM} \pm 1,04\text{mM}$; (iv) polysorbat 80 với nồng độ $0,2\% \pm 0,1\%$ (w/v); (v) prolin với nồng độ $1,5\% \pm 0,3\%$ (w/v); và (vi) sucroza với nồng độ $5\% \pm 1\%$ (w/v), ở pH bằng $6,0 \pm 0,3$, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cấp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2.

Theo một phương án của khía cạnh này, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa (i) kháng thể kháng PD-1 với nồng độ $200 \pm 30,00\text{mg/mL}$; (ii) dung dịch đệm histidin với nồng độ $10 \pm 2\text{mM}$; (iii) polysorbat 80 với nồng độ $0,2\% \pm 0,1\%$ (w/v); (iv) sucroza với nồng độ $5\% \pm 1\%$ (w/v); và (v) prolin với nồng độ $1,5\% \pm 0,3\%$ (w/v), ở pH bằng $6,0 \pm 0,3$, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cấp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2. Theo một phương án về dược phẩm cụ thể này, độ nhớt là nhỏ hơn 20 cPoise.

Theo một phương án của khía cạnh này, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa (i) kháng thể kháng PD-1 với nồng độ $200 \pm 30,00\text{mg/mL}$; (ii) L-histidin với nồng độ $4,8\text{mM} \pm 0,96\text{mM}$; (iii) L-histidin monohydroclorua monohydrat với nồng độ $5,2\text{mM} \pm 1,04\text{mM}$; (iv) polysorbat 80 với nồng độ $0,2\% \pm 0,1\%$ (w/v); (v) prolin với nồng độ $1,5\% \pm 0,3\%$ (w/v); và (vi) sucroza với nồng độ $5\% \pm 1\%$ (w/v), ở pH bằng $6,0 \pm 0,3$, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cấp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2.

Theo một phương án, sau khi bảo quản dược phẩm ở 45° trong 28 ngày, $\geq 90\%$ kháng thể là nguyên thể và $\geq 35\%$ kháng thể là dạng mang điện tích chính. Theo một phương án, sau khi bảo quản dược phẩm ở 25° trong ba tháng, $> 94\%$ kháng thể là nguyên thể và $\geq 44\%$ kháng thể là dạng mang điện tích chính. Theo một phương án, sau khi bảo quản dược phẩm ở 5° trong 12 tháng, $> 96\%$ kháng thể là nguyên thể và $> 50\%$ kháng thể là dạng mang điện tích chính. Theo một phương án, sau khi bảo quản dược phẩm ở -20° trong 12 tháng, $> 96\%$ kháng thể là nguyên thể và $> 40\%$ kháng thể là dạng mang điện tích chính. Theo một phương án, sau khi bảo quản dược phẩm ở -30° trong 12 tháng, $> 96\%$ kháng thể là nguyên thể và $> 40\%$ kháng thể là dạng mang điện tích chính. Theo một phương án, sau khi bảo quản dược phẩm ở -80° trong 12 tháng, $> 96\%$ kháng thể là nguyên thể và $> 40\%$ kháng thể là dạng mang điện tích chính. Theo một phương án, hơn 96% kháng thể vẫn có cấu hình nguyên thể khi bảo quản trong 12 tháng ở 5°C. Theo một phương án, ít nhất hoặc hơn 97% kháng thể vẫn có cấu hình nguyên thể khi bảo quản ở -80°C, -30°C và/hoặc -20°C trong 6 tháng.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa: (i) kháng thể kháng PD-1 với nồng độ lên đến 100mg/mL; (ii) dung dịch đệm histidin với nồng độ nằm trong khoảng từ 2mM $\pm$ 0,4mM đến 20mM $\pm$ 4mM; (iii) sucroza với nồng độ lên đến 20% $\pm$ 4% (w/v) ; và (iv) polysorbat với nồng độ lên đến 0,2% $\pm$ 0,1% w/v, ở pH 6,0 $\pm$ 0,3. Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa kháng thể kháng PD-1 với nồng độ 25mg/mL. Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa kháng thể kháng PD-1 với nồng độ 50mg/mL. Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa kháng thể kháng PD-1 với nồng độ 75mg/mL. Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa dung dịch đệm histidin với nồng độ 10mM $\pm$ 2mM. Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa sucroza 5%. Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa sucroza 6%. Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa sucroza 9%. Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa sucroza 10%. Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa polysorbat 0,1%. Theo một phương án, polysorbat là polysorbat 80 hoặc polysorbat 20. Theo một phương án, kháng thể kháng PD-1 chứa HCVR/LCVR có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1/2.

Theo một khía cạnh, được phẩm ổn định dạng lỏng theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên được cung cấp trong đồ chứa. Theo một phương án, đồ chứa là lọ polycarbonat. Theo một phương án, đồ chứa là lọ thủy tinh. Theo một phương án, lọ thủy tinh là lọ thủy tinh borosilicat loại 1 với nắp bằng caosu butyl được phủ flocacbon. Theo một phương án, đồ chứa là dụng cụ vi truyền. Theo một phương án, đồ chứa là bơm tiêm. Theo một phương án, đồ chứa là bơm tiêm nạp sẵn. Theo một phương án, bơm tiêm có pittong được phủ flocacbon. Theo các phương án nhất định, bơm tiêm là bơm tiêm thủy tinh dài có dung tích 1mL hoặc 2,25mL chứa ít hơn 500 phần tỷ vonfam được lắp với một kim tiêm 27-G, nắp caosu butyl được phủ flocacbon, và nắp nút bằng caosu không độc tế bào, không chứa latex. Theo một phương án, bơm tiêm này là bơm tiêm thủy tinh dài có dung tích 1mL được lắp với một kim tiêm có thành mỏng 27-G, nắp caosu 4023/50 được phủ FLUROTEC, và nắp nút bằng caosu FM 27. Theo một phương án, bơm tiêm này là bơm tiêm bằng nhựa có dung tích 1mL, 2mL, 3mL, 5mL hoặc 10mL được lắp với một kim tiêm.

Theo một khía cạnh, kit chứa được phẩm ổn định theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, một đồ chứa, và hướng dẫn sử dụng được đề xuất. Theo một phương án, đồ chứa là lọ thủy tinh. Theo một phương án, đồ chứa là bơm tiêm nạp sẵn. Theo một phương án, bơm tiêm này là bơm tiêm thủy tinh dài có dung tích 1mL hoặc 2,25mL được lắp với một kim tiêm thành mỏng 27-G, nút caosu 4023/50 được phủ FLUROTEC, và nắp nút bằng cao su FM 27. Theo một phương án, bơm tiêm là bơm tiêm bằng nhựa có dung tích 1mL, 2mL, 3mL, 5mL hoặc 10mL được lắp với một kim tiêm.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất bơm tiêm nạp sẵn chứa được phẩm ổn định dạng lỏng chứa: (i) kháng thể người gắn kết đặc hiệu với PD-1 của người với nồng độ nằm trong khoảng từ $5 \pm 0,75\text{mg/mL}$ đến $250 \pm 37,5\text{mg/mL}$; (ii) dung dịch đệm histidin với nồng độ nằm trong khoảng từ $5\text{mM} \pm 1\text{mM}$ đến $20 \pm 4\text{mM}$; (iii) polysorbat 80 với nồng độ nằm trong khoảng từ $0,05\% \pm 0,025\%$ đến $0,3\% \pm 0,15\%$ (w/v); (iv) sucroza với nồng độ nằm trong khoảng từ $1\% \pm 0,2\%$ đến $10\% \pm 2\%$ (w/v); và (v) prolin với nồng độ nằm trong khoảng từ $1\% \pm 0,2\%$ đến $5\% \pm 1\%$, ở pH bằng $6,0 \pm 0,3$, trong đó kháng thể chứa HCVR/LCVR có cặp trình tự

axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2; trong đó được phẩm có đặc tính được chọn từ nhóm bao gồm: (i) $\geq 98\%$ kháng thể là ở dạng nguyên thể sau khi bảo quản ở 5°C trong 12 tháng; (ii) $\geq 53\%$ kháng thể là biến thể mang điện tích chính sau khi bảo quản ở 5°C trong 12 tháng; (iii) $\geq 97\%$ kháng thể là ở dạng nguyên thể sau khi bảo quản ở 25°C trong 6 tháng; (iv) được phẩm ổn định với áp lực khuấy trong đó $\geq 98\%$ kháng thể là ở dạng nguyên thể sau khi khuấy trong 120 phút trong bơm tiêm nạp sẵn; (v) hơn 90% kháng thể có khối lượng phân tử bằng $143 \text{ kDa} \pm 1 \text{ kDa}$; (vi) được phẩm có độ nhớt nhỏ hơn 20 cP, nhỏ hơn 15 cP, hoặc nhỏ hơn 10 cP; (vii) hơn 96% kháng thể vẫn có cấu hình nguyên thể khi bảo quản trong 12 tháng ở 5°C ; và (viii) ít nhất hoặc hơn 97% kháng thể vẫn có cấu hình nguyên thể khi bảo quản ở -80°C , -30°C và/hoặc -20°C trong 6 tháng.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất lọ thủy tinh chứa được phẩm ổn định dạng lỏng chứa: (i) kháng thể người gắn kết đặc hiệu với PD-1 của người với nồng độ nằm trong khoảng từ $5 \pm 0,75\text{mg/mL}$ đến $250 \pm 37,5\text{mg/mL}$; (ii) dung dịch đệm histidin với nồng độ nằm trong khoảng từ $5\text{mM} \pm 1\text{mM}$ đến $20 \pm 4\text{mM}$; (iii) polysorbat 80 với nồng độ nằm trong khoảng từ $0,05\% \pm 0,025\%$ đến $0,3\% \pm 0,15\%$ (w/v); (iv) sucroza với nồng độ nằm trong khoảng từ $1\% \pm 0,2\%$ đến $10\% \pm 2\%$ (w/v); và (v) prolin với nồng độ nằm trong khoảng từ $1\% \pm 0,2\%$ đến $5\% \pm 1\%$, ở pH bằng $6,0 \pm 0,3$, trong đó kháng thể này chứa HCVR/LCVR có cặp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1/2; trong đó được phẩm này có đặc tính được chọn từ nhóm bao gồm: (i) được phẩm ổn định khi bảo quản và ổn định với áp lực trong lọ thủy tinh; (ii) được phẩm ổn định và thích hợp để dùng trong các thiết bị phân phối qua đường tĩnh mạch; (iii) được phẩm này ổn định về mặt hóa học và vật lý khi được pha loãng bằng các chất pha loãng chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, natri clorua 0,9% hoặc dextroza 5%); (iv) được phẩm là ổn định với các túi IV làm bằng thủy tinh hoặc các chất dẻo polyme (ví dụ, polyvinyl clorua, phtalat, polyolefin hoặc polypropylen); (v) được phẩm thích hợp với các bơm truyền chuẩn (ví dụ, bơm nhu động, bơm dịch chuyển chất lỏng); (vi) $\geq 90\%$ các kháng thể có khối lượng phân tử bằng $143 \text{ kDa} \pm 1 \text{ kDa}$; (vii) được phẩm có độ nhớt nhỏ hơn 20 cP, nhỏ hơn 15 cP, hoặc nhỏ hơn 10 cP; (viii) hơn 96% kháng thể có cấu trúc nguyên thể khi bảo quản trong 12 tháng ở 5°C ; và (ix) ít nhất hoặc hơn

97% kháng thể có cấu trúc nguyên thể khi bảo quản ở -80°C, -30°C và/hoặc -20°C trong 6 tháng.

Các phương án khác sẽ trở nên rõ ràng hơn dựa vào phần mô tả chi tiết dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là bảng thể hiện tác động của độ pH đến độ ổn định của mAb1 150mg/mL được ủ ở 45°C trong 28 ngày. Các kết quả của ‘Nguyên liệu ban đầu’ ^aSE-UPLC và CEX-UPLC là các giá trị trung bình của nguyên liệu ban đầu ở tất cả các đợt phẩm.

Fig.2 thể hiện độ ổn định của ba dược phẩm F1, F2 và F3 khi bảo quản, trong đó dược phẩm F1 chứa mAb1 210mg/mL, histindin 10mM và prolin 3%, ở pH 6,0; F2 chứa mAb1 210mg/mL, histindin 10mM và sucroza 3%, ở pH 6,0; và F3 chứa mAb1 210mg/mL, histindin 10mM và sucroza 5%, ở pH 6,0. Độ ổn định khi bảo quản được đánh giá thông qua % các dạng có khối lượng phân tử cao (high molecular weight species-HMW) được sinh ra khi bảo quản ở -80°C (A), -30°C (B) và -20°C (C) trong tối đa 9 tháng và được phân tích bằng sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC).

Fig.3 thể hiện độ ổn định của ba dược phẩm F1, F2 và F3 khi bảo quản, trong đó F1 chứa mAb1 150mg/mL, histindin 10mM, sucroza 9% và polysorbat 80 0,2% (PS80), ở pH 6,0; F2 chứa mAb1 175mg/mL, histindin 10mM, prolin 3% và PS80 0,2%, ở pH 6,0; và F3 chứa mAb1 175mg/mL, histindin 10mM, sucroza 5%, prolin 1,5% và PS80 0,2%, ở pH 6,0. Độ ổn định trong quá trình bảo quản được đánh giá thông qua % dạng có khối lượng phân tử cao (HMW) được sinh ra khi bảo quản ở -80°C (A), -30°C (B) và -20°C (C) trong tối đa 6 tháng và được phân tích bằng sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC).

Fig.4 là bảng thể hiện độ nhớt của mAb1 150mg/mL có bổ sung tá dược và chất cải biến độ nhớt.

Fig.5 là bảng thể hiện tác động của chất cải biến độ nhớt đến độ ổn định của mAb1 175mg/mL được ủ ở 45°C trong 14 ngày. Các kết quả về ^apH, ‘Nguyên liệu

ban đầu' SE-UPLC và CEX-UPLC là các giá trị trung bình của các nguyên liệu ban đầu đối với tất cả các dược phẩm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi các phương pháp theo sáng chế được mô tả, cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các phương pháp, và các điều kiện thử nghiệm cụ thể được mô tả, vì thế các phương pháp và các điều kiện như vậy có thể khác nhau. Cần hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không được dự định là làm giới hạn sáng chế, vì phạm vi của sáng chế sẽ chỉ bị giới hạn bởi yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Trừ khi được quy định theo cách khác, toàn bộ các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật sử dụng ở đây có nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật thuộc sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khoảng", nếu được sử dụng có viện dẫn đến giá trị số cụ thể hoặc khoảng giá trị, có nghĩa là giá trị này có thể khác so với giá trị được nêu không quá 1%. Ví dụ, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khoảng 100" bao gồm 99 và 101 và tất cả các giá trị nằm giữa chúng (ví dụ, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, v.v.). Mặc dù, phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng khi thực hiện hoặc thử nghiệm sáng chế, song sáng chế chỉ mô tả các phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "dược phẩm" có nghĩa là hỗn hợp của ít nhất một hoạt chất (ví dụ, phân tử nhỏ, đại phân tử, hợp chất, v.v. có khả năng gây ra tác dụng sinh học ở người hoặc động vật không phải người), và ít nhất một thành phần không có hoạt tính để khi kết hợp với hoạt chất hoặc một hoặc nhiều thành phần không có hoạt tính khác là, thích hợp dùng để điều trị cho người hoặc động vật không phải người. Thuật ngữ "chế phẩm", như được sử dụng ở đây, có nghĩa là "dược phẩm" trừ khi được chỉ ra rõ ràng theo cách khác. Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa ít nhất một polypeptit dùng để điều trị. Theo các phương án nhất định của sáng chế, polypeptit dùng để điều trị là kháng thể, hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, mà gắn kết đặc hiệu với protein chết theo chương trình của người 1 (PD-1). Cụ thể hơn là, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa: (i) kháng thể người gắn

kết đặc hiệu với PD-1 của người (ii) dung dịch đệm histidin; (iii) đồng dung môi hữu cơ mà là chất hoạt động bề mặt không ion; (iv) chất làm ổn định là cacbohydrat; và tùy ý, (v) chất cải biến độ nhớt là axit amin. Các thành phần và được phẩm cụ thể được bao gồm trong sáng chế được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Các kháng thể gắn kết đặc hiệu với PD-1

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa kháng thể của người, hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, mà gắn kết đặc hiệu với PD-1 của người. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "PD-1" có nghĩa là protein chết theo chương trình của người 1. Các kháng thể kháng PD-1 của người được mô tả trong, ví dụ, công bố/patent Mỹ số 8008449, 8168757, 20110008369, 20130017199, 20130022595, 20150203579, và trong công bố đơn quốc tế số WO2006121168, WO2009114335, WO2012145493, WO2013014668, WO2009101611, WO2015112800, patent châu Âu số EP2262837, và EP2504028.

Thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng ở đây, thường được dùng để chỉ các phân tử globulin miễn dịch chứa bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết với nhau bằng các liên kết disulfua, cũng như là các multime của chúng (ví dụ, IgM); tuy nhiên, các phân tử globulin miễn dịch chỉ bao gồm chuỗi nặng (tức là, thiếu các chuỗi nhẹ) cũng được bao gồm trong định nghĩa của thuật ngữ "kháng thể". Mỗi chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là HCVR hoặc V_H) và vùng cố định chuỗi nặng. Vùng cố định chuỗi nặng chứa ba miền, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là LCVR hoặc V_L) và vùng cố định chuỗi nhẹ. Vùng cố định chuỗi nhẹ chứa một miền (CL1). Các vùng V_H và V_L có thể được chia nhỏ thành các vùng có tính siêu biến, được gọi là các vùng quyết định bổ trợ (complementary determining region-CDR), nằm xen với các vùng mà được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung (framework region-FR). Mỗi vùng V_H và V_L bao gồm ba vùng CDR và bốn vùng FR, được sắp xếp từ đầu amino đến đầu carboxy theo trật tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Trừ khi được quy định theo cách khác, thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng ở đây, nên được hiểu là bao gồm các phân tử kháng thể đầy đủ cũng như là các đoạn gắn kết với kháng nguyên của chúng. Thuật ngữ "phần gắn kết với kháng

nguyên" hay "đoạn gắn kết với kháng nguyên" của kháng thể (hoặc đơn giản là "phần kháng thể" hay "đoạn kháng thể"), như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ một hoặc nhiều đoạn của kháng thể mà vẫn có khả năng gắn kết đặc hiệu với PD-1 của người hoặc epitop của chúng.

Thuật ngữ "kháng thể phân lập", như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ kháng thể mà gần như không chứa các kháng thể khác có các tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể phân lập gắn kết đặc hiệu với PD-1 của người hầu như không chứa các kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên ngoài PD-1 của người).

Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu", hoặc thuật ngữ tương tự, có nghĩa là kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của chúng tạo thành một phức hợp với kháng nguyên mà tương đối ổn định trong các điều kiện sinh lý. Gắn kết đặc hiệu được đặc trưng bởi hằng số phân ly ít nhất bằng 1×10^{-8} M hoặc lớn hơn. Các phương pháp xác định liệu hai phân tử có gắn kết đặc hiệu hay không là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ, thẩm tách cân bằng, cộng hưởng plasmon bề mặt, và phương pháp tương tự. Tuy nhiên, kháng thể phân lập gắn kết đặc hiệu với PD-1 của người có thể có khả năng phản ứng chéo với các kháng nguyên khác, như các phân tử PD-1 từ các loài khác (các gen trực giao). Trong trường hợp sáng chế, các kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) gắn kết với PD-1 của người cũng như là với một hoặc nhiều kháng nguyên khác được cho là "gắn kết đặc hiệu" với PD-1 của người. Hơn nữa, kháng thể phân lập hầu như không chứa các hợp chất hóa học hoặc nguyên liệu tế bào khác.

Các kháng thể kháng PD-1 của người được lấy làm ví dụ có thể được bao gồm trong các dược phẩm theo sáng chế được nêu trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US20150203579, và công bố đơn quốc tế số WO2015112800.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng PD-1 của người, hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, chứa vùng quyết định bổ trợ của chuỗi nặng (HCDR) 1 nêu trong SEQ ID NO: 3, HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 4, và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 5. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD-1 của người, hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, chứa HCVR nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng PD-1 của người, hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, chứa vùng quyết định hỗ trợ của chuỗi nhẹ (LCDR) 1 nêu trong SEQ ID NO: 6, LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 7, và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 8. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD-1 của người, hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, chứa LCVR nêu trong SEQ ID NO: 2.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng PD-1 của người, hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, chứa HCVR có 90%, 95%, 98% hoặc 99% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 1.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng PD-1 của người, hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, chứa LCVR có 90%, 95%, 98% hoặc 99% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 2.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng PD-1 của người, hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, chứa HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 có không quá 5 axit amin thay thế.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng PD-1 của người, hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, chứa LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 có không quá 2 axit amin thay thế.

Mức đồng nhất trình tự có thể được đánh giá bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, GAP, BESTFIT, và BLAST).

Sáng chế cũng bao gồm dược phẩm chứa các kháng thể kháng PD-1, trong đó các kháng thể kháng PD-1 chứa các biến thể của trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin của HCVR, LCVR và/hoặc CDR được mô tả ở đây có một hoặc nhiều axit amin thay thế bảo toàn. Ví dụ, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa các kháng thể kháng PD-1 có các trình tự axit amin HCVR, LCVR và/hoặc CDR với, ví dụ, 10 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v. axit amin thay thế bảo toàn so với trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR và/hoặc CDR được mô tả ở đây.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD1 chứa vùng Fc được chọn từ nhóm bao gồm các isotyp IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4 của người.

Kháng thể được lấy làm ví dụ, không giới hạn được sử dụng trong các ví dụ ở đây được gọi là "mAb1". Kháng thể này cũng được đề cập trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 20150203579 là H2M7798N hoặc H4H7798N, và cũng được biết đến là "REGN2810" hoặc "cemiplimab". mAb1 (H4H7798N) chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR có SEQ ID NO: 1/2, và các miền HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3 được thể hiện bởi các SEQ ID NO: 3-4-5/SEQ ID NO: 6-7-8.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng PD-1 của người, hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, chứa chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 10.

Đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng việc phân cắt ở đầu tận cùng các axit amin có thể xảy ra trong suốt quá trình tổng hợp các kháng thể (xem tài liệu, ví dụ, Wang *et al* 2007, J. Pharma. Sci. 96: 1-26). Do đó, theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD-1 chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11. SEQ ID NO: 11 bao gồm trình tự axit amin của chuỗi nặng, trong đó lysin ở đầu C không có trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế chứa khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 98% hoặc nhiều hơn 98% kháng thể kháng PD-1, trong đó lysin ở đầu C là không có mặt.

Lượng kháng thể, hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, chứa trong dược phẩm theo sáng chế có thể khác nhau tùy thuộc vào các đặc tính cụ thể mong muốn có được ở dược phẩm, cũng như là các trường hợp và mục đích cụ thể mà dược phẩm dự định được sử dụng. Theo các phương án nhất định, dược phẩm là dược phẩm dạng lỏng có thể chứa từ kháng thể với nồng độ từ $5 \pm 0,75\text{mg/mL}$ đến $250 \pm 37,5\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng độ từ $10 \pm 1,5\text{mg/mL}$ đến $240 \pm 36\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng độ từ $20 \pm 3,0\text{mg/mL}$ đến $230 \pm 34,5\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng độ từ $25 \pm 3,75\text{mg/mL}$ đến $240 \pm 36\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng độ từ $50 \pm 7,5\text{mg/mL}$ đến $230 \pm 34,5\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng độ từ $60 \pm 9\text{mg/mL}$ đến $240 \pm 36\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng độ từ $70 \pm 10,5\text{mg/mL}$ đến $230 \pm 34,5\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng độ từ $80 \pm 12\text{mg/mL}$ đến $220 \pm 33\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng

độ từ $90 \pm 13,5\text{mg/mL}$ đến $210 \pm 31,5\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng độ từ $100 \pm 15\text{mg/mL}$ đến $200 \pm 30\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng độ từ $110 \pm 16,5\text{mg/mL}$ đến $190 \pm 28,5\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng độ từ $120 \pm 18\text{mg/mL}$ đến $180 \pm 27\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng độ từ $130 \pm 19,5\text{mg/mL}$ đến $170 \pm 25,5\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng độ từ $140 \pm 21\text{mg/mL}$ đến $160 \pm 24\text{mg/mL}$; kháng thể với nồng độ từ $150 \pm 22,5\text{mg/mL}$; hoặc với nồng độ bằng $175 \pm 26,25\text{mg/mL}$. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, mà gắn kết đặc hiệu với PD-1 của người với nồng độ khoảng 5mg/mL ; khoảng 10mg/mL ; khoảng 15mg/mL ; khoảng 20mg/mL ; khoảng 25mg/mL ; khoảng 30mg/mL ; khoảng 35mg/mL ; khoảng 40mg/mL ; khoảng 45mg/mL ; khoảng 50mg/mL ; khoảng 55mg/mL ; khoảng 60mg/mL ; khoảng 65mg/mL ; khoảng 70mg/mL ; khoảng 75mg/mL ; khoảng 80mg/mL ; khoảng 85mg/mL ; khoảng 90mg/mL ; khoảng 95mg/mL ; khoảng 100mg/mL ; khoảng 105mg/mL ; khoảng 110mg/mL ; khoảng 115mg/mL ; khoảng 120mg/mL ; khoảng 125mg/mL ; khoảng 130mg/mL ; khoảng 135mg/mL ; khoảng 140mg/mL ; khoảng 145mg/mL ; khoảng 150mg/mL ; khoảng 155mg/mL ; khoảng 160mg/mL ; khoảng 165mg/mL ; khoảng 170mg/mL ; khoảng 175mg/mL ; khoảng 180mg/mL ; khoảng 185mg/mL ; khoảng 190mg/mL ; khoảng 195mg/mL ; khoảng 200mg/mL ; khoảng 205mg/mL ; khoảng 210mg/mL ; khoảng 215mg/mL ; khoảng 220mg/mL ; khoảng 225mg/mL ; khoảng 230mg/mL ; khoảng 235mg/mL ; khoảng 240mg/mL ; khoảng 245mg/mL ; hoặc khoảng 250mg/mL .

Tá dược và độ pH

Dược phẩm theo sáng chế chứa một hoặc nhiều tá dược. Thuật ngữ "tá dược", như được sử dụng ở đây, có nghĩa là chất không dùng để điều trị được bổ sung vào dược phẩm nhằm thu được độ đặc, độ nhớt hoặc tác dụng làm ổn định mong muốn.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế chứa ít nhất một đồng dung môi hữu cơ với lượng và với loại làm ổn định kháng thể kháng PD-1 của người trong các điều kiện khuấy hoặc xử lý sơ bộ, như, *ví dụ*, xoáy mạnh. Theo một vài phương án, thuật ngữ "làm ổn định" có nghĩa là ngăn ngừa dược phẩm có không quá 3% kháng thể kết tụ trong tổng lượng kháng thể (trên cơ sở mol) trong suốt quá trình xử lý sơ bộ. Theo một vài phương án, xử lý sơ bộ là xoáy mạnh dung dịch

chứa kháng thể và đồng dung môi hữu cơ trong khoảng 60 phút hoặc khoảng 120 phút.

Theo các phương án nhất định, đồng dung môi hữu cơ là chất hoạt động bề mặt không ion, như alkyl poly(etylen oxit). Chất hoạt động bề mặt không ion cụ thể theo sáng chế là các polysorbat như polysorbat 20, polysorbat 28, polysorbat 40, polysorbat 60, polysorbat 65, polysorbat 80, polysorbat 81, và polysorbat 85; các poloxames như poloxame 181, poloxame 188, poloxame 407; hoặc polyetylen lycol (PEG). Polysorbat 20 cũng được biết đến là TWEEN 20, sorbitan monolaurat và polyoxyetylen sorbitan monolaurat. Poloxame 188 cũng được biết đến là PLURONIC F68.

Lượng chất hoạt động bề mặt không ion chứa trong dược phẩm theo sáng chế có thể khác nhau tùy thuộc vào các đặc tính cụ thể mong muốn có được ở dược phẩm, cũng như là các trường hợp và các mục đích cụ thể mà dược phẩm này dự định được sử dụng. Theo các phương án nhất định, dược phẩm này có thể chứa chất hoạt động bề mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ $0,01\% \pm 0,005\%$ đến $0,5\% \pm 0,25\%$. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa polysorbat 20 hoặc polysorbat 80 với nồng độ bằng khoảng $0,005\%$; khoảng $0,01\%$; khoảng $0,02\%$; khoảng $0,03\%$; khoảng $0,04\%$; khoảng $0,05\%$; khoảng $0,06\%$; khoảng $0,07\%$; khoảng $0,08\%$; khoảng $0,09\%$; khoảng $0,1\%$; khoảng $0,11\%$; khoảng $0,12\%$; khoảng $0,13\%$; khoảng $0,14\%$; khoảng $0,15\%$; khoảng $0,16\%$; khoảng $0,17\%$; khoảng $0,18\%$; khoảng $0,19\%$; khoảng $0,20\%$; khoảng $0,21\%$; khoảng $0,22\%$; khoảng $0,23\%$; khoảng $0,24\%$; khoảng $0,25\%$; khoảng $0,26\%$; khoảng $0,27\%$; khoảng $0,28\%$; khoảng $0,29\%$; khoảng $0,30\%$; khoảng $0,35\%$; khoảng $0,40\%$; khoảng $0,45\%$; khoảng $0,46\%$; khoảng $0,47\%$; khoảng $0,48\%$; khoảng $0,49\%$; khoảng $0,50\%$; khoảng $0,55\%$; hoặc khoảng $0,575\%$.

Dược phẩm theo sáng chế chứa một hoặc nhiều chất làm ổn định với loại và lượng mà làm ổn định kháng thể kháng PD-1 của người trong các điều kiện tác động nhiệt. Theo một vài phương án, thuật ngữ “làm ổn định” có nghĩa là hơn 91% kháng thể ở dạng cấu trúc nguyên thể khi dung dịch chứa kháng thể và chất làm ổn định nhiệt được duy trì ở nhiệt độ khoảng 45°C trong tối đa khoảng 28 ngày. Theo một vài phương án, “làm ổn định” có nghĩa là trong đó nhỏ hơn khoảng 6% kháng

thể bị kết tụ khi dung dịch chứa kháng thể và chất làm ổn định nhiệt được duy trì ở nhiệt độ khoảng 45°C trong tối đa khoảng 28 ngày. Như được sử dụng ở đây, “nguyên thể” có nghĩa là dạng chính của kháng thể theo phương pháp loại trừ theo kích thước, thường là monome nguyên vẹn của kháng thể. Thuật ngữ “nguyên thể” cũng được dùng để chỉ dạng không kết tụ và không bị thoái biến của kháng thể.

Chất làm ổn định nhiệt là sucroza, lượng chất làm ổn định nhiệt chứa trong dược phẩm có thể khác nhau tùy thuộc vào các trường hợp và mục đích sử dụng cụ thể mà dược phẩm này được sử dụng. Theo các phương án nhất định, dược phẩm này có thể chứa từ đường với nồng độ từ khoảng 1% đến khoảng 15%; đường với nồng độ từ khoảng 2% đến khoảng 14%; đường với nồng độ từ khoảng 3% đến khoảng 13%; đường với nồng độ từ khoảng 4% đến khoảng 12%; đường với nồng độ từ khoảng 5% đến khoảng 12%; đường với nồng độ từ khoảng 6% đến khoảng 11%; đường với nồng độ từ khoảng 7% đến khoảng 10%; đường với nồng độ từ khoảng 8% đến khoảng 11%; hoặc đường với nồng độ từ khoảng 9% đến khoảng 11%. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa đường (*ví dụ*, sucroza) với nồng độ $4\% \pm 0,8\%$; $5\% \pm 1\%$; $6\% \pm 1,2\%$; $7\% \pm 1,4\%$; $8\% \pm 1,6\%$; $9\% \pm 1,8\%$; $10\% \pm 2\%$; $11\% \pm 2,2\%$; $12\% \pm 2,4\%$; $13\% \pm 2,6\%$; hoặc khoảng $14\% \pm 2,8\%$.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa dung dịch đệm hoặc hệ dung dịch đệm, dùng để duy trì độ pH ổn định và làm ổn định kháng thể kháng PD-1 của người. Thuật ngữ “dung dịch đệm” như được sử dụng ở đây có nghĩa là dung dịch đệm được dùng để duy trì độ pH ổn định hoặc không làm thay đổi độ pH của dung dịch. Theo sáng chế, dung dịch đệm bao gồm histidin. Trong trường hợp sáng chế, “dung dịch đệm histidin” hoặc “dung dịch đệm chứa histidin” là dung dịch đệm chứa axit amin histidin. Ví dụ về dung dịch đệm histidin bao gồm histidin clorua, histidin axetat, histidin phosphat, và histidin sulfat. Theo phương án được ưu tiên, dung dịch đệm histidin được điều chế bằng cách hòa tan L-histidin và L-histidin hydroclorua (*ví dụ* dưới dạng monohydrat) với lượng và tỷ lệ xác định. Theo một phương án, dung dịch đệm histidin được điều chế bằng cách chuẩn độ L-histidin (bazơ tự do, dạng rắn) bằng axit clohydric loãng. Thuật ngữ “histidin” được sử dụng thay thế cho thuật ngữ “dung dịch đệm histidin” trong suốt bản mô tả sáng chế. Theo một vài phương án, “làm ổn định” có nghĩa là trong đó nhỏ hơn $4,5\% \pm 0,5\%$

kháng thể bị kết tụ khi dung dịch chứa kháng thể và dung dịch đệm được duy trì ở nhiệt độ khoảng 45°C trong tối đa khoảng 28 ngày. Theo một vài phương án, “làm ổn định” có nghĩa là trong đó nhỏ hơn $3\% \pm 0,5\%$ hoặc nhỏ hơn $2,5\% \pm 0,5\%$ kháng thể bị kết tụ khi dung dịch chứa kháng thể và dung dịch đệm được duy trì ở nhiệt độ khoảng 37°C trong tối đa khoảng 28 ngày. Theo một vài phương án, “làm ổn định” có nghĩa là trong đó ít nhất $93\% \pm 0,5\%$ hoặc ít nhất $94\% \pm 0,5\%$ kháng thể là ở dạng cấu trúc nguyên thể như được xác định bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước khi dung dịch chứa kháng thể và dung dịch đệm được duy trì ở nhiệt độ khoảng 45°C trong tối đa khoảng 28 ngày. Theo một vài phương án, “làm ổn định” có nghĩa là trong đó ít nhất $94\% \pm 0,5\%$ hoặc ít nhất $95\% \pm 0,5\%$ kháng thể là ở dạng cấu trúc nguyên thể như được xác định bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước khi dung dịch chứa kháng thể và dung dịch đệm được duy trì ở nhiệt độ khoảng 37°C trong tối đa khoảng 28 ngày. Thuật ngữ “nguyên thể” hoặc “cấu trúc nguyên thể”, có nghĩa là đoạn kháng thể không bị kết tụ hoặc bị thoái biến. Cấu trúc này thường được xác định bởi thử nghiệm đo kích thước tương đối của kháng thể, như thử nghiệm sắc ký loại trừ theo kích thước. Kháng thể không bị kết tụ và không bị thoái biến giải hấp ở phân đoạn mà làm cân bằng kháng thể nguyên thể, và thường là phân đoạn giải hấp chính. Kháng thể kết tụ giải hấp ở phân đoạn mà có kích thước lớn hơn kháng thể nguyên thể. Kháng thể thoái biến giải hấp ở phân đoạn có kích thước nhỏ hơn kháng thể nguyên thể.

Theo một vài phương án, “làm ổn định” có nghĩa là trong đó ít nhất $35\% \pm 0,5\%$ kháng thể là ở dạng mang điện tích chính như được xác định bởi sắc ký trao đổi cation khi dung dịch chứa kháng thể và dung dịch đệm được duy trì ở nhiệt độ khoảng 45°C trong tối đa khoảng 28 ngày. Theo một vài phương án, “làm ổn định” có nghĩa là trong đó ít nhất $46\% \pm 0,5\%$ hoặc ít nhất $39\% \pm 0,5\%$ kháng thể là ở dạng mang điện tích chính như được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi cation khi dung dịch chứa kháng thể và dung dịch đệm được duy trì ở nhiệt độ khoảng 37°C trong tối đa khoảng 28 ngày. Thuật ngữ “mang điện chủ yếu” hoặc “dạng mang điện tích chính”, có nghĩa là phân đoạn kháng thể giải hấp khỏi nhựa

trao đổi ion ở đỉnh chính, mà thường được nằm cạnh bởi các đỉnh “bazo” nhiều hơn ở một phía và các đỉnh “axit” nhiều hơn ở phía còn lại.

Dược phẩm theo sáng chế có độ pH bằng $6,0 \pm 0,3$.

Dung dịch đệm bao gồm dung dịch đệm histidin. Theo các phương án nhất định, dung dịch đệm histidin có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ $5\text{mM} \pm 1\text{mM}$ đến $15\text{mM} \pm 3\text{mM}$; $6\text{mM} \pm 1,2\text{mM}$ đến $14\text{mM} \pm 2,8\text{mM}$; $7\text{mM} \pm 1,4\text{mM}$ đến $13\text{mM} \pm 2,6\text{mM}$; $8\text{mM} \pm 1,6\text{mM}$ đến $12\text{mM} \pm 2,4\text{mM}$; $9\text{mM} \pm 1,8\text{mM}$ đến $11\text{mM} \pm 2,2\text{mM}$; $10\text{mM} \pm 2\text{mM}$; hoặc khoảng 10mM. Theo các phương án nhất định, hệ dung dịch đệm bao gồm histidin ở nồng độ $10\text{mM} \pm 2\text{mM}$, ở độ pH bằng $6,0 \pm 0,3$. Theo các phương án được ưu tiên, dung dịch đệm histidin bao gồm L-histidin và L-histidin monohydroclorua monohydrat. Theo một phương án, dung dịch đệm histidin bao gồm L-histidin ở nồng độ bằng $4,8\text{mM} \pm 0,96\text{mM}$. Theo một phương án, dung dịch đệm histidin bao gồm L-histidin monohydroclorua monohydrat ở nồng độ bằng $5,2\text{mM} \pm 1,04\text{mM}$. Theo một phương án, dung dịch đệm histidin bao gồm L-histidin ở nồng độ bằng $4,8\text{mM} \pm 0,96\text{mM}$ và L-histidin monohydroclorua monohydrat ở nồng độ bằng $5,2\text{mM} \pm 1,04\text{mM}$.

Dược phẩm theo sáng chế cũng chứa một hoặc nhiều tá dược đóng vai trò duy trì độ nhớt thấp hoặc làm giảm độ nhớt của dược phẩm chứa dược chất là kháng thể kháng PD-1 với nồng độ cao (ví dụ, kháng thể nói chung có nồng độ $\geq 150\text{mg/mL}$). Chất cải biến độ nhớt là prolin. Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế chứa L-prolin, ở nồng độ bằng 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% hoặc 5%. Thuật ngữ “prolin” được sử dụng thay thế cho “L-prolin” trong suốt bản mô tả sáng chế. Theo một vài phương án, dược phẩm chứa prolin với lượng đủ để duy trì độ nhớt của dược phẩm ở nhỏ hơn 20 ± 3 cPoise, nhỏ hơn $15 \pm 2,25$ cPoise, hoặc nhỏ hơn $11 \pm 1,65$ cPoise. Theo một vài phương án, dược phẩm chứa prolin với lượng đủ để duy trì độ nhớt bằng hoặc thấp hơn $15 \pm 2,25$ cPoise. Theo các phương án nhất định, dược phẩm có thể chứa prolin với nồng độ từ khoảng 1% đến khoảng 5%; prolin với nồng độ từ khoảng 2% đến khoảng 4%; hoặc prolin ở nồng độ khoảng 3%. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa prolin với nồng độ

1%± 0,2%; 1,5% ± 0,3%; 2% ± 0,4%; 2,5% ± 0,5%; 3% ± 0,6%; 3,5% ± 0,7%; 4% ± 0,8%; 4,5% ± 0,9%; hoặc khoảng 5% ± 1%.

Trong suốt quá trình tinh chế kháng thể có thể mong muốn hoặc cần thay đổi một dung dịch đệm bằng một dung dịch đệm khác để thu được nồng độ tá dược, nồng độ kháng thể, độ pH thích hợp, v.v.. Có thể tiến hành thay đổi dung dịch đệm, *ví dụ*, bằng cách sử dụng quá trình siêu lọc/lọc thẩm tách (ultrafiltration/diafiltration-UF/DF), *ví dụ*, sử dụng màng lọc dòng chảy tiếp tuyến bán thấm. Tuy nhiên, việc sử dụng các kỹ thuật này có khả năng gây ra hiệu ứng Gibbs-Donnan [Bolton et al., 2011, Biotechnol. Prog. 27(1):140-152]. Sự tăng dần điện tích dương ở phía sản phẩm của màng trong quá trình cô protein được làm cân bằng điện tích bằng cách ưu tiên dịch chuyển ion dương về phía đối diện của màng. Hiện tượng này có thể dẫn đến kết quả là nồng độ cuối của các thành phần nhất định (*ví dụ*, histidin, L-prolin, v.v.) có thể thấp hơn nồng độ đích mong muốn của các thành phần này do lực đẩy tĩnh điện của các dung dịch đệm tá dược lọc thẩm tách mang điện tích dương về phía protein kháng thể mang điện tích dương trong suốt bước UF/DF. Do đó, sáng chế đề xuất dược phẩm trong đó nồng độ của, *ví dụ*, histidin và/hoặc L-prolin khác so với lượng hoặc khoảng được viện dẫn ở đây do hiệu ứng Gibbs-Donnan.

Việc loại thể tích cho biết đặc tính của các mẫu được cô đặc trong đó một phần đáng kể của tổng thể tích của dung dịch được chiếm bởi chất tan, đặc biệt là các phân tử lớn như protein, ngoại trừ dung môi từ khoảng không này. Sau đó việc loại này làm giảm tổng thể tích dung môi dùng để hòa tan các chất tan khác, mà có thể dẫn đến sự phân chia không đều qua màng siêu lọc. Do đó, sáng chế đề xuất dược phẩm trong đó nồng độ của, *ví dụ*, histidin và/hoặc L-prolin có thể khác so với lượng hoặc khoảng được đề cập ở đây do tác động của việc loại thể tích.

Trong quá trình sản xuất dược phẩm theo sáng chế, các thay đổi về thành phần của dược phẩm có thể xảy ra. Các thay đổi này có thể bao gồm nồng độ của hoạt chất, nồng độ của tá dược, và/hoặc độ pH của dược phẩm. Do sự thay đổi về thông số bất kỳ trong số các thông số này có thể tác động đến độ ổn định hoặc hiệu lực của sản phẩm dược phẩm, nên các nghiên cứu về khoảng dược dụng đã được chứng minh (proven acceptable range-PAR) đã được tiến hành để đánh giá liệu các

thay đổi về thành phần, trong khoảng xác định, có làm ảnh hưởng đến độ ổn định hoặc hiệu lực của kháng thể hay không. Do đó, sáng chế đề xuất được phẩm chứa các kháng thể kháng PD-1 mà ổn định và vẫn có hiệu lực khi nồng độ tá dược bị thay đổi 50%. Ví dụ, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể kháng PD-1, trong đó độ ổn định và hiệu lực của dược phẩm không bị ảnh hưởng khi thay đổi $\pm 10\%$, $\pm 20\%$, $\pm 30\%$, $\pm 40\%$ hoặc $\pm 50\%$ nồng độ kháng thể, sucroza, dung dịch đệm histidin và/hoặc polysorbat.

Độ ổn định và độ nhót của dược phẩm

Dược phẩm theo sáng chế thường có độ ổn định cao. Thuật ngữ "ổn định", như được sử dụng ở đây có viện dẫn đến dược phẩm, có nghĩa là các kháng thể trong dược phẩm vẫn có cấu trúc hóa học hoặc chức năng sinh học ở mức chấp nhận được sau khi bảo quản trong các điều kiện xác định. Dược phẩm có thể vẫn ổn định ngay cả khi kháng thể chứa trong dược phẩm này không duy trì được 100% cấu trúc hóa học của nó hoặc chức năng sinh học sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định. Trong các trường hợp nhất định, việc duy trì được khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98% hoặc khoảng 99% cấu trúc kháng thể hoặc chức năng sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định có thể được coi là "ổn định".

Độ ổn định có thể đo được, không kể kỹ thuật khác, bằng cách xác định tỷ lệ phần trăm kháng thể nguyên thể mà có trong dược phẩm sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định ở nhiệt độ xác định. Tỷ lệ phần trăm kháng thể nguyên thể có thể được xác định bằng cách, không kể kỹ thuật khác, sắc ký loại trừ theo kích thước (ví dụ, sắc ký lỏng siêu hiệu năng loại trừ theo kích thước (size exclusion ultra performance liquid chromatography-SE-UPLC), để nguyên thể có nghĩa là không kết tụ và không thoái biến. "Độ ổn định chấp nhận được", như thuật ngữ này được sử dụng ở đây, có nghĩa là ít nhất 90% dạng nguyên thể của kháng thể có thể được phát hiện trong dược phẩm sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian nhất định ở nhiệt độ nhất định. Theo các phương án nhất định, ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% dạng nguyên thể của kháng thể có thể được phát hiện trong dược phẩm sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định ở nhiệt độ xác định. Khoảng thời gian xác định để đo độ

ổn định có thể là ít nhất 14 ngày, ít nhất 28 ngày, ít nhất 1 tháng, ít nhất 2 tháng, ít nhất 3 tháng, ít nhất 4 tháng, ít nhất 5 tháng, ít nhất 6 tháng, ít nhất 7 tháng, ít nhất 8 tháng, ít nhất 9 tháng, ít nhất 10 tháng, ít nhất 11 tháng, ít nhất 12 tháng, ít nhất 18 tháng, ít nhất 24 tháng, hoặc nhiều hơn 24 tháng. Nhiệt độ xác định để bảo quản dược phẩm khi đánh giá độ ổn định có thể là nhiệt độ bất kỳ nằm trong khoảng từ khoảng -80°C đến khoảng 45°C, ví dụ, bảo quản ở khoảng -80°C, khoảng -30°C, khoảng -20°C, khoảng 0°C, khoảng 4°-8°C, khoảng 5°C, khoảng 25°C, khoảng 35°C, khoảng 37°C, hoặc khoảng 45°C. Ví dụ, dược phẩm có thể được coi là ổn định nếu sau 6 tháng bảo quản ở 5°C, lớn hơn khoảng 95%, 96%, 97% hoặc 98% kháng thể nguyên thể được phát hiện bằng SE-UPLC. Dược phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau 6 tháng bảo quản ở 25°C, lớn hơn khoảng 95%, 96%, 97% hoặc 98% kháng thể nguyên thể được phát hiện bởi SE-UPLC. Dược phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau 28 ngày bảo quản ở 45°C, lớn hơn khoảng 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% hoặc 96% kháng thể nguyên thể được phát hiện bởi SE-UPLC. Dược phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau 12 tháng bảo quản ở -20°C, lớn hơn khoảng 96%, 97%, hoặc 98% kháng thể nguyên thể được phát hiện bởi SE-UPLC. Dược phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau 12 tháng bảo quản ở -30°C, lớn hơn khoảng 96%, 97% hoặc 98% kháng thể nguyên thể được phát hiện bởi SE-UPLC. Một dược phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau 12 tháng bảo quản ở -80°C, lớn hơn khoảng 96%, 97% hoặc 98% kháng thể nguyên thể được phát hiện bởi SE-UPLC.

Độ ổn định có thể được đo, *không kể kỹ thuật khác*, bằng cách xác định tỷ lệ phần trăm kháng thể mà tạo kết tụ trong dược phẩm sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định ở nhiệt độ xác định, trong đó độ ổn định tỷ lệ nghịch với tỷ lệ phần trăm kết tụ tạo thành. Tỷ lệ phần trăm của kháng thể kết tụ có thể được xác định bằng, *không kể kỹ thuật khác*, sắc ký loại trừ theo kích thước (ví dụ, sắc ký lỏng siêu hiệu năng loại trừ theo kích thước [SE-UPLC]). Thuật ngữ "mức ổn định chấp nhận được", như được sử dụng ở đây, có nghĩa là nhiều nhất 5% kháng thể là ở dạng kết tụ (cũng được gọi là dạng có khối lượng phân tử cao – HMW) được phát hiện trong dược phẩm sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định ở nhiệt độ xác định. Theo các phương án nhất định mức độ ổn định chấp nhận được có

nghĩa là nhiều nhất khoảng 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, hoặc 0,1% kháng thể có thể được phát hiện ở dạng kết tụ trong dược phẩm sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian nhất định ở nhiệt độ nhất định. Khoảng thời gian xác định để đo độ ổn định có thể là ít nhất 2 tuần, ít nhất 28 ngày, ít nhất 1 tháng, ít nhất 2 tháng, ít nhất 3 tháng, ít nhất 4 tháng, ít nhất 5 tháng, ít nhất 6 tháng, ít nhất 7 tháng, ít nhất 8 tháng, ít nhất 9 tháng, ít nhất 10 tháng, ít nhất 11 tháng, ít nhất 12 tháng, ít nhất 18 tháng, ít nhất 24 tháng, hoặc nhiều hơn. Nhiệt độ bảo quản dược phẩm khi đánh giá độ ổn định có thể là nhiệt độ bất kỳ nằm trong khoảng từ khoảng -80°C đến khoảng 45°C, ví dụ, bảo quản ở khoảng -80°C, khoảng -30°C, khoảng -20°C, khoảng 0°C, khoảng 4°-8°C, khoảng 5°C, khoảng 25°C, khoảng 35°C, khoảng 37°C hoặc khoảng 45°C. Ví dụ, dược phẩm có thể được coi là ổn định nếu sau 12 tháng bảo quản ở 5°C, nhỏ hơn khoảng 2%, 1%, 0,5%, hoặc 0,1% kháng thể được phát hiện ở dạng kết tụ. Dược phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau ba tháng bảo quản ở 25°C, nhỏ hơn khoảng 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, hoặc 0,1% kháng thể được phát hiện ở dạng kết tụ. Dược phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau 28 ngày bảo quản ở 45°C, nhỏ hơn khoảng 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, hoặc 0,5%, kháng thể được phát hiện ở dạng kết tụ. Dược phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau ba tháng bảo quản ở -20°C, -30°C, hoặc -80°C nhỏ hơn khoảng 3%, 2%, 1%, 0,5%, hoặc 0,1% kháng thể được phát hiện ở dạng kết tụ.

Độ ổn định có thể được đo, *không kể kỹ thuật khác*, bằng cách xác định tỷ lệ phần trăm kháng thể mà di chuyển ở phân đoạn axit nhiều hơn trong quá trình trao đổi ion ("dạng axit") so với phân đoạn chính của kháng thể ("dạng mang điện tích chính"), trong đó độ ổn định tỷ lệ nghịch với phân đoạn kháng thể ở dạng axit. Trong khi không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, việc khử amit kháng thể có thể khiến cho kháng thể trở nên mang điện tích âm nhiều hơn và do đó có tính axit nhiều hơn so với kháng thể không được khử amit (xem tài liệu, ví dụ, Robinson, N., Protein Deamidation, *PNAS*, April 16, 2002, 99(8):5283-5288). Tỷ lệ phần trăm của kháng thể "được axit hóa" có thể được xác định bằng, *không kể kỹ thuật khác*, sắc ký trao đổi ion (ví dụ, sắc ký lỏng siêu hiệu năng trao đổi cation [CEX-UPLC]). Thuật ngữ "mức ổn định chấp nhận được", như được sử dụng ở đây, có nghĩa là nhiều nhất 45% kháng thể là ở dạng axit được phát hiện trong dược phẩm sau khi

bảo quản trong một khoảng thời gian xác định ở nhiệt độ xác định. Theo các phương án nhất định, mức ổn định chấp nhận được có nghĩa là nhiều nhất khoảng 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, hoặc 0,1% kháng thể có thể được phát hiện ở dạng axit trong dược phẩm sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định ở nhiệt độ xác định. Theo một phương án, mức ổn định chấp nhận được có nghĩa là nhỏ hơn 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, hoặc 0,1% kháng thể có thể được phát hiện ở dạng axit trong dược phẩm sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định ở nhiệt độ xác định. Khoảng thời gian xác định để đo độ ổn định có thể là ít nhất 2 tuần, ít nhất 28 ngày, ít nhất 1 tháng, ít nhất 2 tháng, ít nhất 3 tháng, ít nhất 4 tháng, ít nhất 5 tháng, ít nhất 6 tháng, ít nhất 7 tháng, ít nhất 8 tháng, ít nhất 9 tháng, ít nhất 10 tháng, ít nhất 11 tháng, ít nhất 12 tháng, ít nhất 18 tháng, ít nhất 24 tháng, hoặc nhiều hơn 24 tháng. Nhiệt độ bảo quản dược phẩm khi đánh giá độ ổn định có thể là nhiệt độ bất kỳ nằm trong khoảng từ -80°C đến 45°C, ví dụ, bảo quản ở -80°C, khoảng -30°C, khoảng -20°C, khoảng 0°C, khoảng 4°-8°C, khoảng 5°C, khoảng 25°C, hoặc khoảng 45°C. Ví dụ, dược phẩm có thể được coi là ổn định nếu sau 3 tháng bảo quản ở -80°C, -30°C, hoặc -20°C nhỏ hơn khoảng 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% hoặc 0,1% kháng thể là ở dạng axit. Dược phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau sáu tháng bảo quản ở 5°C, lượng kháng thể ở dạng axit là nhỏ hơn khoảng 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% hoặc 0,1%. Dược phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau sáu tháng bảo quản ở 25°C, lượng kháng thể ở dạng axit là nhỏ hơn khoảng 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% hoặc 0,1%. Dược phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau 28 ngày bảo quản ở 45°C, nhỏ hơn khoảng 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%,

15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% hoặc 0,1% kháng thể có thể được phát hiện ở dạng axit nhiều hơn.

Các phương pháp khác có thể được sử dụng để đánh giá độ ổn định của dược phẩm theo sáng chế như, *ví dụ*, phép đo nhiệt lượng bằng tia quét vi phân (differential scanning calorimetry-DSC) để xác định độ ổn định nhiệt, khuấy có kiểm soát để xác định độ ổn định cơ học, và đo phổ hấp thụ ở bước sóng khoảng 350nm hoặc khoảng 405nm để xác định độ đục của dung dịch. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể được coi là ổn định nếu, sau 6 hoặc nhiều hơn 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ nằm trong từ 5°C đến khoảng 25°C, mức thay đổi OD₄₀₅ của dược phẩm là nhỏ hơn khoảng 0,05 (*ví dụ*, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, hoặc nhỏ hơn) so với OD₄₀₅ của dược phẩm ở thời điểm ban đầu.

Cũng có thể đo hoạt tính sinh học hoặc ái lực gắn kết của kháng thể với đích của nó để đánh giá độ ổn định. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể được coi là ổn định nếu, sau khi bảo quản ở *ví dụ*, 5°C, 25°C, 45°C, v.v. trong một khoảng thời gian xác định (*ví dụ*, 1 đến 12 tháng), kháng thể kháng PD-1 chứa trong dược phẩm gắn kết với PD-1 với ái lực bằng ít nhất 90%, 95%, hoặc nhiều hơn 95% ái lực gắn kết của kháng thể trước khi bảo quản. Ái lực gắn kết có thể được xác định bằng *ví dụ*, thử nghiệm ELISA hoặc phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt. Hoạt tính sinh học có thể được xác định bằng thử nghiệm đo hoạt tính PD-1, như *ví dụ*, cho tế bào biểu hiện PD-1 tiếp xúc với dược phẩm chứa kháng thể kháng PD-1. Việc gắn kết của kháng thể với tế bào này có thể được đo trực tiếp, như *ví dụ*, bằng phân tích FACS. Theo cách khác, hoạt động sau này của của hệ PD-1 có thể được đo khi có mặt kháng thể, và được so sánh với hoạt tính của hệ PD-1 khi không có mặt kháng thể. Theo một vài phương án, PD-1 có thể là có nguồn gốc nội sinh trong tế bào. Theo các phương án khác, PD-1 có thể được biểu hiện lạc vị trong tế bào.

Các phương pháp khác đánh giá độ ổn định của kháng thể trong dược phẩm được trình bày trong phần ví dụ được thể hiện dưới đây.

Dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể, theo các phương án nhất định, có độ nhớt từ kém đến vừa phải. "Độ nhớt" như được sử dụng ở đây có thể là "độ nhớt động học" hoặc "độ nhớt tuyệt đối". "Độ nhớt động học" là số đo dòng cản trở của chất lỏng dưới tác động của trọng lực. Nếu hai chất lỏng có thể tích bằng nhau

được cho vào các nhớt kế mao quản giống nhau và được để chảy theo trọng lực, thì chất lỏng có độ nhớt cần thời gian chảy qua mao quản nhiều hơn so với chất lỏng có độ nhớt kém hơn. Ví dụ, nếu một chất lỏng cần 200 giây để chảy qua và chất lỏng khác cần 400 giây, thì chất lỏng thứ hai này có độ nhớt gấp hai lần so với chất lỏng thứ nhất theo thang độ nhớt động học. "Độ nhớt tuyệt đối", đôi khi được gọi là độ nhớt động lực hoặc độ nhớt đơn giản, là kết quả của độ nhớt động học và khối lượng riêng chất lỏng (Độ nhớt tuyệt đối = Độ nhớt động học x khối lượng riêng). Số đo độ nhớt động học là L^2/T , trong đó L là chiều dài và T là thời gian. Nói chung, độ nhớt động học được biểu thị dưới dạng centistoke (cSt). Đơn vị SI của độ nhớt động học là mM^2/s , mà là 1 cSt. Độ nhớt tuyệt đối được biểu thị bằng đơn vị centipoise (cP). Đơn vị SI của độ nhớt tuyệt đối là milliPascal-giây (mPa-s), trong đó $1\text{ cP} = 1\text{ mPa-s}$.

Như được sử dụng ở đây, mức độ nhớt thấp, đối với dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế, sẽ có độ nhớt tuyệt đối nhỏ hơn khoảng 20 cPoise (cP). Ví dụ, dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế sẽ được coi là có "độ nhớt thấp", nếu khi đo bằng các kỹ thuật đo độ nhớt chuẩn, dược phẩm có độ nhớt tuyệt đối bằng khoảng 20 cP, khoảng 19 cP, khoảng 18 cP, khoảng 15 cP, khoảng 12 cP, khoảng 10 cP, khoảng 9 cP, khoảng 8 cP, hoặc thấp hơn. Như được sử dụng ở đây, mức độ nhớt vừa phải, đối với dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế, sẽ có độ nhớt tuyệt đối nằm trong khoảng từ 35 cP đến khoảng 20 cP. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế sẽ được coi là có "độ nhớt vừa phải", nếu được đo bằng các kỹ thuật đo độ nhớt chuẩn, dược phẩm có độ nhớt tuyệt đối bằng khoảng 34 cP, khoảng 33 cP, khoảng 32 cP, khoảng 31 cP, khoảng 30 cP, khoảng 29 cP, khoảng 28 cP, khoảng 27 cP, khoảng 26 cP, khoảng 25 cP, khoảng 24 cP, khoảng 23 cP, khoảng 22 cP, khoảng 21 cP, khoảng 20 cP, khoảng 19 cP, 18 cP, khoảng 17 cP, khoảng 16 cP, hoặc khoảng 15,1 cP.

Như được minh họa trong các ví dụ dưới đây, các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng dược phẩm dạng lỏng có độ nhớt thấp chứa kháng thể kháng PD-1 của người với nồng độ cao (ví dụ, nằm trong khoảng từ khoảng 50mg/mL lên đến 250mg/mL) có thể được sản xuất bằng cách bào chế kháng thể với prolin với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1% đến khoảng 5% và sucroza với nồng độ khoảng 5%. Các dược phẩm này ổn định với tác động trong quá trình xử lý và bảo

quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45°C đến -80°C (được thể hiện dưới đây) và có độ nhớt thấp (có độ nhớt nằm trong khoảng từ 7 đến 15cP).

Các dược phẩm được lấy làm ví dụ

Theo một khía cạnh của sáng chế, dược phẩm này thường là dược phẩm dạng lỏng đẳng trương về mặt sinh lý, ổn định, có độ nhớt thấp, chứa: (i) kháng thể người gắn kết đặc hiệu với PD-1 của người (ví dụ, H4H7798N), có nồng độ lên đến 250mg/mL $\pm$ 45mg/mL; (ii) hệ dung dịch đệm histidin mà đủ khả năng tạo đệm ở khoảng pH 6,0 $\pm$ 0,3; (iii) đồng dung môi hữu cơ, mà bảo vệ tính nguyên vẹn về cấu trúc của kháng thể; (iv) chất ổn định nhiệt là đường; và (v) chất cải biến độ nhớt là axit amin, dùng để duy trì độ nhớt có thể kiểm soát được để tiêm với một thể tích thích hợp khi dùng dưới da.

Theo một phương án, dược phẩm ổn định, có độ nhớt thấp chứa: (i) kháng thể IgG4 của người gắn kết đặc hiệu với PD-1 người, và chứa HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 3, HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 4, HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 5, LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 6, LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 7, và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 8, có nồng độ lên đến 200mg/mL $\pm$ 30mg/mL; (ii) dung dịch đệm histidin ở nồng độ 10mM $\pm$ 2mM, đệm ở pH 6,0 $\pm$ 0,3; (iii) polysorbat 80 ở nồng độ 0,2% w/v $\pm$ 0,1% w/v; (iv) sucroza ở nồng độ 5% $\pm$ 1% w/v; và (v) L-prolin ở nồng độ 1,5% (w/v) $\pm$ 0,3%.

Theo một phương án, dược phẩm ổn định có độ nhớt thấp chứa: (i) kháng thể IgG4 của người gắn kết đặc hiệu với PD-1 người, và chứa HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 3, HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 4, HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 5, LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 6, LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 7, và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 8, có nồng độ bằng 175mg/mL $\pm$ 26,25mg/mL; (ii) dung dịch đệm histidin ở nồng độ 10mM $\pm$ 2mM, đệm ở pH 6,0 $\pm$ 0,3; (iii) polysorbat 80 ở nồng độ 0,2% w/v $\pm$ 0,1% w/v; (iv) sucroza ở nồng độ 5% $\pm$ 1% w/v; và (v) L-prolin ở nồng độ 1,5% (w/v) $\pm$ 0,3%.

Theo một phương án, dược phẩm ổn định có độ nhớt thấp chứa: (i) kháng thể IgG4 của người gắn kết đặc hiệu với PD-1 người, và chứa HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 3, HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 4, HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 5,

LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 6, LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 7, và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 8, có nồng độ bằng $150\text{mg/mL} \pm 22,5\text{mg/mL}$; (ii) dung dịch đệm histidin ở nồng độ $10\text{mM} \pm 2\text{mM}$, đệm ở pH $6,0 \pm 0,3$; (iii) polysorbat 80 ở nồng độ $0,2\% \text{ w/v} \pm 0,1\% \text{ w/v}$; (iv) sucroza ở nồng độ $5\% \pm 1\% \text{ w/v}$; và (v) L-prolin ở nồng độ $1,5\% \text{ (w/v)} \pm 0,3\%$.

Theo một phương án, dược phẩm ổn định có độ nhớt thấp chứa: (i) kháng thể IgG4 của người gắn kết đặc hiệu với PD-1 người, và chứa HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 3, HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 4, HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 5, LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 6, LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 7, và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 8, có nồng độ bằng $100\text{mg/mL} \pm 15\text{mg/mL}$; (ii) dung dịch đệm histidin ở nồng độ $10\text{mM} \pm 2\text{mM}$, đệm ở pH $6,0 \pm 0,3$; (iii) sucroza ở nồng độ $5\% \text{ w/v} \pm 1\% \text{ w/v}$; (iv) polysorbat 80 ở nồng độ $0,2\% \text{ w/v} \pm 0,1\%$; và L-prolin ở nồng độ $1,5\% \text{ (w/v)} \pm 0,3\%$.

Theo một phương án, dược phẩm ổn định có độ nhớt thấp chứa: (i) kháng thể IgG4 của người gắn kết đặc hiệu với PD-1 người, và chứa HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 3, HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 4, HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 5, LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 6, LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 7, và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 8, có nồng độ bằng $50\text{mg/mL} \pm 7,5\text{mg/mL}$; (ii) dung dịch đệm histidin ở nồng độ $10\text{mM} \pm 2\text{mM}$, đệm ở pH $6,0 \pm 0,3$; (iii) sucroza ở nồng độ $5\% \text{ w/v} \pm 1\% \text{ w/v}$; (iv) polysorbat 80 ở nồng độ $0,2\% \text{ w/v} \pm 0,1\%$; và L-prolin ở nồng độ $1,5\% \text{ (w/v)} \pm 0,3\%$.

Theo một phương án, dược phẩm ổn định có độ nhớt thấp chứa: (i) kháng thể IgG4 của người gắn kết đặc hiệu với PD-1 người, và chứa HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 3, HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 4, HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 5, LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 6, LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 7, và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 8, có nồng độ bằng $25\text{mg/mL} \pm 3,75\text{mg/mL}$; (ii) dung dịch đệm histidin ở nồng độ $10\text{mM} \pm 2\text{mM}$, đệm ở pH $6,0 \pm 0,3$; (iii) sucroza ở nồng độ $5\% \text{ w/v} \pm 1\% \text{ w/v}$; (iv) polysorbat 80 ở nồng độ $0,2\% \text{ w/v} \pm 0,1\%$; và L-prolin ở nồng độ $1,5\% \text{ (w/v)} \pm 0,3\%$.

Các ví dụ khác không giới hạn về dược phẩm được bộc lộ trong sáng chế được nêu ở đây, kể cả các ví dụ thực hiện được trình bày dưới đây.

Đồ chứa và phương pháp sử dụng

Dược phẩm theo sáng chế có thể được đựng trong đồ chứa bất kỳ thích hợp để bảo quản thuốc và dược phẩm khác dùng để điều trị. Ví dụ, dược phẩm có thể được đựng trong đồ chứa bằng thủy tinh hoặc nhựa được đậy kín và được vô trùng có thể tích xác định như lọ, ống tiêm, bơm tiêm, hộp, hoặc chai. Các loại lọ khác có thể được sử dụng để đựng dược phẩm theo sáng chế bao gồm, *ví dụ*, các lọ thủy tinh hoặc nhựa trong và mờ (*ví dụ*, màu hổ phách). Tương tự, loại bơm tiêm bất kỳ cũng có thể được sử dụng để đựng hoặc sử dụng dược phẩm theo sáng chế.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được đựng trong bơm tiêm "vonfam thông thường" hoặc bơm tiêm "vonfam nhỏ". Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng, quy trình sản xuất bơm tiêm thủy tinh thường bao gồm việc sử dụng thanh vonfam nóng để xuyên qua thủy tinh nhờ đó tạo lỗ mà chất lỏng có thể được rút hoặc lấy ra khỏi bơm tiêm. Quy trình này làm cho một lượng rất nhỏ vonfam bám vào mặt trong của bơm tiêm. Các bước rửa và xử lý khác sau đó có thể được sử dụng để làm giảm lượng vonfam trong bơm tiêm. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vonfam" có nghĩa là bơm tiêm chứa vonfam với lượng lớn hơn hoặc bằng 500 phần tỷ (ppb). Thuật ngữ "vonfam thấp" có nghĩa là bơm tiêm chứa vonfam với lượng nhỏ hơn 500 ppb. Ví dụ, bơm tiêm có lượng vonfam thấp, theo sáng chế, có thể chứa vonfam với lượng nhỏ hơn khoảng 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 hoặc ít hơn 10 ppb.

Các pittong caosu được sử dụng trong bơm tiêm, và các nút caosu được sử dụng để đóng miệng lọ, có thể được phủ để ngăn ngừa sự tạp nhiễm các chất vào bơm tiêm hoặc lọ, hoặc để duy trì độ ổn định của chúng. Do đó, dược phẩm theo sáng chế, theo các phương án nhất định, có thể được chứa trong bơm tiêm có pittong được phủ, hoặc trong lọ được đậy bằng nút caosu được phủ. Ví dụ, pittong hoặc nút có thể được phủ màng flocarbon. Ví dụ về nút hoặc pittong được phủ thích hợp để sử dụng với các lọ và bơm tiêm chứa dược phẩm theo sáng chế được đề cập trong, *ví dụ*, các patent Mỹ số 4,997,423; 5,908,686; 6,286,699; 6,645,635; và

7,226,554. Các nút và pittong caosu được phủ được lấy làm ví dụ cụ thể có thể được sử dụng trong sáng chế là sẵn có trên thị trường dưới tên thương mại "FluroTec®", do West Pharmaceutical Services, Inc. (Lionville, PA) cung cấp. FluroTec® là một ví dụ về chất phủ flocacbon được sử dụng để làm giảm thiểu hoặc ngăn ngừa sản phẩm được phủ không bị dính bám vào bề mặt caosu.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, dược phẩm có thể được đựng trong bơm tiêm có hàm lượng vonfam thấp có pittong được phủ flocacbon.

Dược phẩm có thể được sử dụng cho bệnh nhân bằng các đường ngoài đường tiêu hóa như tiêm (ví dụ, dưới da, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, v.v..) hoặc qua da, qua niêm mạc, qua mũi, qua phổi hoặc sử dụng qua đường miệng. Nhiều thiết bị phân phối tiêm tự động hoặc bút tái sử dụng có thể được sử dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế dưới da. Ví dụ về các thiết bị và bút này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly và Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany). Ví dụ về bút dùng một lần hoặc các thiết bị phân phối tiêm tự động có các ứng dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế dưới da bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở bút SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và KWIKPEN™ (Eli Lilly), thiết bị tiêm tự động SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), the PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), và bút HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL).

Việc sử dụng thiết bị vi truyền để phân phối dược phẩm theo sáng chế cũng được bao gồm ở đây. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "thiết bị vi truyền" có nghĩa là thiết bị phân phối dưới da được thiết kế để sử dụng từ từ dược phẩm dùng để điều trị với thể tích lớn (ví dụ, lên tới khoảng 2,5mL hoặc nhiều hơn) trong một khoảng thời gian kéo dài (ví dụ, khoảng 10, 15, 20, 25, 30 hoặc nhiều hơn 30 phút). Xem tài liệu, ví dụ, patent Mỹ số US 6,629,949; US 6,659,982; và Meehan *et al.*, J.

Controlled Release 46:107-116 (1996). Các thiết bị vi truyền đặc biệt hữu dụng để phân phối các liều lớn của protein dùng để điều trị chứa trong dung dịch có độ nhớt hoặc nồng độ cao (ví dụ, khoảng 100, 125, 150, 175, 200 hoặc nhiều hơn mg/mL).

Theo các phương án nhất định, dược phẩm ổn định dạng lỏng theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên được chứa trong lọ thủy tinh vô trùng và được sử dụng làm dung dịch truyền tĩnh mạch.

Theo một phương án, đồ chứa là lọ thủy tinh borosilicat trong loại 1 có dung tích 20mL. Theo các phương án nhất định, đồ chứa là lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL, 5mL hoặc 10mL có nút bằng clorobutyl, với lớp bao FluroTec®.

Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế chứa mAb1 với nồng độ khoảng 25mg/mL hoặc 50mg/mL được sử dụng qua đường tĩnh mạch và có thể được đựng trong lọ thủy tinh.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất thiết bị tiêm tự động chứa dược phẩm dạng lỏng bất kỳ trong số các dược phẩm dạng lỏng được mô tả ở đây. Theo một vài phương án, sáng chế đề xuất thiết bị tiêm tự động chứa dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa mAb1 với nồng độ khoảng 50mg/mL, khoảng 100mg/mL, khoảng 150mg/mL hoặc khoảng 175mg/mL, histidin với nồng độ khoảng 10mM, ở pH bằng khoảng 6,0, sucroza với nồng độ khoảng 5%, prolin với nồng độ khoảng 1,5% và polysorbat 80 với nồng độ khoảng 0,2%.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất bơm tiêm nạp sẵn chứa dược phẩm dạng lỏng bất kỳ trong số các dược phẩm dạng lỏng được mô tả ở đây. Theo một vài phương án, sáng chế đề xuất bơm tiêm nạp sẵn chứa dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa mAb1 với nồng độ khoảng 50mg/mL, khoảng 100mg/mL, khoảng 150mg/mL hoặc khoảng 175mg/mL, histidin với nồng độ khoảng 10mM, ở pH bằng khoảng 6,0, sucroza với nồng độ khoảng 5%, prolin với nồng độ khoảng 1,5% và khoảng polysorbat 80 với nồng độ khoảng 0,2%. Theo các phương án nhất định, bơm tiêm là bơm tiêm thủy tinh dài có dung tích 1mL hoặc 2,25mL được gắn kim tiêm có thành mỏng 27-gauge, pittong caosu được phủ flocacbob và nắp kim tiêm bằng caosu.

Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng chứa mAb1 với nồng độ khoảng 175mg/mL $\pm$ 26,25mg/mL được sử dụng với thể tích xấp xỉ lên đến 2mL trong bơm

tiêm nạp sẵn. Theo các phương án nhất định, bơm tiêm là bơm tiêm thủy tinh dài có dung tích 1mL hoặc 2,25mL được lắp với một kim tiêm thành mỏng 27-gauge, pittong caosu được phủ flocacbon và nắp kim tiêm bằng caosu. Theo một phương án, bơm tiêm này là bơm tiêm thủy tinh dài có dung tích 1mL OMPI được lắp kim tiêm 27-gauge, nắp kim tiêm bằng caosu FM27, và pittong bằng caosu 4023/50 được phủ FLUROTEC®.

Theo một phương án, dược phẩm dạng lỏng chứa kháng thể kháng PD-1 với nồng độ khoảng 150mg/mL $\pm$ 22,5mg/mL được sử dụng với thể tích xấp xỉ lên đến 2mL trong bơm tiêm nạp sẵn. Theo một phương án, bơm tiêm này là bơm tiêm thủy tinh dài có dung tích 1mL hoặc 2,25mL được lắp kim tiêm có thành mỏng 27-gauge, pittong caosu được phủ flocacbon và nắp kim tiêm bằng caosu. Theo một phương án, bơm tiêm này là bơm tiêm thủy tinh dài có dung tích 1mL OMPI được lắp kim tiêm 27-gauge, nắp kim tiêm bằng caosu FM27, và pittong caosu 4023/50 được phủ FLUROTEC®.

Sử dụng dược phẩm để điều trị

Dược phẩm theo sáng chế là hữu dụng, không kể các khía cạnh khác, để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn bất kỳ có liên quan đến hoạt tính PD-1, bao gồm bệnh hoặc rối loạn qua trung gian PD-1. Các bệnh và rối loạn không giới hạn, được lấy làm ví dụ có thể được điều trị hoặc phòng ngừa bằng cách sử dụng dược phẩm theo sáng chế bao gồm các bệnh nhiễm virus, các bệnh tự miễn và các bệnh ung thư khác nhau như, *ví dụ*, bệnh ung thư não, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư da, các bệnh ung thư máu khác nhau, và bệnh ung thư niêm mạc tử cung.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được thể hiện để cung cấp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bản mô tả và phần mô tả đầy đủ về cách thức tiến hành và sử dụng các phương pháp và dược phẩm theo sáng chế, và không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các nỗ lực đã được tiến hành để đảm bảo độ chính xác của các con số được sử dụng (ví dụ, hàm lượng, nhiệt độ, v.v.)

nhưng cũng cần tính đến các sai số và độ lệch thử nghiệm. Trừ khi được quy định theo cách khác, các phần là các phần tính theo mol, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là tính theo độ bách phân, và áp suất là bằng hoặc gần bằng áp suất khí quyển.

Ví dụ 1: Phát triển dược phẩm chứa kháng thể kháng PD-1

Mục đích của các hoạt động bào chế là để phát triển dược phẩm có các thuộc tính sau:

- Dược phẩm dạng lỏng có nồng độ kháng thể kháng PD-1 đủ để phân phối một liều 250mg hoặc lớn hơn bằng cách truyền qua đường tĩnh mạch;
- Dược phẩm gần đẳng mol ổn định khi pha loãng với các chất pha loãng thường được sử dụng, *ví dụ*, dung dịch tiêm natri clorua 0,9% hoặc dung dịch tiêm dextroza 5%, để truyền qua đường tĩnh mạch;
- Dược phẩm tương thích với và ổn định trong lọ thủy tinh trong loại 1 và nút chuẩn làm bao bì; và
- Dung dịch sản phẩm dược phẩm vô trùng (drug product-DP) để giúp làm ổn định dược phẩm trong thời gian dài;
 - Dược phẩm làm giảm thiểu các dạng có khối lượng phân tử cao (high molecular weight-HMW) của kháng thể khi được xử lý và khi chịu tác động nhiệt;
 - Dược phẩm làm giảm thiểu các thay đổi về mức phân bố tương đối các dạng kháng thể mang điện tích khi phải chịu tác động nhiệt; và
 - Dược phẩm duy trì hoạt tính sinh học khi được xử lý và khi chịu tác động nhiệt.

Trong suốt quá trình phát triển dược phẩm, ba điều kiện thử nghiệm tác động chính đối với protein (là các điều kiện xử lý cực hạn mà thường không được áp dụng khi xử lý, sản xuất, vận chuyển, bảo quản và dẫn nhãn sản phẩm dược phẩm chứa kháng thể) được sử dụng để phát triển và tối ưu hóa dược phẩm kháng thể và để đánh giá ảnh hưởng của các tác động có thể có trong thế giới thực đến độ ổn định của sản phẩm dược phẩm. Các điều kiện tác động này bao gồm:

- Khuấy (xoáy mạnh) dung dịch protein ở nhiệt độ trong phòng. Xoáy mạnh trong lọ thủy tinh vượt quá tốc độ khuấy mà thường áp dụng khi xử lý và sản xuất protein.

- Ủ dung dịch protein ở nhiệt độ cao (37°C, 40°C hoặc 45°C) so với điều kiện bảo quản DP được đề xuất (2°C-8°C).

- Tiến hành nhiều chu kỳ đông lạnh rồi đông protein. Vì protein sẽ trải qua ít nhất một chu kỳ đông lạnh rồi đông trong quá trình sản xuất DP, nên nhiều chu kỳ đông lạnh rồi đông mô phỏng và vượt quá tác động thực tế mà protein này được cho là đã trải qua.

Có bốn mục đích chính đối với công việc phát triển dược phẩm ban đầu:

1. Chọn dung dịch đệm và pH: Việc lựa chọn dung dịch đệm và độ pH có thể có tác động lớn đến độ ổn định của protein, do đó việc quyết định loại dung dịch đệm tối ưu và độ pH là một quá trình quan trọng. Các nghiên cứu được trình bày trong các phần này để chứng minh lựa chọn dung dịch đệm tối ưu và độ pH cho kháng thể là hợp lý.

2. Chọn chất hoạt động bề mặt hoặc đồng dung môi hữu cơ: Chất hoạt động bề mặt hoặc đồng dung môi hữu cơ, như polysorbat, thường cần để ngăn ngừa sự kết tủa hoặc sự kết tụ của các protein khi khuấy. Protein hòa tan có thể được khuấy khi xử lý, lọc, trộn, sản xuất, vận chuyển và sử dụng. Dược chất kháng thể trong dung dịch được đệm đơn giản có thể bị đục rõ khi khuấy mạnh. Do đó, đã xác định được rằng việc làm ổn định protein để xử lý và khuấy là quan trọng.

3. Việc xác định/lựa chọn các tá dược làm ổn định/làm đẳng trương: Việc bổ sung đường, muối, và axit amin được kiểm tra về khả năng của chúng trong việc cải thiện độ ổn định của kháng thể với tác động nhiệt và khả năng làm tăng thời hạn sử dụng của DP. Tỷ lệ lượng các chất làm ổn định nhiệt được đưa vào, cũng như là các nghiên cứu xác định nồng độ tối ưu trong dược phẩm cuối được thể hiện ở đây.

4. Chọn nồng độ kháng thể: Tác động của nồng độ kháng thể đến độ ổn định của sản phẩm dược phẩm có các tá dược được chọn đã được đánh giá.

Các hoạt động phát triển dược phẩm ban đầu được tiến hành sử dụng kháng thể kháng PD-1 5- 50mg/mL và bao gồm sàng lọc đồng dung môi hữu cơ, chất làm ổn định nhiệt, và dung dịch đệm trong dược phẩm dạng lỏng chứa kháng thể kháng PD-1 để xác định các tá dược tương thích với protein và gia tăng độ ổn định của kháng thể, đồng thời vẫn duy trì được nồng độ mol gần sinh lý và độ nhớt thấp đối với các dung dịch tiêm tĩnh mạch và tiêm dưới da. Các điều kiện đệm cũng được đánh giá để xác định độ pH tối ưu để thu được độ ổn định protein tối đa (được mô tả trong các ví dụ 4, 6 và 7 ở đây).

Các kết quả thu được từ hoạt động phát triển dược phẩm ban đầu được sử dụng để phát triển dược phẩm ban đầu thích hợp sử dụng cho các nghiên cứu lâm sàng giai đoạn 1. Dược phẩm dùng trong nghiên cứu lâm sàng giai đoạn 1 cũng được đề xuất làm đối chứng để tối ưu hóa các dược phẩm thương mại và các dược phẩm dùng trong nghiên cứu lâm sàng giai đoạn sau.

Với kiến thức thu được từ việc phát triển dược phẩm ban đầu, các nghiên cứu phát triển dược phẩm giai đoạn sau bao gồm tối ưu hóa độ pH, nồng độ chất hoạt động bề mặt, và chất làm ổn định để xác định các tá dược làm tăng cường độ ổn định protein ở cả nồng độ protein cao và thấp (mAb1 với nồng độ lên đến 175mg/mL) (được mô tả trong các ví dụ 5, 8, 9, và 10).

Trong suốt quá trình phát triển dược phẩm, dược phẩm được đánh giá về độ ổn định khi chịu tác động và độ ổn định trong quá trình bảo quản. Các phương pháp được sử dụng để đánh giá độ ổn định trong các nghiên cứu phát triển dược phẩm được mô tả trong ví dụ 3 ở đây. Các ví dụ 11 và 12 mô tả độ ổn định trong quá trình bảo quản và độ ổn định khi chịu tác động của dược phẩm.

Ví dụ 13 mô tả độ ổn định của dược phẩm khi thay đổi lượng các tá dược nằm trong khoảng cụ thể.

Các kết quả thu được từ các nghiên cứu này được sử dụng để phát triển các dược phẩm dạng lỏng ổn định thích hợp để sử dụng trong lâm sàng, để sử dụng qua đường tĩnh mạch (intravenous-IV) hoặc sử dụng dưới da (subcutaneous-SC). Ví dụ 14 mô tả đồ chứa dùng để đựng các dược phẩm ở đây. Các ví dụ 15, 16 và 17 mô tả độ tương thích và độ ổn định của dược phẩm trong các lọ thủy tinh, bơm tiêm nạp

sẵn và thiết bị phân phối qua đường tĩnh mạch. Các dược phẩm như vậy đáp ứng được các mục đích được đặt ra để phát triển dược phẩm:

- Các dược phẩm được phát triển thích hợp với các liều nghiên cứu;
- Độ đẳng trương mà đẳng mol với các điều kiện sinh lý;
 - Nồng độ mol của dược phẩm 50mg/mL xấp xỉ là 318 mOsm/kg;
- Dung dịch DP vô trùng đem lại độ ổn định trong thời gian dài ở trạng thái lỏng;
 - Sự tạo thành một lượng nhỏ các dạng HMW của kháng thể xảy ra khi bảo quản trong một thời gian dài ở nhiệt độ 2-8°C;
 - Có ít đến không có sự thay đổi về sự phân bố tương đối của các dạng kháng thể mang điện tích khi bảo quản trong một thời gian dài ở nhiệt độ 2-8°C; và
 - Quan sát thấy có sự tạo thành một lượng nhỏ các hạt không quan sát được bằng mắt thường trong DP kháng thể trong các điều kiện chịu tác động và bảo quản được tăng cường, và khi bảo quản ở 5°C trong 12 tháng.

Các đặc tính khác của dược phẩm sẽ rõ ràng hơn dựa vào phần mô tả ở đây.

Các kháng thể kháng PD-1: các kháng thể kháng PD-1 được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US20150203579. Kháng thể được lấy làm ví dụ được sử dụng trong các ví dụ dưới đây là kháng thể kháng PD-1 của người đầy đủ H4H7798N.(như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US20150203579, được biết đến là “REGN2810” hoặc “cemiplimab”) chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10; cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR bao gồm SEQ ID NO: 1/2; và các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 3-8; và trong bản mô tả này được gọi là “mAb1”.

Ví dụ 2: Dược phẩm được lấy làm ví dụ

Theo các phương án nhất định, mAb1 được bào chế dưới dạng dược phẩm được đệm chứa nước chứa mAb với nồng độ nằm trong khoảng từ 5mg/mL ± 0,75mg/mL đến 250mg/mL ± 45,0mg/mL, dung dịch đệm histidin với nồng độ

10mM $\pm$ 2mM, polysorbat với nồng độ 0,2% $\pm$ 0,1% w/v, sucroza với nồng độ nằm trong khoảng từ 1% $\pm$ 0,2% đến 10% $\pm$ 2% w/v, và prolin với nồng độ nằm trong khoảng từ 1% $\pm$ 0,02% đến 5% $\pm$ 1% w/v, ở pH 6,0 $\pm$ 0,3.

Dược phẩm được lấy làm ví dụ bao gồm:

- Dược phẩm ổn định có độ nhớt thấp chứa: mAb1 với nồng độ 25mg/mL $\pm$ 3,75mg/mL, dung dịch đệm histidin với nồng độ 10 $\pm$ 2mM, polysorbat 80 với nồng độ 0,2% $\pm$ 0,1% w/v, sucroza với nồng độ 5% $\pm$ 1% w/v, và L-prolin với nồng độ 1,5% $\pm$ 0,3% w/v, ở pH 6,0 $\pm$ 0,3.

- Dược phẩm ổn định có độ nhớt thấp chứa: mAb1 với nồng độ 50mg/mL $\pm$ 7,5mg/mL, dung dịch đệm histidin với nồng độ 10 $\pm$ 2mM, polysorbat 80 với nồng độ 0,2% $\pm$ 0,1% w/v, sucroza với nồng độ 5% $\pm$ 1% w/v, và L-prolin với nồng độ 1,5% $\pm$ 0,3% w/v, ở pH 6,0 $\pm$ 0,3.

- Dược phẩm ổn định có độ nhớt thấp chứa: mAb1 với nồng độ 150 $\pm$ 23mg/mL, dung dịch đệm histidin với nồng độ 10 $\pm$ 2mM, polysorbat 80 với nồng độ 0,2% $\pm$ 0,1% w/v, sucroza với nồng độ 5% $\pm$ 1% w/v, và L-prolin với nồng độ 1,5% $\pm$ 0,3% w/v, ở pH 6,0 $\pm$ 0,3.

- Dược phẩm ổn định có độ nhớt thấp chứa: mAb1 với nồng độ 175 $\pm$ 27mg/mL, dung dịch đệm histidin với nồng độ 10 $\pm$ 2mM, polysorbat 80 với nồng độ 0,2% $\pm$ 0,1% w/v, sucroza với nồng độ 5% $\pm$ 1% w/v, và L-prolin với nồng độ 1,5% $\pm$ 0,3% w/v, ở pH 6,0 $\pm$ 0,3.

Ví dụ 3: Phương pháp được sử dụng để đánh giá độ ổn định của dược phẩm

Các thử nghiệm dưới đây được sử dụng để đánh giá độ ổn định của dược phẩm:

- Màu sắc và vẻ bên ngoài theo quan sát bằng mắt thường
- pH
- Độ đục được đo bằng cách tăng OD ở bước sóng 405nm, hoặc bằng phép đo độ đục
- Phân tích đánh giá chất dạng hạt được tiến hành bằng cách hiện ảnh vi dòng (icroflow imaging-MFI) (được báo cáo dưới dạng số đếm hạt thu được), và che ánh sáng (HIAC)

- Nồng độ protein được xác định bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng pha đảo (reverse phase-ultra performance liquid chromatography-RP-UPLC)
- Độ tinh khiết được xác định bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng loại trừ theo kích thước (size exclusion-ultra performance liquid chromatography-SE-UPLC), hoặc bằng PAGE điện di mao dẫn natri dodecyl sulfat (MCE-SDS) PAGE vi chip khử và không khử
- Phân tích biến thể mang điện bằng sắc ký trao đổi cation-sắc ký lỏng siêu hiệu năng (CEX-UPLC), hoặc bằng cách tập trung đẳng điện mao dẫn hiện ảnh (imaged capillary isoelectric focusing-iCIEF)
- Xác định hiệu lực bằng thử nghiệm sinh học: Hiệu lực tương đối của mỗi mẫu được xác định bằng thử nghiệm sinh học và được xác định là: $(IC_{50} \text{ mẫu đối chứng} / IC_{50} \text{ mẫu}) * 100\%$. Hiệu lực đo được của các mẫu ổn định trong quá trình bảo quản phải nằm trong khoảng từ 50% đến 150% hiệu lực đo được của mẫu đối chứng chuẩn.

Độ ổn định vật lý của dược phẩm được dùng để chỉ các đặc tính như màu sắc, vẻ bề ngoài, độ pH, độ đục, và nồng độ protein. Sự có mặt của các hạt nhìn thấy được bằng mắt thường trong dung dịch có thể được phát hiện bằng cách quan sát bằng mắt thường. Một dung dịch qua được quan sát bằng mắt thường nếu độ đục của dung dịch này là từ trong đến hơi đục, về cơ bản không có các hạt nhìn thấy được bằng mắt thường, và không có màu đến có màu hơi vàng. Ngoài ra, độ đục, được đo bằng OD ở bước sóng 405nm, cũng có thể được sử dụng để phát hiện các hạt trong dung dịch. Việc tăng OD ở bước sóng 405nm có thể chỉ ra sự có mặt của các hạt, tăng độ đục, hoặc sự thay đổi màu của các sản phẩm thử nghiệm. MFI được sử dụng để đánh giá các hạt không quan sát được bằng mắt thường có kích thước $\geq 2\mu\text{m}$. Nồng độ protein của mAb1 được đo bằng thử nghiệm RP-UPLC và được báo cáo dưới dạng tỷ lệ phần trăm thu hồi protein so với nguyên liệu ban đầu. Trong thử nghiệm RP-UPLC, mAb1 được giải hấp khỏi cột RP dưới dạng một đỉnh đơn. Nồng độ protein được xác định từ tổng diện tích đỉnh của mAb1 bằng cách so sánh nồng độ này với đường cong hiệu chỉnh được tạo ra bởi các mẫu chuẩn mAb1. Tỷ lệ phần trăm thu hồi được tính toán dựa trên nồng độ protein đo được so với nồng độ protein ban đầu.

Độ ổn định hóa học đề cập đến sự tạo thành các dạng được cải biến cộng hóa trị (ví dụ các dạng kết tụ cộng hóa trị, các sản phẩm phân cắt, hoặc các dạng biến thể mang điện tích) và các dạng không được cải biến cộng hóa trị (ví dụ, các dạng kết tụ không cộng hóa trị) của protein. Các sản phẩm thoái biến có khối lượng phân tử thấp hơn và cao hơn có thể được tách ra khỏi mAb1 nguyên thể bằng các phương pháp SE-UPLC và MCE-SDS. Tỷ lệ phần trăm của mAb1 thoái biến trong các phương pháp SE-UPLC và MCE-SDS được tính toán từ tỷ lệ giữa diện tích của tất cả các đỉnh không nguyên thể so với tổng diện tích của tất cả các đỉnh mAb1. Các dạng biến thể mang điện của mAb1 được phân giải bằng cách sử dụng phương pháp CEX-UPLC và iCIEF. Ở phương pháp CEX-UPLC, các đỉnh có thời gian lưu sớm hơn so với thời gian lưu của đỉnh chính được đánh dấu là các đỉnh “axit”; các đỉnh có thời gian lưu lâu hơn thời gian lưu của đỉnh chính được đánh dấu là đỉnh “bazo”. Ở phương pháp iCIEF, các đỉnh hướng đến pI thấp hơn so với đỉnh chính được đánh dấu là đỉnh “axit”, trong khi đó các đỉnh hướng đến pI cao hơn so với đỉnh chính được đánh dấu là đỉnh “bazo”.

Ví dụ 4: Tác động của các dung dịch đệm khác nhau và độ pH

Tác động của dung dịch đệm và độ pH đến độ ổn định nhiệt của mAb1 được đánh giá ở các dạng phẩm dạng lỏng bằng cách ủ mAb1 5mg/mL ở 45°C trong 28 ngày trong một dãy các hệ dung dịch đệm ở các khoảng pH khác nhau. Các hệ dung dịch đệm và độ pH sau đây được nghiên cứu: axetat (pH 4,5, 5,0, 5,5), histidin (pH 5,5, 6,0, 6,5), và phosphat (pH 6,0, 6,5, 7,0). Dựa vào các kết quả từ phân tích SE-UPL, độ ổn định tối đa của protein được quan sát khi mAb1 được bảo chế ở độ nằm trong khoảng từ pH 6,0 đến 6,5 trong dung dịch đệm histidin (Bảng 1).

Bảng 1: Tác động của dung dịch đệm và độ pH đến độ ổn định của mAb1 5mg/mL được ủ ở nhiệt độ 45°C trong 28 ngày

Dược phẩm	mAb1 5mg/mL, dung dịch đệm 10mM								
Thể tích nạp	0,4mL								
Đồ chứa	Lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút caosu butyl 4432/50 được phủ FluroTec®								
pH/Dung dịch đệm	Màu sắc và vẻ bề ngoài	Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	% protein được thu hồi bằng RP UPLC	Sự thay đổi độ tinh khiết theo SE-UPLC ^{a)}			Sự thay đổi lượng các biến thể mang điện tích theo CEX-UPLC ^{a)}		
				% HMW	% nguyên thể	% LMW	% đỉnh axit	% đỉnh chính	% đỉnh bazơ
pH 4,5, Axetat	Đạt	0,00	87	5,2	-7,2	2,0	11,1	-15,4	4,3
pH 5,0, Axetat	Đạt	0,00	82	5,0	-5,9	0,9	7,5	-10,9	3,4
pH 5,5, Axetat	Đạt	0,00	90	4,7	-5,4	0,7	12,8	-13,7	0,9
pH 5,5, Histidin	Đạt	0,00	97	5,6	-6,4	0,8	10,8	-12,4	1,6
pH 6,0, Histidin	Đạt	0,00	86	1,9	-2,4	0,6	13,4	-12,6	-0,7
pH 6,5, Histidin	Đạt	0,00	84	1,2	-1,8	0,7	25,4	-21,3	-4,1
pH 6,0, Phosphat	Đạt	0,01	92	3,7	-4,3	0,6	24,8	-21,8	-3,0
pH 6,5, Phosphat	Đạt	0,03	91	4,9	-5,8	0,9	49,6	-40,3	-9,3
pH 7,0, Phosphat	Đạt	0,03	95	10,4	-11,6	1,2	56,5	-42,2	-14,3

^{a)}Được báo cáo là độ tinh khiết thay đổi tương đối so với nguyên liệu ban đầu. Nguyên liệu ban đầu (không ủ) chứa $\geq 97,2\%$ đỉnh nguyên thể theo SE-UPLC và $\geq 49,0\%$ đỉnh chính theo CEX-UPLC ở tất cả các dược phẩm.

CEX = trao đổi cation; DS = Dược chất; HMW = Khối lượng phân tử cao; LMW = Khối lượng phân tử thấp; OD = Mật độ quang; RP = Pha đảo; SE = Loại trừ theo kích thước; UPLC = Sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Dựa trên các kết quả thu được từ phân tích CEX-UPLC, độ ổn định protein tối đa được quan sát khi mAb1 được bào chế ở độ pH nằm trong khoảng từ pH 5,5 đến 6,0 trong dung dịch đệm histidin hoặc ở độ pH nằm trong khoảng từ pH 5,0 đến 5,5 trong dung dịch đệm axetat. Các phân tích cũng đã chỉ ra rằng sự kết tụ (tức là, sự tạo thành các dạng HMW), sự phân đoạn (tức là, sự tạo thành các dạng LMW), và sự tạo thành các biến thể mang điện tích là các con đường thoái biến chủ yếu. Dung dịch đệm histidin được chọn là dung dịch đệm bào chế bởi vì nó đem lại mức ổn định protein tốt nhất đối với sự tạo thành các dạng HMW và LMW và sự tạo thành các biến thể mang điện tích. pH bằng 6,0 được chọn cho dược phẩm vì sự tạo

thành các dạng HMW và các biến thể mang điện tích, mà là các con đường thoái biến chủ yếu, được giảm thiểu ở pH này. Dựa trên các kết quả này, dung dịch đệm histidin 10mM ở pH 6,0 được chọn cho được phẩm chứa mAb1.

Ví dụ 5: Chọn pH cho các dung dịch đệm histidin

Tác động của dung dịch đệm và độ pH đến độ ổn định nhiệt của mAb1 được đánh giá ở các được phẩm dạng lỏng có nồng độ cao. mAb1 150mg/mL được ủ ở 45°C trong 28 ngày trong một dãy các dung dịch đệm histidin có độ pH nằm trong khoảng ở độ pH 5,3, 5,5, 5,8, 6,0 và 6,3 có và không có chất làm ổn định nhiệt. Với sucroza 9%, dựa trên các kết quả thu được từ phân tích SE-UPLC, độ ổn định protein tối đa được quan sát khi mAb1 được bào chế ở pH nằm trong khoảng từ pH 5,8 đến 6,3 trong dung dịch đệm histidin (Fig.1). Dựa trên các kết quả thu được từ phân tích CEX-UPLC, độ ổn định protein tối đa được quan sát khi mAb1 được bào chế ở độ pH nằm trong khoảng từ pH 5,3 đến 6,0 trong dung dịch đệm histidin (Bảng 2).

Bảng 2: Tác động của độ pH đến độ ổn định của mAb1 150mg/mL được ủ ở 45°C trong 28 ngày

Dược phẩm	mAb1 150mg/mL, histidin 10mM								
Thể tích nạp	0,4mL								
Đồ chứa/ Đồ kín	Lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút caosu butyl 4432/50 được phủ FluroTec®								
pH/ Chất làm ổn định	Màu sắc và vẻ bề ngoài	Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	% Protein được thu hồi bằng RP-UPLC	Sự thay đổi độ tinh khiết theo SE-UPLC ^{a)}			Sự thay đổi lượng các biến thể mang điện tích theo CEX-UPLC ^{a)}		
				% HMW	% nguyên thể	% LMW	% đỉnh axit	% đỉnh chính	% đỉnh bazo
pH 5,3/không	Không đạt ^{b)}	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 5,5/không	Không đạt ^{b)}	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 5,8/không	Không đạt	0,40	95	46,2	-46,4	0,3	6,4	-10,2	3,9
pH 6,0/không	Không đạt	0,51	99	41,2	-41,5	0,3	10,6	-7,3	-3,3
pH 6,3/không	Không đạt	0,65	98	35,0	-35,4	0,4	19,6	-14,3	-5,3

pH 5,3 / Sucroza 9% (w/v)	Đạt	0,14	95	41,9	-42,1	0,3	7,9	-11,1	3,2
pH 5,5 / Sucroza 9% (w/v)	Đạt	0,16	99	30,8	-31,2	0,4	9,5	-12,5	2,9
pH 5,8 / Sucroza 9% (w/v)	Đạt	0,13	100	22,8	-23,3	0,5	9,7	-11,8	2,1
pH 6,0 / Sucroza 9% (w/v)	Đạt	0,14	99	19,4	-19,9	0,5	13,5	-14,5	1,0
pH 6,3 / Sucroza 9% (w/v)	Đạt	0,15	98	16,9	-17,4	0,5	22,4	-22,1	-0,4

^a Được báo cáo là độ tinh khiết thay đổi tương đối so với nguyên liệu ban đầu. Nguyên liệu ban đầu (không ủ) chứa $\geq 94,0\%$ đỉnh nguyên thể theo SE-UPLC và $\geq 48,7\%$ đỉnh chính theo CEX-UPLC ở tất cả các dược phẩm

^b Mẫu được gel hóa. Không cần tiến hành phân tích thêm. NA = không áp dụng

CEX, trao đổi cation; HMW, khối lượng phân tử cao; LMW, khối lượng phân tử thấp; OD, mật độ quang; RP, pha đảo; SE, loại trừ theo kích thước; UPLC, sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Các phân tích cũng đã chỉ ra rằng sự kết tụ (tức là, sự tạo thành các dạng HMW), và sự tạo thành các biến thể mang điện tích là các con đường thoái biến chủ yếu. Độ pH bằng 6,0 được chọn cho dược phẩm DP vì sự tạo thành các dạng HMW và các biến thể mang điện tích, mà là các con đường thoái biến chủ yếu, được giảm thiểu ở pH này. Dựa trên các kết quả này, dung dịch đệm histidin 10mM ở pH 6,0 được chọn cho dược phẩm DP chứa mAb1 có nồng độ cao.

Ví dụ 6: Chọn các chất bảo vệ chống lại tác động khuấy

Chất làm ổn định như chất hoạt động bề mặt và các đồng dung môi hữu cơ thường được bổ sung vào dược phẩm kháng thể để bảo vệ protein không bị kết tụ do khuấy. Ảnh hưởng của các đồng dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt đến độ ổn định dưới tác động khuấy và độ ổn định nhiệt của mAb1 5mg/mL được đánh giá ở các dược phẩm dạng lỏng. Đồng dung môi và chất hoạt động bề mặt sau được đánh giá: polysorbat 20 0,1%, polysorbat 80 0,1%, và PEG3350 1,0%. Các kết quả thu được từ các nghiên cứu độ ổn định dưới tác động khuấy được thể hiện tóm tắt trong bảng 3.

Bảng 3: Ảnh hưởng của các đồng dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt đến độ ổn định của mAb1 5mg/mL sau khi khuấy (120 phút xoáy mạnh)

Dược phẩm	mAb1 5mg/mL, histidin 10mM, pH 6,0									
Thể tích nạp	0,4mL									
Đồ chứa	Lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút caosu butyl 4432/50 được phủ FluorTec®									
Đồng dung môi/ Chất hoạt động bề mặt	Màu sắc và vẻ bề ngoài	Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	pH	% Protein được thu hồi bằng RP-UPLC	Sự thay đổi độ tinh khiết theo SE-UPLC ^{a)}			Sự thay đổi lượng các biến thể mang điện tích theo CEX-UPLC ^{a)}		
					% HMW	% nguyên thể	% LMW	% đỉnh axit	% đỉnh chính	% đỉnh bazơ
Không có đồng dung môi/chất hoạt động bề mặt	Không đạt	1,69	6,0	76	15,3	-23,7	-8,4	-2,3	-1,7	3,9
sucroza 5% (w/v)	Không đạt	1,75	6,0	64	9,4	-12,8	3,4	-1,7	-0,1	1,8
polysorbat 20 ^{b)} 0,1% (w/v)	Đạt	0,00	6,0	102	-0,1	-0,8	0,8	0,2	0,2	-0,3
polysorbat 80 ^{b)} 0,1% (w/v)	Đạt	0,00	6,0	100	-0,2	-0,5	0,4	0,2	-0,1	-0,1
PEG3350 ^{b)} 1% (w/v)	Không đạt	0,20	6,0	93	0,3	-0,5	0,2	-0,2	-0,3	0,4

^{a)}Được báo cáo là độ tinh khiết thay đổi tương đối so với nguyên liệu ban đầu. Nguyên liệu ban đầu (không ủ) chứa $\geq 98,2\%$ đỉnh nguyên thể theo SE-UPLC và $\geq 49,1\%$ đỉnh chính theo CEX-UPLC ở tất cả 5 dược phẩm.

^{b)} Dược phẩm cũng chứa sucroza 5%.

CEX = Trao đổi cation; HMW = Khối lượng phân tử cao; LMW = Khối lượng phân tử thấp; OD = Mật độ quang; RP = Pha đảo; SE = Loại trừ theo kích thước; UPLC = Sắc ký lỏng siêu hiệu năng

mAb1 không ổn định khi khuấy bằng cách xoáy mạnh trong 120 phút khi không có mặt đồng dung môi hữu cơ hoặc chất hoạt động bề mặt. Sau khi khuấy bằng cách xoáy mạnh khi không có mặt đồng dung môi hoặc chất hoạt động bề mặt, dung dịch trở nên đục, có độ đục tăng lên đáng kể, và có mức kết tụ tăng 15,3% như được xác định bởi SE-UPLC, cũng như là mức thu hồi protein bị hao hụt 24% như được xác định bởi RP-UPLC (Bảng 3). PEG3350 1% không đem lại độ ổn định đáng kể cho mAb1 sau khi xoáy mạnh 120 phút. Khi có mặt PEG3350 1%, dung dịch trở nên đục, và có độ đục tăng (Bảng 3). Ngược lại, polysorbat 20 0,1% và

polysorbat 80 0,1% đều bảo vệ mAb1 không bị mất độ ổn định do khuấy đến cùng một mức (Bảng 3).

Tuy nhiên, dược phẩm chứa polysorbat 80 0,1% đã cho thấy mức kết tụ giảm so với dược phẩm chứa polysorbat 20 0,1% khi được ủ ở 45°C (Bảng 4). Polysorbat 80 0,1% được chọn làm chất hoạt động bề mặt cho dược phẩm DP mAb1 bởi vì nó làm ổn định protein dưới tác động khuấy, có tác động tiêu cực đến độ ổn định nhiệt của protein ít hơn so với polysorbat 20 (như được xác định bởi cả phân tích SE-UPLC và CEX-UPLC), và có lịch sử sử dụng an toàn trong các dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng.

Ví dụ 7: Chọn các chất bảo vệ chịu được tác động nhiệt

Chất làm ổn định như sucroza thường được bổ sung vào dược phẩm kháng thể để làm tăng độ ổn định nhiệt của protein trong các dược phẩm dạng lỏng. mAb1 năm (5) mg/mL trong dược phẩm dạng lỏng có độ ổn định tốt hơn nếu được bào chế với sucroza 5% và được ủ trong các điều kiện được tăng cường (Bảng 4).

Bảng 4: Ảnh hưởng của các đồng dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt đến độ ổn định của mAb1 5mg/mL được ủ ở 45°C trong 29 ngày

Dược phẩm	mAb1 5mg/mL, histindin 10mM, pH 6,0									
Thể tích nạp	0,4mL									
Đồ chứa/Đồ kín	Lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút caosu butyl 4432/50 được phủ FluorTec®									
Đồng dung môi/Chất hoạt động bề mặt	Màu sắc và vẻ bề ngoài	Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	pH	% Protein được thu hồi bằng RP-UPLC	Sự thay đổi độ tinh khiết theo SE-UPLC ^{a)}			Mức thay đổi các biến thể mang điện tích bởi CEX-UPLC ^{a)}		
					% HMW	% nguyên thể	% LMW	% đỉnh axit	% đỉnh chính	% đỉnh bazơ
Không đồng dung môi/chất hoạt động bề mặt	Đạt	0,00	6,1	96	2,8	-3,2	0,5	10,8	-10,7	-0,2
sucroza 5% (w/v)	Đạt	0,01	6,1	99	1,6	-2,0	0,3	12,6	-11,7	-0,9
polysorbat 20 ^{b)} 0,1% (w/v)	Đạt	0,00	6,0	92	27,6	-28,4	0,7	0,1	-24,0	23,9
polysorbat 80 0,1% (w/v)	Đạt	0,00	6,1	96	12,8	-14,1	0,9	4,4	-20,4	15,9
PEG3350 1% (w/v)	Đạt	0,00	6,1	90	8,4	-8,0	-0,4	0,4	-25,0	24,5

^aĐược báo cáo là độ tinh khiết thay đổi tương đối so với nguyên liệu ban đầu. Nguyên liệu ban đầu (không ủ) chứa $\geq 98,2\%$ đỉnh nguyên thể theo SE-UPLC và $\geq 49,1\%$ đỉnh chính theo CEX-UPLC ở tất cả 5 dược phẩm

^bDược phẩm cũng chứa sucroza 5%

CEX = Trao đổi cation; HMW = Khối lượng phân tử cao; LMW = Khối lượng phân tử thấp; OD = Mật độ quang; RP = Pha đảo; SE = Loại trừ theo kích thước; UPLC = Sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Sau khi ủ ở 45°C trong 29 ngày, lượng dạng HMW tương đối tăng $1,7\%$ ở dược phẩm chứa sucroza 5% so với mức tăng $2,8\%$ ở dược phẩm đối chứng không chứa sucroza. Vì lý do này, sucroza được chọn làm chất làm ổn định nhiệt. Để bảo chế dược phẩm đẳng trương và để tối đa hóa độ ổn định nhiệt, cần tăng nồng độ sucroza đến 10% đối với dược phẩm mAb1.

Ví dụ 8: Tối ưu hóa chất làm ổn định

Mục đích của việc làm tối ưu hóa chất làm ổn định nhiệt là để xác định các thành phần làm ổn định có thể được sử dụng để phát triển dược phẩm DP chứa kháng thể với nồng độ lên đến 200mg/mL . Sucroza 10% được chọn ở dược phẩm ban đầu. Nhận thấy là với sucroza 10% , độ nhớt của mAb1 là khoảng 20 cP ở 20°C và được cho là quá cao đối với giai đoạn sau và sản phẩm thương mại. Do đó, dược phẩm chứa mAb1 đã cải biến cần phải có cả độ ổn định thích hợp và độ nhớt thấp.

Sucroza được chọn làm chất làm ổn định nhiệt cho mAb1 trong quá trình phát triển dược phẩm có nồng độ thấp. Đối với việc phát triển dược phẩm có nồng độ cao, các nồng độ khác nhau của sucroza và L-prolin được đánh giá về độ ổn định và độ nhớt của mAb1 ở nồng độ 150 và 175mg/mL ở 25°C (Bảng 5) và ở 40°C trong 1 tháng. Sự tạo thành các dạng HMW giảm với các nồng độ sucroza tăng khi dược phẩm được ủ ở 40°C trong 28 ngày. L-prolin 3% tạo ra độ ổn định tương tự với sucroza 5% , và quan sát thấy độ ổn định tối đa với sucroza 9% .

Mặc dù sucroza 9% tạo ra độ ổn định tốt hơn một chút so với L-prolin 3% , song lại làm tăng độ nhớt của dược phẩm. Ở nồng độ 175mg/mL , dược phẩm mAb1 với sucroza 9% có độ nhớt bằng 27 centipoise , điều này đặt ra các thách thức trong việc sử dụng và sản xuất. Dược phẩm chứa mAb1 175mg/mL và prolin 3% có độ nhớt bằng xấp xỉ 20 centipoise , độ nhớt này có thể kiểm soát được với quy trình sản xuất hiện nay.

Bảng 5: Độ ổn định của mAb1 nồng độ cao tăng với các chất làm ổn định nhiệt ở 25°C trong 1 tháng

Dược phẩm		mAb1 210mg/mL, histidin 10mM pH 6,0								
Thể tích nạp		0,8mL								
Đồ chứa/ Đồ kín		Lọ polycarbonat có dung tích 5mL với nắp xoáy polypropylen được vạch silicon								
Các tá dược	Màu sắc và vẻ bề ngoài	Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	pH	% mAb1 được thu hồi bởi RP-UPLC	Độ tinh khiết theo SE-UPLC			Các biến thể mang điện tích theo CEX-UPLC		
					% HMW	% nguyên thể	% LMW	% đỉnh axit	% đỉnh chính	% đỉnh bazơ
Nguyên liệu ban đầu ^{a)}	Đạt	0,00	6,0	100	2,9	96,6	0,5	25,3	47,4	27,3
prolin 3%	Đạt	0,01	6,0	106	4,1	95,3	0,6	25,2	47,1	27,8
sucroza 3%	Đạt	0,00	6,0	107	4,7	94,8	0,6	25,2	46,5	28,3
sucroza 5%	Đạt	0,00	6,0	104	4,7	94,8	0,6	25,1	46,1	28,8
Dược phẩm		FDS/DP: mAb1 150mg/mL hoặc 175mg/mL, histidin 10mM pH 6,0, PS 80 0,1%								
Thể tích nạp		0,4mL								
Đồ chứa/ Đồ kín		lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút caosu butyl 4432/50 được phủ FluroTec®								
Nguyên liệu ban đầu ^{a)}	Đạt	0,00	6,1	100	2,3	97,4	0,4	24,9	50,2	24,9
sucroza 9%, PS 80 0,1%	Đạt	0,00	6,1	101	3,7	95,7	0,7	28,4	47,7	23,9
prolin 3% PS 80 0,1%	Đạt	0,00	6,1	101	3,7	95,7	0,7	26,5	47,7	25,8

^a Các kết quả pH, SE-UPLC và CEX-UPLC ‘Nguyên liệu ban đầu’ là các giá trị trung bình của các dược phẩm ban đầu

Tuy nhiên, dựa vào độ ổn định khi bảo quản ở -20°C, -30°C và -80°C, nhận thấy là dược phẩm có prolin 3% không ổn định bằng dược phẩm có sucroza (Fig.2). Như được thể hiện trên Fig.2, dược phẩm F3 (với sucroza 5%) ổn định ở -20°C, -30°C và -80°C với lượng dạng HMW $\leq 3\%$.

Tác động của L-prolin đến độ ổn định của mAb1 được đánh giá với dược phẩm 50mg/mL. Sau khi ủ ở 45°C trong 28 ngày, dược phẩm có L-prolin đã cho thấy lượng dạng HMW thấp hơn so với dược phẩm không có L-prolin, chứng tỏ là L-prolin làm ổn định kháng thể ở nồng độ bằng 50mg/mL (Bảng 6). Ngoài ra, tác động của L-prolin đến cấu trúc protein của kháng thể được đánh giá bằng các kỹ

thuật sinh lý (Phép đo quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier, phép đo quang phổ CD, phép đo quang phổ phát huỳnh quang, và phép đo nhiệt lượng bằng tia quét vi phân). Các kết quả đã chỉ ra rằng L-prolin không làm thay đổi cấu trúc bậc hai và bậc ba của kháng thể.

Bảng 6: Ảnh hưởng của chất làm ổn định đến độ ổn định của mAb1 50mg/mL sau khi ủ ở 45°C trong 28 ngày

Dược phẩm	mAb1 50mg/mL, L-histidin 10mM, sucroza 5%, pH 6,0, polysorbat 80 0,2%									
Thể tích nạp	0,6mL									
Đồ chứa/ Đồ kín	Lọ thủy tinh loại 1 có dung tích 2mL với nút clorobutyl 4432/50 được phủ FluorTec®									
Chất làm ổn định (% w/v)	Màu sắc và vẻ bề ngoài	Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	pH	% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC	Mức thay đổi độ tinh khiết theo SE-UPLC ^a			Sự thay đổi lượng các biến thể mang điện tích theo CEX-UPLC ^a		
					% HMW	% Monome	% LMW	% đỉnh axit	% đỉnh chính	% đỉnh bazơ
-	Đạt	0,02	6,0	96	12,1	-12,7	0,6	10,8	-11,9	1,0
L-prolin 1,5%	Đạt	0,02	6,1	96	11,3	-11,9	0,6	11,0	-11,8	0,8
3,0% L-prolin	Đạt	0,01	6,0	96	10,9	-11,5	0,6	12,8	-12,9	0,1

^{a)}Được thể hiện dưới dạng mức thay đổi độ tinh khiết so với nguyên liệu ban đầu. Nguyên liệu ban đầu (không ủ) chứa $\geq 98,5\%$ đỉnh monome theo SE-UPLC và $\geq 52,8\%$ đỉnh chính theo CEX-UPLC ở tất cả ba dược phẩm.

CEX, trao đổi cation; DS, dược chất; HMW, khối lượng phân tử cao; LMW, khối lượng phân tử thấp; OD, mật độ quang; RP, pha đảo; SE, loại trừ theo kích thước; UPLC, sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Tác động của các chất làm ổn định khác nhau đến độ ổn định nhiệt của mAb1 có nồng độ cao (150 và 175mg/mL) còn được đánh giá ở các dược phẩm dạng lỏng. Chất làm ổn định được đánh giá là sucroza 9% (w/v), L-prolin 3% (w/v), và sucroza 5% (w/v) với L-prolin 1,5% (w/v). Các kết quả của nghiên cứu độ ổn định được gia tăng được thể hiện tóm tắt trong bảng 7.

Bảng 7: Tác động của chất làm ổn định đến độ ổn định của mAb1 sau khi ủ ở 25°C và 40°C

Dược phẩm	mAb1 150 hoặc 175mg/mL, histidin 10mM, pH 6,0, polysorbat 80 0,1%
Thể tích nạp	0,5mL
Đồ chứa/ Đồ kín	Lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút caosu butyl 4432/50 được phủ FluorTec®
Ủ	25°C trong 3 tháng

Chất làm ổn định (% w/v)	Nồng độ mAb1 (mg/mL)	Màu sắc và vẻ bề ngoài	Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	pH	% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC	Mức thay đổi độ tinh khiết theo SE-UPLC ^{a)}			Sự thay đổi lượng các biến thể mang điện tích theo CEX-UPLC ^{a)}		
						% HMW	% nguyên thể	% LMW	% đỉnh axit	% đỉnh chính	% đỉnh bazơ
sucroza 9%	150	Đạt	0,02	6,2	110	2,6	-2,8	0,2	6,0	-4,2	-1,9
L-prolin 3%	175	Đạt	0,00	6,2	112	2,4	-2,5	0,2	6,5	-4,1	-2,4
sucroza 5%, L- prolin 1,5%	175	Đạt	0,00	6,2	110	2,3	-2,6	0,2	6,0	-3,7	-2,4
Ủ		40°C trong 28 ngày									
Chất làm ổn định (% w/v)	Nồng độ mAb1 (mg/mL)	Màu sắc và vẻ bề ngoài	Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	pH	% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC	Mức thay đổi độ tinh khiết theo SE-UPLC ^{a)}			Sự thay đổi lượng các biến thể mang điện tích theo CEX-UPLC ^{a)}		
						% HMW	% nguyên thể	% LMW	% đỉnh axit	% đỉnh chính	% đỉnh bazơ
sucroza 9%	150	Đạt	0,04	6,1	102	6,9	-7,5	0,5	9,4	-9,7	0,3
L-prolin 3%	175	Đạt	0,03	6,2	103	11,7	-12,3	0,6	12,1	-10,7	-1,4
sucroza 5%, L- prolin 1,5%	175	Đạt	0,03	6,1	103	8,8	-9,4	0,7	11,4	-10,2	-1,2

^{a)}Được thể hiện dưới dạng mức thay đổi độ tinh khiết so với nguyên liệu ban đầu. Nguyên liệu ban đầu (không ủ) chứa $\geq 97,3\%$ đỉnh nguyên thể theo SE-UPLC và $\geq 49,6\%$ đỉnh chính theo CEX-UPLC ở tất cả ba dược phẩm.

CEX, trao đổi cation; HMW, khối lượng phân tử cao; LMW, khối lượng phân tử thấp; OD, mật độ quang; RP, pha đảo; SE, loại trừ theo kích thước; UPLC, sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Sau khi ủ ở 40°C trong 28 ngày, sucroza 9% đã đem lại độ ổn định tốt nhất và có độ nhớt cao nhất trong số các dược phẩm có nồng độ cao. Dược phẩm chứa sucroza 5%/L-prolin 1,5% đứng thứ hai về độ ổn định sau 28 ngày ở 40°C. Sau khi ủ ở 25°C trong ba tháng, độ ổn định của mAb1 gần như giữ nguyên ở tất cả các dược phẩm được đánh giá; tuy nhiên, dược phẩm có sucroza 5%/L-prolin 1,5% tốt hơn một chút so với hai dược phẩm còn lại. Tuy nhiên, khi ủ ở -20°C, -30°C và -80°C, sucroza ở nồng độ 5% và ở 9% đem lại độ ổn định tốt hơn so với prolin 3% (Fig.3). Độ nhớt của mAb1 175mg/mL với sucroza 5%/L-prolin 1,5% có độ nhớt bằng 14cP ở 20°C. Để tạo ra dược phẩm mà ở dạng dung dịch đẳng trương và có độ

cân bằng tốt nhất giữa độ ổn định và độ nhớt, sucroza 5%/L-prolin 1,5% được chọn để phát triển được phẩm DP chứa kháng thể dùng ở giai đoạn sau.

Ví dụ 9: Chọn lọc chất cải biến độ nhớt

Độ nhớt của dược phẩm protein tăng theo hàm số mũ khi nồng độ protein tăng. Khi độ nhớt bắt đầu vượt quá khoảng 10 đến 15 cP ở 20°C, độ nhớt của dược phẩm phải được xem xét khi phát triển dược phẩm: đơn giản là vì độ nhớt có mối tương quan với việc dễ tiêm qua bơm tiêm nạp sẵn (prefilled syringe-PFS) hoặc thiết bị phân phối khác sử dụng kim tiêm; quan trọng hơn việc duy trì độ nhớt thấp ở mức hợp lý là quan trọng để phát triển thiết bị phân phối, như thiết bị tiêm tự động. Tác động của các tá dược đến độ nhớt của dược phẩm được đánh giá ở dược phẩm dạng lỏng với chất cải biến độ nhớt tiềm ẩn sau, prolin, arginin HCl, histidin HCl, magie axetat và NaCl. Fig.4 thể hiện độ nhớt của mAb1 150mg/mL với các chất cải biến độ nhớt. Arginin HCl, histidin HCl, magie axetat và NaCl ở nồng độ 25-100mM làm giảm độ nhớt của dược phẩm chứa mAb1 150mg/mL.

Tác động của chất cải biến độ nhớt đến độ ổn định của dược phẩm mAb1 cũng được đánh giá. Dược phẩm chứa mAb1 150mg/mL với các chất cải biến độ nhớt như arginin HCl, histidin HCl, magie axetat và NaCl được bào chế và được ủ ở 45°C trong 28 ngày. Các kết quả được thể hiện trong Fig.5. Nhận thấy là độ ổn định protein tối đa được quan sát khi mAb1 được bào chế không có chất cải biến độ nhớt; toàn bộ các muối cải biến độ nhớt này có tác động tiêu cực đến độ ổn định của mAb1. Do đó các muối này không được bao gồm trong dược phẩm cuối cùng.

L-prolin, dưới dạng chất làm ổn định, làm giảm đến mức tối thiểu độ nhớt của dung dịch đối với các nồng độ kháng thể bằng hoặc lớn hơn 50mg/mL. Các kết quả của nghiên cứu độ ổn định tăng cường đối với kháng thể có nồng độ cao có L-prolin với nồng độ khác nhau, có và không có sucroza, được thể hiện tóm tắt trong Bảng 7. Sau khi ủ ở 25°C trong ba tháng, dược phẩm có sucroza 5%/L-prolin 1,5% đã đem lại độ ổn định tốt hơn một chút so với hai dược phẩm còn lại về sự tạo thành các dạng HMW. Sau khi ủ ở 40°C trong 28 ngày, dược phẩm chứa sucroza 9% có độ ổn định tốt nhất, và dược phẩm có sucroza 5%/L-prolin 1,5% đứng thứ hai. Dược phẩm có sucroza 9% có độ nhớt bằng 20cP ở 175mg/mL kháng thể, trong khi đó độ nhớt của dược phẩm 175mg/mL với sucroza 5%/L-prolin 1,5% có độ nhớt

bằng 14cP ở 20°C. Việc bổ sung L-prolin vào dược phẩm là quan trọng để làm giảm độ nhớt khi nồng độ protein cao cũng như là làm ổn định kháng thể.

Tóm lại, sucroza 5%/L-prolin 1,5% được chọn đối với cả dược phẩm chứa 50mg/mL kháng thể và dược phẩm chứa kháng thể có nồng độ cao. Việc kết hợp các tá dược như vậy tạo ra một dược phẩm đẳng trương với độ ổn định và độ nhớt chấp nhận được ở tất cả các nồng độ kháng thể được thử nghiệm (lên đến 175mg/mL).

Ví dụ 10: Tối ưu hóa nồng độ polysorbat (PS)

Trong suốt quá trình phát triển dược phẩm, việc tạo thành các dạng có khối lượng phân tử cao và độ đục tăng còn được quan sát khi khuấy dược phẩm mAb1 mà không có chất hoạt động bề mặt. Protein được làm ổn định với quá trình khuấy bằng cách bổ sung polysorbat 80 (PS 80). Trong suốt quá trình phát triển dược phẩm dạng lỏng chứa mAb1 có nồng độ cao, việc mất ổn định với quá trình khuấy được quan sát là do tăng lượng dạng có khối lượng phân tử cao. Một nghiên cứu được tiến hành để xác định lượng polysorbat 80 tối thiểu cần để bảo vệ mAb1 có nồng độ tối đa 175mg/mL không bị mất ổn định do khuấy. Các dược phẩm trong nghiên cứu này chứa sucroza 5% và L-prolin 1,5% sao cho tác động của polysorbat 80 có thể được nghiên cứu với thành phần dược phẩm đặc trưng hơn ở dược phẩm cuối. Nồng độ polysorbat 80 bình thường được bao gồm trong nghiên cứu này là 0%, 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,1%, 0,15%, và 0,2% (w/v). Khi không có mặt polysorbat 80, dung dịch trở nên đục và có độ đục tăng lên đáng kể sau khi khuấy bằng cách xoáy mạnh. Quan sát thấy mức giảm lượng % HMW phụ thuộc vào nồng độ polysorbat 80 sau khi khuấy 120 phút. Nồng độ của polysorbat 80 0,15-0,2% được nhận thấy là đủ để làm ổn định mAb1 150mg/mL và 175mg/mL với sự kết tụ do khuấy (Bảng 8). Việc bổ sung polysorbat 80 0,2% (w/v) (giá trị bình thường) hoàn toàn có thể ngăn ngừa được sự tạo thành các dạng HMW sau khi khuấy trong 120 phút.

Bảng 8: Độ ổn định của mAb1 150mg/mL và 175mg/mL với PS 80 sau khi khuấy 120 phút

Thể tích nạp	0,4mL
Đồ chứa/Đồ kín	Lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút caosu butyl 4432/50 được phủ FluroTec®

Dược phẩm	[PS 80]	Màu sắc và vẻ bề ngoài	Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	pH	% mAb1 được thu hồi bởi RP-UPLC	Tăng % HMW theo SE-UPLC
mAb1 150mg/mL histindin 10mM, pH 6,0 sucroza 9%	0,00	Không đạt	0,38	6,0	Không áp dụng	
	0,02	Đạt	0,00	6,0	97	4,7
	0,04	Đạt	0,00	6,0	100	0,3
	0,06	Đạt	0,00	6,0	102	0,3
	0,08	Đạt	0,04	6,0	99	0,0
	0,10	Đạt	0,01	6,0	101	0,1
	0,15	Đạt	0,00	6,0	98	0,1
	0,20	Đạt	0,00	6,0	106	0,1
mAb1 175mg/mL histindin 10mM, pH 6,0, prolin 3%	0,00	Không đạt	0,38	6,0	Không áp dụng	
	0,02	Đạt	0,06	6,1	100	7,0
	0,04	Đạt	0,00	6,0	97	2,4
	0,06	Đạt	0,01	6,1	700	2,3
	0,08	Đạt	0,03	6,1	98	0,9
	0,10	Đạt	0,00	6,1	102	0,4
	0,15	Đạt	0,00	6,1	102	0,1
	0,20	Đạt	0,00	6,1	101	0,1
mAb1 175mg/mL histindin 10mM, pH 6,0, sucroza 5%, prolin 1,5%	0,00	Không đạt	0,36	6,1	Không áp dụng	
	0,02	Đạt	0,01	6,1	97	3,5
	0,04	Đạt	0,01	6,1	98	2,0
	0,06	Đạt	0,01	6,1	100	1,3
	0,08	Đạt	0,01	6,1	99	1,0
	0,10	Đạt	0,01	6,0	102	0,3
	0,15	Đạt	0,00	6,1	101	0,2
	0,20	Đạt	0,00	6,1	98	0,0

Bảng 9 thể hiện chi tiết tác động của nồng độ polysorbat 80 đến độ ổn định của mAb1 175mg/mL sau khi khuấy (120 phút xoáy mạnh).

Bảng 9: Ảnh hưởng của nồng độ polysorbat 80 đến độ ổn định của mAb1 175mg/mL sau khi khuấy (120 phút xoáy mạnh)

Dược phẩm	mAb1 175mg/mL, histindin 10mM, pH 6,0, sucroza 5% (w/v), L-prolin 1,5% (w/v)									
Thể tích nạp	0,4mL									
Đồ chứa/ Đồ kín	Lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút caosu butyl 4432/50 được phủ FluorTec®									
Nồng độ PS 80 thông thường, (% w/v)	Màu sắc và vẻ bề ngoài	Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	pH	% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC	Sự thay đổi độ tinh khiết theo SE-UPLC ^{a)}			Sự thay đổi lượng các biến thể mang điện tích theo CEX-UPLC ^{a)}		
					% HMW	% nguyên thể	% LMW	% đỉnh axit	% đỉnh chính	% đỉnh bazơ
0,00%	Không đạt	0,36	6,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

0,02%	Đạt	0,01	6,0	97	3,5	-3,5	0,0	-0,6	0,8	-0,1
0,04%	Đạt	0,01	6,0	98	2,0	-2,0	0,0	0,1	-0,2	-0,2
0,06%	Đạt	0,01	6,0	100	1,3	-1,3	0,0	-0,2	0,3	-0,1
0,08%	Đạt	0,01	6,0	99	1,0	-1,0	0,0	-0,2	0,0	0,0
0,10%	Đạt	0,02	6,0	102	0,3	-0,3	0,0	0,2	0,0	0,0
0,15%	Đạt	0,00	6,1	101	0,2	-0,2	0,0	0,2	-0,3	0,1
0,20%	Đạt	0,00	6,1	98	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,2

^aĐược báo cáo là độ tinh khiết thay đổi tương đối so với nguyên liệu ban đầu. Nguyên liệu ban đầu (không ủ) chứa $\geq 97,4\%$ đỉnh nguyên thể theo SE-UPLC và $\geq 48,2\%$ đỉnh chính theo CEX UPLC ở tất cả các dược phẩm.

CEX, trao đổi cation; HMW, khối lượng phân tử cao; LMW, khối lượng phân tử thấp; NA, không có; OD, mật độ quang; RP, pha đảo; SE, loại trừ theo kích thước; UPLC, sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Khả năng của polysorbat 80 0,2% (w/v) trong việc bảo vệ mAb1 không bị mất ổn định do khuấy được khẳng định bằng nghiên cứu khác với dược phẩm cuối ở nồng độ 50mg/mL (Bảng 10).

Bảng 10: Tác động của nồng độ PS80 đến độ ổn định của mAb1 50mg/mL sau khi khuấy (120 phút xoay mạnh)

Dược phẩm	mAb1 50mg/mL, L-histidin 10mM, pH 6,0, sucroza 5% (w/v), L-prolin 1,5% (w/v)									
Thể tích nạp	0,6mL									
Đồ chứa/ Đồ kín	Lọ thủy tinh loại 1 có dung tích 2ml với nút clorobutyl 4432/50 được phủ FluorTec®									
Nồng độ polysorbat 80, (% w/v)	Màu sắc và vẻ bề ngoài	Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	pH	% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC	Sự thay đổi độ tinh khiết theo SE-UPLC ^a			Sự thay đổi lượng các biến thể mang điện tích theo CEX-UPLC ^a		
					% HMW	% Monome	% LMW	% đỉnh axit	% đỉnh chính	% đỉnh bazơ
0,0%	Đạt	0,01	6,1	99	8,0	-8,0	0,0	1,7	-1,8	-0,3
0,2%	Đạt	0,00	6,1	99	0,0	0,1	-0,1	-0,2	0,1	-0,2

^a Được báo cáo là độ tinh khiết thay đổi tương đối so với nguyên liệu ban đầu. Nguyên liệu ban đầu (không ủ) chứa $\geq 98,5\%$ đỉnh monome theo SE-UPLC và $\geq 52,8\%$ đỉnh chính theo CEX UPLC ở tất cả năm dược phẩm.

CEX, trao đổi cation; DS, dược chất; HMW, khối lượng phân tử cao; LMW, khối lượng phân tử thấp; NA, không có; OD, mật độ quang; RP, pha đảo; SE, loại trừ theo kích thước; UPLC, sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Dựa trên các kết quả này, polysorbat 80 0,2% (w/v) được chọn làm chất hoạt động bề mặt vì nó đem lại độ ổn định đủ để ngăn ngừa sự tạo thành các dạng HMW dưới tác động khuấy.

Ví dụ 11: Độ ổn định trong điều kiện tác động và bảo quản của các dược phẩm được lấy làm ví dụ

Độ ổn định trong quá trình bảo quản của các dược phẩm mAb1 50mg/mL và 175mg/mL trong các lọ thủy tinh được thể hiện trong Bảng 11 và Bảng 12, và số liệu về độ ổn định trong điều kiện tăng cường và độ ổn định khi chịu tác động thu được từ hai dược phẩm được thể hiện trong Bảng 13 và Bảng 14, tương ứng. Các nghiên cứu về độ ổn định đã chỉ ra rằng dược phẩm mAb1 50mg/mL và 175mg/mL trong các lọ thủy tinh là ổn định trong ít nhất 24 tháng khi bảo quản ở 2°C đến 8°C. Ngoài ra, dược phẩm mAb1 50mg/mL cũng có độ ổn định rất tốt trong các điều kiện tác động và tăng cường. Dược phẩm ổn định khi bảo quản ở 25°C trong ít nhất 3 tháng và 40°C trong ít nhất 7 ngày, chứng tỏ là dược phẩm 50mg/mL phù hợp với các bộ phận đóng kín đồ chứa cơ bản. Không quan sát thấy có sự thay đổi rõ về màu hoặc vẻ bề ngoài, độ đục, chất dạng hạt, pH, nồng độ protein, độ tinh khiết như được đo bằng SE-UPLC hoặc CEX-UPLC và iCIEF, và hiệu lực được duy trì trong các điều kiện này.

Bảng 11: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm 50mg/mL được bảo quản ở 2 – 8°C

Dược phẩm		mAb1 50mg/mL, L-histidin 10mM, sucroza 5% (w/v), L-prolin 1,5% (w/v), và polysorbat 80 0,2% (w/v), pH 6,0								
Thể tích nạp		1,2mL								
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ thủy tinh loại 1 có dung tích 3mL nút clorobutyl 4432/50 được phủ 13mm FluroTec®								
Thử nghiệm		Thời gian bảo quản ở 2-8 °C (tháng)								
		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Độ đục (NTU bằng phép đo độ đục)		7,41	6,01	6,15	6,61	6,03	6,48	6,29	5,83	
pH		6,0	6,0	6,0	6,1	6,0	6,0	6,0	6,0	
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo HIAC (N/mL)	≥ 10 µm	2	NR	21	8	NR	11	15	21	
	≥ 25 µm	0	NR	2	0	NR	1	1	1	
Phân tích hạt	2 đến 10µm	248	NR	887	1875	NR	607	1254	776	

không quan sát được bằng mắt thường theo MFI (N/mL)	≥ 10µm	15	NR	26	44	NR	15	19	8	
	≥ 25µm	4	NR	3	17	NR	1	3	1	
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	100	98	103	101	105	98	98	
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,2	NR	NR	98,7	NR	98,9	99,2	99,2	
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	NR	100	NR	99,6	99,8	99,9	
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	
	% Monome	99,2	99,1	99,2	99,2	99,1	99,2	99,2	99,1	
	% LMW	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4	
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	18,9	19,0	18,7	19,1	19,4	19,1	20,7	20,5	
	% đỉnh chính	53,9	53,5	54,5	53,7	53,6	55,8	53,8	53,4	
	% đỉnh bazơ	27,3	27,6	26,8	27,2	27,1	25,1	25,5	26,0	
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	31,9	NR	NR	32,3	NR	33,9	33,1	34,0	
	% đỉnh chính	54,7	NR	NR	54,2	NR	54,0	54,0	53,9	
	% đỉnh bazơ	13,5	NR	NR	13,5	NR	12,1	12,9	12,1	
% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)		126	NR	NR	127	NR	125	110	104	

CEX, Trao đổi cation; DS, Dược chất; HMW, Khối lượng phân tử cao; iCIEF, tập trung đẳng điện mao dẫn hiện ảnh, LMW, Khối lượng phân tử thấp; MFI, Hiện ảnh vi dòng; Monome, kháng thể nguyên vẹn; NR, Không được yêu cầu; OD, Mật độ quang; RP, Pha đảo; SE, Loại trừ theo kích thước; UPLC, Sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Bảng 12: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm 175mg/mL được bảo quản ở 2-8°C

Dược phẩm		mAb1 175mg/mL, L-histidin 10mM, sucroza 5% (w/v), L-prolin 1,5% (w/v), và polysorbat 80 0,2% (w/v), pH 6,0								
Thể tích nạp		1,2mL								
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ thủy tinh loại 1 có dung tích 3mL nút clorobutyl 4432/50 được phủ 13mm FluroTec®								
Thử nghiệm		Thời gian bảo quản ở 5°C (tháng)								
		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Độ đục (NTU bằng phép đo độ đục)		6,72	6,95	6,57	6,54	6,62	7,01	6,67	6,87	
pH		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,1	
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo HIAC (N/mL)	≥ 10 μm	10	NR	28	131	NR	30	35	55	
	≥ 25 μm	0	NR	11	56	NR	1	2	3	

Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo MFI (N/mL)	2 đến 10µm	144	NR	441	244	NR	265	319	117	
	≥ 10µm	22	NR	36	22	NR	29	28	8	
	≥ 25µm	1	NR	11	7	NR	3	10	1	
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	95	97	98	97	99	104	101	
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	97,9	NR	98,1	98,0	NR	97,9	98,0	97,9	
	Khử; % chuỗi nặng + nhẹ	100	NR	99,6	100	NR	99,8	99,8	99,8	
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,9	1,0	1,0	
	% Monome	99,1	98,9	99,1	98,7	98,7	98,7	98,6	98,6	
	% LMW	0,4	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	18,7	18,3	18,1	18,7	19,1	19,0	19,0	20,3	
	% đỉnh chính	53,6	55,0	54,6	53,3	53,6	55,5	54,3	53,8	
	% đỉnh bazơ	27,8	26,7	27,4	28,1	27,3	25,5	26,8	25,9	
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	31,8	NR	32,4	31,9	NR	33,9	32,3	32,0	
	% đỉnh chính	54,6	NR	54,6	54,9	NR	54,8	54,6	54,3	
	% đỉnh bazơ	13,6	NR	13,1	13,2	NR	11,3	13,1	13,7	
% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)		102	NR	NR	118	NR	110	91	107	

CEX, Trao đổi cation; DS, Dược chất; HMW, Khối lượng phân tử cao; iCIEF, tập trung đẳng điện mao dẫn hiện ảnh, LMW, Khối lượng phân tử thấp; MFI, Hiện ảnh vi dòng; Monome, kháng thể nguyên vẹn; NR, Không được yêu cầu; OD, Mật độ quang; RP, Pha đảo; SE, Loại trừ theo kích thước; UPLC, Sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Bảng 13: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm 50mg/mL được bảo quản ở các điều kiện tăng cường và tác động

Dược phẩm		mAb1 50mg/mL, L-histidin 10mM, sucroza 5% (w/v), L-prolin 1,5% (w/v), polysorbat 80 0,2% (w/v), pH 6,0						
Thể tích nạp		1,2mL						
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ thủy tinh loại 1 có dung tích 3mL với nút clorobutyl 4432/50 được phủ 13mm FluroTec®						
			Bảo quản ở 25°C/60% RH (tháng)			Bảo quản ở 40°C (ngày)		
Thử nghiệm		0	1	3	6	7	14	28
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Độ đục (NTU bằng Phép đo độ đục)		7,41	6,05	6,54	6,90	6,10	6,60	6,93
pH		6,0	6,0	6,0	6,1	6,0	6,0	6,0
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt	≥ 10 µm	2	NR	17	21	NR	NR	18

thường theo HIAC (#/mL)	≥ 25 μm	0	NR	0	1	NR	NR	1
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo MFI (#/mL)	2-10μm	248	NR	1618	1531	NR	NR	1543
	≥ 10μm	15	NR	29	47	NR	NR	41
	≥ 25μm	4	NR	2	15	NR	NR	15
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	100	100	103	103	102	98
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,2	NR	99,1	98,8	NR	NR	98,9
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	99,5	100	NR	NR	99,5
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,5	0,4	0,6	0,7	0,7	0,9	1,4
	% Monome	99,2	99,0	99,1	98,8	98,9	98,5	97,9
	% LMW	0,4	0,5	0,3	0,5	0,5	0,6	0,7
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	18,9	19,3	21,8	27,0	19,9	22,5	27,2
	% đỉnh chính	53,9	53,4	52,1	48,3	52,3	50,1	46,8
	% đỉnh bazơ	27,3	27,4	26,1	24,8	27,8	27,4	26,0
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	31,9	NR	38,1	43,7	NR	NR	45,4
	% đỉnh chính	54,7	NR	48,6	44,3	NR	NR	42,1
	% đỉnh bazơ	13,5	NR	13,3	12,0	NR	NR	12,5
% Hiệu quả tương đối bằng thử nghiệm sinh học		126	NR	NR	120	NR	NR	99

CEX, Trao đổi cation; DS, Dược chất; HMW, Khối lượng phân tử cao; iCIEF, tập trung đẳng điện mao dẫn hiện ảnh, LMW, Khối lượng phân tử thấp; MFI, Hiện ảnh vi dòng; Monome, kháng thể nguyên vẹn; NR, Không được yêu cầu; OD, Mật độ quang; RP, Pha đảo; SE, Loại trừ theo kích thước; UPLC, Sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Bảng 14: Nghiên cứu độ ổn định của 175mg/mL dược phẩm được bảo quản ở các điều kiện tăng cường và tác động

Dược phẩm	mAb1 175mg/mL, L-histidin 10mM, sucroza 5% (w/v), L-prolin 1,5% (w/v), polysorbat 80 0,2% (w/v), pH 6,0						
Thể tích nạp	1,2mL						
Đồ chứa/Đồ kín	Lọ thủy tinh loại 1 có dung tích 3mL với nút clorobutyl 4432/50 được phủ 13mm FluroTec®						
		bảo quản ở 25°C/60% RH (tháng)			Bảo quản ở 40°C (ngày)		
Thử nghiệm	0	1	3	6	7	14	28
Màu sắc và vẻ bề ngoài	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
Độ đục (NTU bằng Phép đo độ đục)	6,72	6,77	6,82	6,99	6,90	7,30	7,56
pH	6,0	6,0	6,0	6,1	6,0	5,9	6,0

Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo HIAC (#/mL)	≥ 10 µm	10	NR	28	58	NR	NR	97
	≥ 25 µm	0	NR	13	16	NR	NR	44
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo MFI (#/mL)	2-10µm	144	NR	623	277	NR	NR	1131
	≥ 10µm	22	NR	25	8	NR	NR	531
	≥ 25µm	1	NR	3	2	NR	NR	3
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	95	97	99	98	99	95
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	97,9	NR	NR	97,4	NR	NR	97,5
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	NR	99,7	NR	NR	99,4
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,6	0,9	1,2	1,5	1,7	2,6	3,9
	% Monome	99,1	98,6	98,5	98,0	97,7	96,8	95,5
	% LMW	0,4	0,5	0,3	0,6	0,6	0,7	0,6
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	18,7	18,9	21,3	26,2	19,7	22,0	23,9
	% đỉnh chính	53,6	54,4	52,3	48,3	51,7	50,1	49,4
	% đỉnh bazơ	27,8	26,7	26,4	25,5	28,6	27,9	26,7
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	31,8	NR	37,0	45,0	NR	NR	47,3
	% đỉnh chính	54,6	NR	50,3	43,3	NR	NR	39,2
	% đỉnh bazơ	13,6	NR	12,7	11,7	NR	NR	13,5
% Hiệu quả tương đối bằng thử nghiệm sinh học		102	NR	NR	123	NR	NR	86

CEX, Trao đổi cation; DS, Dược chất; HMW, Khối lượng phân tử cao; iCIEF, tập trung đẳng điện mao dẫn hiện ảnh, LMW, Khối lượng phân tử thấp; MFI, Hiện ảnh vi dòng; Monome, kháng thể nguyên vẹn; NR, Không được yêu cầu; OD, Mật độ quang; RP, Pha đảo; SE, Loại trừ theo kích thước; UPLC, Sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Ví dụ 12: Độ ổn định của dược phẩm mAb1 chứa dung dịch đệm histidin, sucroza và polysorbat

Các bảng 15-24 thể hiện tóm tắt độ ổn định trong quá trình bảo quản của dược phẩm chứa mAb1 được lấy làm ví dụ chứa dung dịch đệm histidin 10mM, ở pH 6,0, sucroza và polysorbat.

Bảng 15: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 được bảo quản ở -80°C

Dược phẩm	mAb1 72,2mg/mL, histidin 10mM, pH 6,0, sucroza 5% (w/v)					
Thể tích nạp	1,0mL					
Đồ chứa/Đồ kín	Lọ polycarbonat có dung tích 5mL với nắp xoáy polypropylen được vạch silicon					
	Thời gian bảo quản ở -80°C (tháng)					
Thử nghiệm	0	1	3	6	9	12
Màu sắc và vẻ bề ngoài	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pH		6,2	6,3	6,2	6,1	6,2	6,1
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	94	95	98	95	94
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,5	NR	NR	99,5	NR	99,2
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	NR	100	NR	99,8
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,7	0,7	0,6	0,6	0,7	0,6
	% nguyên thể	98,7	98,8	98,9	98,7	98,9	98,8
	% LMW	0,6	0,6	0,5	0,6	0,4	0,6
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	22,2	22,2	22,6	23,2	24,1	23,5
	% đỉnh chính	49,7	49,8	48,9	46,8	45,2	44,1
	% đỉnh bazơ	28,1	28,0	28,5	30,0	30,7	32,4
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	38,9	NR	NR	39,1	NR	37,5
	% đỉnh chính	56,5	NR	NR	56,2	NR	57,2
	% đỉnh bazơ	4,6	NR	NR	4,7	NR	5,3
% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)		95	NR	NR	81	NR	120

CEX = Trao đổi cation; HMW = Khối lượng phân tử cao; iCIEF = Tập trung đẳng điện mao dẫn hiện ảnh; LMW = Khối lượng phân tử thấp; MCE-SDS = Điện di mao dẫn trên vi chip-natri dodecyl sulfat; MFI = Hiện ảnh vi dòng; NR = Không được yêu cầu; OD = Mật độ quang; RH = Độ ẩm tương đối; RP = Pha đảo; SE = Loại trừ theo kích thước; UPLC = Sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Bảng 16: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 được bảo quản ở -30°C

Dược phẩm		mAb1 72,2mg/mL, histidin 10mM, pH 6,0, sucroza 5% (w/v)					
Thể tích nạp		1,0mL					
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ polycarbonat có dung tích 5mL với nắp xoáy polypropylen được vạch silicon					
		Thời gian bảo quản ở -30°C (tháng)					
Thử nghiệm		0	1	3	6	9	12
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
pH		6,2	6,3	6,2	6,1	6,2	6,1
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	93	95	100	96	96
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,5	NR	NR	99,1	NR	99,2
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	NR	100	NR	99,8
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,7	0,7	0,6	0,7	0,7	0,6
	% nguyên thể	98,7	98,8	99,0	98,7	98,9	98,8
	% LMW	0,6	0,5	0,4	0,6	0,4	0,6
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	22,2	22,5	22,5	23,4	24,2	23,4
	% đỉnh chính	49,7	49,6	48,9	46,6	45,6	44,1
	% đỉnh bazơ	28,1	28,0	28,6	30,0	30,2	32,5
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	38,9	NR	NR	38,2	NR	37,8
	% đỉnh chính	56,5	NR	NR	56,3	NR	56,6
	% đỉnh bazơ	4,6	NR	NR	5,5	NR	5,7

Bảng 17: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 được bảo quản ở -20°C

Dược phẩm		mAb1 72,2mg/mL, histidin 10mM, pH 6,0, sucroza 5% (w/v)					
Thể tích nạp		1,0mL					
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ polycarbonat có dung tích 5mL với nắp xoáy polypropylen được vạch silicon					
		Thời gian bảo quản ở -20°C (tháng)					
Thử nghiệm		0	1	3	6	9	12
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01
pH		6,2	6,3	6,2	6,1	6,1	6,2
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	95	97	101	98	98
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,5	NR	NR	99,5	NR	99,3
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	NR	100	NR	99,9
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7
	% nguyên thể	98,7	98,8	98,9	98,6	98,8	98,8
	% LMW	0,6	0,5	0,5	0,7	0,4	0,6
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	22,2	22,4	22,3	22,4	24,6	23,4
	% đỉnh chính	49,7	49,7	49,2	47,6	45,5	44,2
	% đỉnh bazơ	28,1	27,9	28,5	30,0	30,0	32,5
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	38,9	NR	NR	38,6	NR	38,6
	% đỉnh chính	56,5	NR	NR	56,8	NR	56,2
	% đỉnh bazơ	4,6	NR	NR	4,6	NR	5,3
% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)		95	NR	NR	96	NR	111

Bảng 18: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 - Tác động của các điều kiện tăng cường

Dược phẩm		mAb1 72,2mg/mL, histidin 10mM, pH 6,0, sucroza 5% (w/v)							
Thể tích nạp		1,0mL							
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ polycarbonat có dung tích 5mL với nắp xoáy polypropylen được vạch silicon							
			Bảo quản ở 5°C (ngày)		Bảo quản ở 25°C/60% RH (ngày)		Bảo quản ở 40°C/75% RH (ngày)		
Thử nghiệm		T = 0	28	56	14	28	14	28	
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,03	0,05	
pH		6,2	6,2	6,1	6,2	6,2	6,2	6,1	
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	96	100	97	100	105	113	
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,5	NR	99,1	NR	99,5	NR	99,1	
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	100	NR	99,2	NR	98,7	
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,7	0,9	1,1	1,4	1,7	3,1	4,6	
	% nguyên thể	98,7	98,5	98,4	98,0	97,7	96,1	94,6	
	% LMW	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,9	
Phân tích biến thể		% đỉnh axit	22,2	22,2	22,3	22,0	22,6	25,6	30,8

không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh chính	49,7	49,8	48,9	49,6	49,1	46,0	41,7
	% đỉnh bazơ	28,1	28,1	28,8	28,4	28,3	28,3	27,5
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	38,9	NR	39,0	NR	41,1	NR	58,2
	% đỉnh chính	56,5	NR	56,8	NR	53,8	NR	36,3
	% đỉnh bazơ	4,6	NR	4,2	NR	5,1	NR	5,5
% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)		95	NR	95	NR	84	NR	87

Bảng 19: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 được bảo quản ở -80°C

Dược phẩm		mAb1 25mg/mL, histindin 10mM, pH 6,0, sucroza 10% (w/v), polysorbat 80 0,1%					
Thể tích nạp		1,0mL					
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ polycarbonat có dung tích 5mL với nắp xoáy polypropylen được vạch silicon					
		Thời gian bảo quản ở -80°C (tháng)					
Thử nghiệm		0	1	3	6	9	12
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01
pH		6,1	6,1	6,1	6,0	6,0	6,0
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	100	97	95	100	99
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,5	NR	NR	99,4	NR	99,5
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	NR	100	NR	100
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	% nguyên thể	98,6	98,7	98,6	98,6	98,8	98,7
	% LMW	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	22,8	23,0	23,3	23,5	23,9	25,4
	% đỉnh chính	47,3	47,3	46,2	45,3	44,2	44,2
	% đỉnh bazơ	30,0	29,8	30,6	31,2	31,9	30,4
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	40,1	NR	NR	38,1	NR	41,3
	% đỉnh chính	56,1	NR	NR	57,4	NR	54,1
	% đỉnh bazơ	3,8	NR	NR	4,6	NR	4,6
% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)		112	NR	NR	130	NR	107

Bảng 20: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 được bảo quản ở -30°C

Dược phẩm		mAb1 25mg/mL, histindin 10mM, pH 6,0, sucroza 10% (w/v), polysorbat 80 0,1%					
Thể tích nạp		1,0mL					
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ polycarbonat có dung tích 5mL với nắp xoáy polypropylen được vạch silicon					
		Thời gian bảo quản ở -30°C (tháng)					
Thử nghiệm		0	1	3	6	9	12
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01
pH		6,1	6,1	6,1	6,0	6,1	6,0
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	100	102	97	100	102

Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,5	NR	NR	99,1	NR	99,5
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	NR	100	NR	100
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	% nguyên thể	98,6	98,7	98,6	98,7	98,8	98,7
	% LMW	0,6	0,5	0,6	0,6	0,4	0,6
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	22,8	23,1	22,9	23,5	23,7	25,1
	% đỉnh chính	47,3	47,1	46,5	45,3	44,4	44,4
	% đỉnh bazơ	30,0	29,8	30,6	31,2	31,9	30,5
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	40,1	NR	NR	38,0	NR	41,3
	% đỉnh chính	56,1	NR	NR	57,3	NR	53,3
	% đỉnh bazơ	3,8	NR	NR	4,7	NR	5,4

Bảng 21: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 được bảo quản ở -20°C

Dược phẩm		mAb1 25mg/mL, histidin 10mM, pH 6,0, sucroza 10% (w/v), polysorbat 80 0,1%					
Thể tích nạp		1,0mL					
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ polycarbonat có dung tích 5mL với nắp xoáy polypropylen được vạch silicon					
		Thời gian bảo quản ở -20°C (tháng)					
Thử nghiệm		0	1	3	6	9	12
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
pH		6,1	6,1	6,1	6,0	6,1	6,0
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	99	102	97	106	102
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,5	NR	NR	99,4	NR	99,4
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	NR	100	NR	99,0
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8
	% nguyên thể	98,6	98,7	98,6	98,7	98,8	98,7
	% LMW	0,6	0,5	0,6	0,6	0,4	0,6
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	22,8	22,9	23,5	23,6	24,3	25,2
	% đỉnh chính	47,3	47,3	46,0	45,2	43,8	43,9
	% đỉnh bazơ	30,0	29,8	30,6	31,2	31,9	30,8
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	40,1	NR	NR	38,4	NR	41,6
	% đỉnh chính	56,1	NR	NR	57,9	NR	53,3
	% đỉnh bazơ	3,8	NR	NR	3,7	NR	5,1
% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)		112	NR	NR	120	NR	131

Bảng 22: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 - Tác động của các điều kiện tăng cường

Dược phẩm	mAb1 25mg/mL, histidin 10mM, pH 6,0, sucroza 10% (w/v), polysorbat 80 0,1%
Thể tích nạp	1,0mL
Đồ chứa/Đồ kín	Lọ polycarbonat có dung tích 5mL với nắp xoáy polypropylen được vạch silicon

		Không bảo quản	Bảo quản ở 5°C (ngày)		bảo quản ở 25°C/60% RH (ngày)		bảo quản ở 40°C/75% RH (ngày)	
Thử nghiệm		T = 0	28	56	14	28	14	28
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03
pH		6,1	6,1	6,0	6,1	6,1	6,0	6,0
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	101	102	106	107	113	114
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,5	NR	99,1	NR	99,5	NR	99,3
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	100	NR	100	NR	99,1
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,8	0,7	0,7	0,9	0,9	3,4	5,0
	% nguyên thể	98,6	98,8	98,7	98,6	98,6	95,7	93,7
	% LMW	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,9	1,3
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	22,8	22,8	23,3	22,6	22,8	29,6	32,5
	% đỉnh chính	47,3	47,3	46,1	47,2	47,0	39,5	36,4
	% đỉnh bazơ	30,0	29,9	30,6	30,2	30,2	30,9	31,1
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	40,1	NR	39,8	NR	40,2	NR	53,7
	% đỉnh chính	56,1	NR	57,0	NR	55,9	NR	42,2
	% đỉnh bazơ	3,8	NR	3,2	NR	3,9	NR	4,0
% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)		112	NR	103	NR	91	NR	79

Bảng 23: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 được bảo quản ở 5°C

Dược phẩm		mAb1 25mg/mL, histidin 10mM, sucroza 10% (w/v), polysorbat 80 0,1% (w/v), pH 6,0					
Thể tích nạp		1,0mL					
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút West S2-451 4432/50 GRY B2-40 được phủ 13mm FluroTec®					
		Thời gian bảo quản ở 5°C (tháng)					
Thử nghiệm		0	1	3	6	9	12
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00
pH		6,2	6,1	6,1	6,1	6,0	6,1
Phân tích hạt bằng MFI (hạt/mL)	2 đến 10µm	823	NR	NR	2169	NR	29331
	≥ 10µm	15	NR	NR	10	NR	56
	≥ 25µm	0	NR	NR	3	NR	5
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	100	98	101	102	90
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,4	NR	NR	99,5	NR	99,2
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	NR	100	NR	100
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,7	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9
	% nguyên thể	98,7	98,8	98,7	98,6	98,6	98,5

	% LMW	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	23,0	22,8	23,5	22,4	24,1	22,4
	% đỉnh chính	48,5	48,6	46,2	47,2	44,4	45,5
	% đỉnh bazơ	28,6	28,6	30,4	30,4	31,5	32,1
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	39,8	NR	NR	39,2	NR	40,1
	% đỉnh chính	56,7	NR	NR	56,5	NR	55,7
	% đỉnh bazơ	3,4	NR	NR	4,3	NR	4,1
% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)		111	NR	NR	132	NR	124

Bảng 24: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 được bảo quản ở các điều kiện tăng cường

Dược phẩm		mAb1 25mg/mL, histidin 10mM, sucroza 10% (w/v), polysorbat 80 0,1% (w/v), pH 6,0						
Thể tích nạp		1,0mL						
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút West S2-451 4432/50 GRY B2-40 được phủ 13mm FluroTec®						
			Bảo quản ở 25°C/60% RH (tháng)			Bảo quản ở 45°C (ngày)		
Thử nghiệm		0	0,5	1	3	7	14	28
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02
pH		6,2	6,1	6,1	6,1	6,2	6,1	6,1
Phân tích hạt bằng MFI (hạt/mL)	2 đến 10µm	823	NR	NR	1056	NR	NR	521
	≥ 10µm	15	NR	NR	23	NR	NR	83
	≥ 25µm	0	NR	NR	3	NR	NR	4
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	99	100	99	99	100	99
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,4	NR	NR	99,4	NR	NR	99,2
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	NR	100	NR	NR	98,6
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,7	0,8	0,9	1,1	1,6	3,2	8,5
	% nguyên thể	98,7	98,6	98,5	98,1	97,6	95,9	89,7
	% LMW	0,6	0,6	0,6	0,8	0,8	1,0	1,8
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	23,0	22,6	23,1	25,8	24,7	27,3	34,0
	% đỉnh chính	48,5	48,7	48,1	44,5	46,2	44,1	35,9
	% đỉnh bazơ	28,6	28,8	28,9	29,8	29,1	28,6	30,2
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	39,8	NR	NR	47,1	NR	NR	66,9
	% đỉnh chính	56,7	NR	NR	49,5	NR	NR	30,2
	% đỉnh bazơ	3,4	NR	NR	3,5	NR	NR	3,0
% Hiệu quả tương đối bằng thử nghiệm sinh học		111	NR	NR	94	NR	NR	63

Các bảng 25-27 thể hiện tóm tắt độ ổn định của các dược phẩm được lấy làm ví dụ trong các điều kiện chịu tác động.

Bảng 25: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 - Tác động của các điều kiện chịu tác động

Dược phẩm		mAb1 72,2mg/mL, histidin 10mM, pH 6,0, sucroza 5% (w/v)				
Thể tích nạp		1,0mL				
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ polycarbonat có dung tích 5mL với nắp xoáy polypropylen được vạch silicon				
			Khuấy (phút)		Đông lạnh/rã đông (chu kỳ)	
Thử nghiệm		T = 0	10	15	4	8
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,09	0,01	0,00
pH		6,2	6,2	6,2	6,3	6,3
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	100	99	95	95
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,5	NR	99,2	NR	99,4
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	100	NR	100
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,7	0,8	4,6	0,6	0,7
	% nguyên thể	98,7	98,7	94,9	98,9	98,8
	% LMW	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	22,2	22,2	21,9	22,0	22,2
	% đỉnh chính	49,7	49,6	49,9	49,7	49,6
	% đỉnh bazơ	28,1	28,2	28,2	28,3	28,2
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	38,9	NR	40,8	NR	39,0
	% đỉnh chính	56,5	NR	54,7	NR	56,5
	% đỉnh bazơ	4,6	NR	4,6	NR	4,5
% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)		95	NR	87	NR	89

Bảng 26: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 - Tác động của các điều kiện chịu tác động

Dược phẩm		mAb1 25mg/mL, histidin 10mM, pH 6,0, sucroza 10% (w/v), polysorbat 80 0,1% (w/v)				
Thể tích nạp		1,0mL				
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ polycarbonat có dung tích 5mL với nắp xoáy polypropylen được vạch silicon				
		Không tác động	Khuấy (phút)		Đông lạnh/rã đông (chu kỳ)	
Thử nghiệm		T = 0	60	120	4	8
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pH		6,1	6,1	6,1	6,1	6,1
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	101	100	99	100

Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,5	NR	99,5	NR	99,6
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	100	NR	100
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8
	% nguyên thể	98,6	98,7	98,7	98,7	98,6
	% LMW	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	22,8	22,8	22,8	22,9	22,7
	% đỉnh chính	47,3	47,2	47,3	47,1	47,2
	% đỉnh bazơ	30,0	30,0	29,2	30,1	30,1
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	40,1	NR	39,6	NR	40,0
	% đỉnh chính	56,1	NR	56,9	NR	56,3
	% đỉnh bazơ	3,8	NR	3,5	NR	3,6
% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)		112	NR	106	NR	137

Bảng 27: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 – Tác động của các điều kiện chịu tác động

Dược phẩm		mAb1 25mg/mL, histidin 10mM, sucroza 10% (w/v), polysorbat 80 0,1% (w/v), pH 6,0				
Thể tích nạp		1,0mL				
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút West S2-451 4432/50 GRY B2-40 được phủ 13mm FluroTec®				
			Khuấy (phút)		Đông lạnh/rã đông (chu kỳ)	
Thử nghiệm		0	60	120	4	8
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pH		6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
Phân tích hạt bằng MFI (hạt/mL)	2 đến 10µm	823	NR	1170	NR	1404
	≥ 10µm	15	NR	38	NR	67
	≥ 25µm	0	NR	0	NR	2
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	100	101	101	101
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,4	NR	99,4	NR	99,3
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	100	NR	100
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7
	% nguyên thể	98,7	98,8	98,7	98,7	98,6
	% LMW	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	23,0	22,9	22,8	22,8	22,7
	% đỉnh chính	48,5	48,3	48,4	48,4	48,5
	% đỉnh bazơ	28,6	28,8	28,8	28,8	28,8
Phân tích biến thể không		% đỉnh axit	39,8	NR	39,6	NR

mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh chính	56,7	NR	56,9	NR	56,9
	% đỉnh bazơ	3,4	NR	3,4	NR	3,6
% Hiệu quả tương đối bằng thử nghiệm sinh học		111	NR	90	NR	129

Bảng 28: Độ ổn định của các dược phẩm mAb1 ở nồng độ 50mg/mL và 25mg/mL trong các điều kiện tăng cường và điều kiện chịu tác động

Dược phẩm		mAb1 50mg/mL, histidin 10mM, sucroza 10% (w/v), polysorbat 80 0,1% (w/v), pH 6,0			mAb1 25mg/mL, histidin 10mM, sucroza 10% (w/v), polysorbat 80 0,1% (w/v), pH 6,0		
Thể tích nạp		1,0mL			1,0mL		
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút West S2-451 4432/50 GRY B2-40 được phủ 13mm FluroTec®			Lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút West S2-451 4432/50 GRY B2-40 được phủ 13mm FluroTec®		
Thử nghiệm		T=0	25°C/60%RH 1 tháng	45°C 28 ngày	T=0	25°C/60%RH 1 tháng	45°C 28 ngày
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,01	0,02	0,00	0,01	0,02
pH		6,0	6,0	6,1	6,2	6,1	6,1
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	103	113	100	100	99
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	1,9	4,0	10,8	0,7	0,9	8,5
	% Monome	97,5	95,2	88,0	98,7	98,5	89,7
	% LMW	0,6	0,8	1,2	0,6	0,6	1,8
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	24,6	29,0	37,1	23,0	23,1	34,0
	% đỉnh chính	49,9	42,5	33,2	48,5	48,1	35,9
	% đỉnh bazơ	25,6	28,5	29,7	28,6	28,9	30,2

Ví dụ 13: Nghiên cứu khoảng chấp nhận được đã được chứng minh (Proven Acceptable Range-PAR)

Trong quá trình sản xuất sản phẩm dược phẩm mAb1 (DP), có thể cần thay đổi thành phần của DP. Các thay đổi này có thể bao gồm nồng độ của hoạt chất, nồng độ của các tá dược, và/hoặc độ pH của dược phẩm. Do các thay đổi về thông số bất kỳ trong số các thông số này có thể tác động đến độ ổn định hoặc hiệu lực của sản phẩm dược phẩm, nên các nghiên cứu về khoảng chấp nhận được đã được chứng minh (PAR) được tiến hành để đánh giá liệu các thay đổi về thành phần DP, trong các khoảng xác định, có tác động đến độ ổn định hoặc hiệu lực của DP mAb1 hay không.

Hai nghiên cứu thiết kế thử nghiệm “Design-Of-Experiment-DOE) được sử dụng để đánh giá tác động của mỗi thông số dược phẩm cũng như là các tương tác đến độ ổn định của dược phẩm:

- Nghiên cứu tiền PAR thiết kế hệ số phân đoạn với đánh giá độ ổn định trong điều kiện tăng cường và chịu tác động để xác định các thông số dược phẩm có tính quyết định có thể tác động đến độ ổn định của DP mAb1;
- Nghiên cứu PAR thiết kế hệ số đầy đủ bao gồm các thông số dược phẩm có tính quyết định được xác định từ nghiên cứu tiền PAR, với độ ổn định kéo dài trong thời hạn sử dụng để chỉ ra khoảng chấp nhận được của các thông số dược phẩm.

Thiết kế nghiên cứu tiền PAR

Để đánh giá các thông số dược phẩm có tính quyết định và/hoặc tương tác ở thành phần DP mà có thể là quan trọng đối với chất lượng sản phẩm, DOE hệ số phân đoạn được áp dụng để đánh giá độ ổn định của dược phẩm trong điều kiện tăng cường và chịu tác động bằng cách thay đổi toàn bộ các thông số của dược phẩm, bao gồm nồng độ protein ($\pm 10\%$), nồng độ dung dịch đệm và chất làm ổn định ($\pm 20\%$), nồng độ chất hoạt động bề mặt ($\pm 50\%$), và pH ($\pm 0,3$ đơn vị). Các khoảng thông số của dược phẩm thử nghiệm được xác định là bằng hoặc rộng hơn tiêu chuẩn chấp nhận của thông số kỹ thuật và kinh nghiệm sản xuất. Nghiên cứu này được thiết kế bằng phần mềm thống kê sử dụng thử nghiệm hệ số phân đoạn phân giải IV $2^{(6-2)}$. Cùng với bốn dược phẩm đích làm các tâm điểm, nghiên cứu này bao gồm 20 lần tiến hành, như được thể hiện trong bảng 29.

Bảng 29: Dược phẩm được thử nghiệm trong nghiên cứu tiền PAR

Dược phẩm	[mAb1] mg/mL	[histidin]mM	sucroza % (w/v)	L-prolin % (w/v)	polysorbat 80 % (w/v)	pH
1	45	12	4	1,2	0,3	6,3
2	45	12	4	1,8	0,3	5,7
3	45	8	6	1,8	0,3	6,3
4	50	10	5	1,5	0,2	6,0
5	45	8	4	1,8	0,1	6,3
6	55	8	6	1,2	0,1	6,3
7	55	8	4	1,2	0,3	6,3
8	50	10	5	1,5	0,2	6,0
9	55	12	6	1,8	0,3	6,3
10	45	12	6	1,2	0,1	6,3
11	55	8	4	1,8	0,3	5,7
12	55	8	6	1,8	0,1	5,7
13	45	12	6	1,8	0,1	5,7
14	55	12	6	1,2	0,3	5,7
15	50	10	5	1,5	0,2	6,0
16	45	8	6	1,2	0,3	5,7
17	55	12	4	1,8	0,1	6,3
18	45	8	4	1,2	0,1	5,7
19	50	10	5	1,5	0,2	6,0
20	55	12	4	1,2	0,1	5,7

Toàn bộ 20 dược phẩm ở các điều kiện tăng cường và các điều kiện chịu tác động (25°C, 37°C, đông lạnh/rã đông [F/T] và khuấy) được xác định và đánh giá các đặc tính vật lý/hóa học và độ ổn định, kể cả quan sát bằng mắt thường, pH, độ đục, nồng độ mol, độ dẫn điện, độ tinh khiết, nồng độ protein và mức thu hồi, phân tích biến thể mang điện tích, và phân tích hạt không nhìn thấy bằng mắt thường.

Các kết quả của nghiên cứu tiền PAR

Toàn bộ 20 dược phẩm đều không bị thay đổi sau khi khuấy hoặc sau khi chịu tác động F/T. Các kết quả thu được từ quá trình ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 37°C được phân tích bằng mô hình hồi quy (mô hình khớp JMP với phương pháp bình phương nhỏ nhất chuẩn và nhấn mạnh vào tác dụng đòn bẩy). Phân tích thống kê các biến số chính và biến số tương tác của tất cả các dược phẩm thử nghiệm về các đặc tính chất lượng giới hạn đã cho thấy rằng độ pH, nồng độ protein và nồng độ sucroza là quan trọng đối với chất lượng sản phẩm. Hai đặc tính về chất lượng sản phẩm chịu tác động là dạng HMW và các biến thể mang điện tích có tính axit. Các thông số dược phẩm khác, kể cả các nồng độ histidin, prolin hoặc polysorbat 80 nằm trong khoảng thử nghiệm, được nhận thấy là không có tác động đáng kể có ý nghĩa thống kê đến chất lượng sản phẩm. Trong các điều kiện tăng cường, không có sự tương tác thứ cấp hoặc sự tương tác ở cấp cao hơn nào mà có thể tác động đến độ ổn định của dược phẩm. Các kết quả của nghiên cứu tiền PAR

đã chỉ ra rằng độ pH, nồng độ mAb1, và nồng độ sucroza là có tính quyết định đối với độ ổn định của dược phẩm mAb1, và được coi là các thông số có tính quyết định đối với dược phẩm mAb1 50mg/mL.

Mặc dù, độ pH, nồng độ mAb1 và nồng độ sucroza được xác định là các thông số dược phẩm có tính quyết định, song tác động của ba yếu tố này đến các đặc tính chất lượng là rất nhỏ. Dựa trên phân tích thống kê, sự thay đổi về khoảng pH 5,7–6,3, khoảng nồng độ 45–55mg/mL của mAb1, và/hoặc khoảng nồng độ 4–6% của sucroza có thể có tác động < 15% đến sự tạo thành dạng HMW và các biến thể mang điện tích có tính axit.

Để khẳng định tác động đến độ ổn định trong quá trình bảo quản trong thời gian dài ở điều kiện bảo quản DP được khuyến cáo, ba thông số dược phẩm có tính quyết định sau: pH, nồng độ mAb1, và nồng độ sucroza, còn được đánh giá trong nghiên cứu PAR với độ ổn định bảo quản trong thời gian dài.

Thiết kế nghiên cứu PAR

Thiết kế hệ số đầy đủ DOE được áp dụng để đánh giá độ ổn định của dược phẩm trong quá trình bảo quản trong thời hạn sử dụng dài với độ pH khác nhau ($\pm 0,3$ đơn vị), nồng độ protein ($\pm 10\%$), và nồng độ sucroza ($\pm 20\%$), cần 8 lần tiến hành thử nghiệm (Bảng 30); dược phẩm đối chứng (dược phẩm 3, dược phẩm đích trong Bảng 30) được bao gồm là dược phẩm tam điểm.

Bảng 30: Các dược phẩm được thử nghiệm trong nghiên cứu PAR

Dược phẩm	[mAb1] mg/mL	[histidin]mM	sucroza % (w/v)	L-prolin % (w/v)	polysorbat 80 % (w/v)	pH
1	55	10	6	1,5	0,2	5,7
2	45	10	6	1,5	0,2	5,7
3	50	10	5	1,5	0,2	6,0
4	55	10	6	1,5	0,2	6,3
5	55	10	4	1,5	0,2	6,3
6	55	10	4	1,5	0,2	5,7
7	45	10	4	1,5	0,2	6,3
8	45	10	4	1,5	0,2	5,7
9	45	10	6	1,5	0,2	6,3

Thiết kế nghiên cứu hệ số đầy đủ cho phép ước tính được toàn bộ các giới hạn tác động chính cũng như là các giới hạn tương tác. Các khoảng thông số của dược phẩm thử nghiệm, được xác định là bằng hoặc rộng hơn tiêu chuẩn kỹ thuật được chấp nhận và khoảng kinh nghiệm sản xuất, vẫn giữ nguyên như trong nghiên cứu tiền PAR.

Độ ổn định của các dược phẩm thử nghiệm được so sánh với độ ổn định của dược phẩm đối chứng ở độ pH 6,0 chứa toàn bộ các thành phần dược phẩm ở các nồng độ thông thường (F3). Các nghiên cứu PAR đã sử dụng lô DS mAb1 được sản xuất bằng quy trình sản xuất điển hình trên thị trường. Các dược phẩm DP được nạp vào lọ thủy tinh borosilicat loại 1 Schott có dung tích 10mL, với nút West S2 451 4432/50 GRY B2-40 được phủ 20mm FluroTec® (dạng trình bày của DP trên thị trường) và được đánh giá về độ ổn định trong quá trình bảo quản trong thời gian dài ở nhiệt độ 2-8°C. Dược phẩm được nghiên cứu theo quy trình phân tích nêu trong bảng 31.

Bảng 31: Kế hoạch phân tích đối với nghiên cứu PAR

Thử nghiệm	Các mẫu được phân tích	Các đặc tính chất lượng
Về bề ngoài	Toàn bộ	Màu sắc, các hạt nhìn thấy được bằng mắt thường
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	Toàn bộ	Màu sắc, các hạt, độ trong
Độ đục bằng phép đo độ đục	t = 0, 6, 12, 18, 24, và 36 tháng ở 5°C	Độ trong (Sự kết tủa dung dịch, các hạt, Độ đục)
pH	Toàn bộ	pH
Tổng lượng protein được xác định bằng RP-UPLC	t = 0	Nồng độ protein
Nồng độ mol	t = 0	Nồng độ chất tan
Độ dẫn điện	t = 0	Đặc tính dẫn điện
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	Toàn bộ	Các biến thể về khối lượng phân tử: % HMW, % Monome, % LWM
Phân tích biến thể không mang điện tích theo cIEF	t = 0, 6, 12, 18, 24, và 36 tháng ở 5°C	Các chất đồng dạng mang điện tích: % đỉnh axit, % đỉnh chính, % đỉnh bazơ
Chất hạt (Làm mờ ánh sáng)	t = 0, 6, 12, 18, 24, và 36 tháng ở 5°C	Các hạt không quan sát được bằng mắt thường. Tiêu chuẩn chấp nhận nêu ở USP <788> (< 6000 hạt/đô chứa đối với hạt $\geq 10 \mu\text{m}$ và < 600 hạt/đô chứa đối với hạt $\geq 25 \mu\text{m}$)
Chất hạt (Hiện ảnh vi dòng, MFI)	t = 0, 6, 12, 18, 24, và 36 tháng ở 5°C	Các hạt không quan sát được bằng mắt thường (chỉ mang tính thông tin)
Thử nghiệm sinh học	t = 0, 6, 12, 18, 24, và 36 tháng ở 5°C	Hiệu lực Tiêu chuẩn chấp nhận: 50-150% so với tiêu chuẩn đối chứng

Các kết quả của nghiên cứu PAR

Tác động đến sự tạo thành dạng HMW

Không có sự tăng đáng kể về lượng % HMW như được đo bằng SE-UPLC tối đa 12 tháng ở nhiệt độ 2-8°C đối với tất cả 9 dược phẩm. Toàn bộ các giá trị đều

thấp hơn so với giới hạn trên, và không quan sát thấy có sự tăng đáng kể về % HMW theo thời gian.

Sự tạo thành các dạng HMW đối với DP mAb1 50mg/mL ở nhiệt độ 2-8°C được nhận thấy là cực thấp. Tối đa 12 tháng, mức thay đổi tối đa % HMW tương đối ở 9 được phẩm là ~ 0,2%. Vì sự thay đổi % HMW là tối thiểu, và nồng độ monome có thể được coi là hằng định, sự kết tụ từ monome thành dạng HMW có thể được đơn giản hóa như một phản ứng bậc không. Do đó, mô hình tuyến tính đơn giản hóa được sử dụng để phân tích số liệu về độ ổn định của %HMW. Bằng cách khớp tuyến tính %HMW theo thời gian, tỷ lệ tạo thành dạng HMW được tính toán cho mỗi được phẩm.

Tỷ lệ được phẩm phân tích so với các yếu tố chính cũng như là tất cả các giới hạn tương tác bằng cách sử dụng mô hình hồi quy (mô hình khớp JMP với phương pháp bình phương nhỏ nhất tiêu chuẩn và nhấn mạnh vào tác dụng tròn bầy). Mô hình hồi quy thu được là có ý nghĩa thống kê với R^2 bằng 0,74. Nồng độ mAb1, độ pH, và thời gian là có ý nghĩa thống kê, song tác động đến sự tạo thành loại %HMW là có ý nghĩa thống kê, chỉ chiếm tối đa 0,1%.

Do đó, các hệ số này, pH ở 5,7-6,3, nồng độ mAb1 ở 45-55mg/mL, và nồng độ sucroza ở 4-6%, không có liên quan thực tế đến độ ổn định của %HMW ở nhiệt độ 2-8 °C.

%HMW ở tất cả 9 được phẩm tại thời điểm lên đến 12-tháng đều thấp hơn giới hạn xác định chấp nhận được là 4% và do đó nằm trong khoảng công bố và khoảng cuối cùng của thông số kỹ thuật về thời hạn sử dụng. Ngoài ra, các mô hình tuyến tính đã dự đoán rằng sau khi bảo quản trong 24 tháng thời hạn sử dụng ở 2°C - 8°C, %HMW, nằm trong khoảng từ 0,6% đến 0,8%, cũng sẽ thấp hơn giới hạn của thông số kỹ thuật.

Dựa trên số liệu về độ ổn định bảo quản trong thời gian dài, các thay đổi về thông số được phẩm giới hạn nằm trong khoảng nghiên cứu được nhận thấy là không làm ảnh hưởng đáng kể đến độ ổn định của được phẩm mAb1. Được phẩm mAb1 50mg/mL có sự tạo thành các dạng HMW nhiều trong khoảng thành phần được phẩm thử nghiệm.

Tác động đến sự tạo thành các biến thể mang điện tích có tính axit

Không có sự tăng đáng kể % các biến thể mang điện tích có tính axit được đo ở thời điểm lên tới 12 tháng ở 2-8°C ở tất cả 9 dược phẩm. Tất cả các giá trị đều thấp hơn giới hạn trên của thông số kỹ thuật, và không quan sát thấy có sự tăng đáng kể về % các biến thể mang điện tích có tính axit theo thời gian.

Dược phẩm mAb1 được coi là có sự tạo thành mạnh các biến thể mang điện tích có tính axit trong khoảng thành phần dược phẩm được thử nghiệm.

Các tác động đến các đặc tính chất lượng nói chung

Tác động của độ pH, nồng độ mAb1, và sucroza, cũng như là thời gian bảo quản đến các đặc tính chất lượng nói chung của DP, bao gồm vẻ bề ngoài, độ pH, độ đục, các hạt không quan sát được bằng mắt thường, mức thu hồi protein, % monome và % LMW theo SEC, % biến thể chính và % các biến thể mang điện tích có tính bazơ theo iCIEF, và hoạt tính sinh học được nghiên cứu. Tất cả các giá trị đều nằm trong khoảng thông số kỹ thuật và không quan sát thấy có sự thay đổi đáng kể nào theo thời gian hoặc sự chênh lệch giữa các dược phẩm PAR:

- Theo quan sát bằng mắt thường hoặc các phương pháp đo độ đục (OD ở 405nm và phép đo độ đục) không phát hiện thấy có kết tủa hoặc các hạt nhìn thấy được bằng mắt thường;
- Không quan sát thấy có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê về mức thu hồi protein (RP-UPLC);
- Độ pH của dược phẩm là ổn định;
- Không quan sát thấy có sự tăng đáng kể về lượng các hạt không quan sát được bằng mắt thường, và không có sự chênh lệch đáng kể về lượng hạt không quan sát được bằng mắt thường giữa các dược phẩm nghiên cứu PAR.
 - Đối với các hạt không quan sát được bằng mắt thường đo được bằng HIAC, tất cả các giá trị đều thấp hơn giới hạn chấp nhận được nêu trong USP <788>, và không quan sát thấy sự thay đổi đáng kể về lượng hạt không quan sát được bằng mắt thường giữa các dược phẩm.

○ Ngoài ra, lượng hạt không quan sát được bằng mắt thường cũng được đo bằng MFI. Không quan sát thấy sự thay đổi đáng kể về lượng hạt không quan sát được bằng mắt thường giữa các dược phẩm.

- Các kết quả của thử nghiệm sinh học đều nằm trong giới hạn thông số kỹ thuật đối với tất cả các dược phẩm trong quá trình bảo quản.

Các kết quả đã chỉ ra rằng các thay đổi về các thông số dược phẩm có tính quyết định (độ pH, nồng độ mAb1, và nồng độ sucroza) trong khoảng nghiên cứu không có tác động đáng kể đến độ ổn định của dược phẩm mAb1. Dược phẩm mAb1 50mg/mL có các đặc tính chất lượng chung cao nằm trong khoảng thành phần dược phẩm thử nghiệm.

Tác động của việc đông lạnh và rã đông đến độ ổn định của các dược phẩm PAR

Độ ổn định vật lý và hóa học của dược phẩm mAb1 50mg/mL, được đánh giá theo hai chu kỳ đông lạnh và rã đông, không bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi các thông số dược phẩm có tính quyết định, tức là sự thay đổi độ pH $\pm 0,3$ đơn vị so với mAb1 đối chứng, sự thay đổi nồng độ mAb1 $\pm 10\%$, và/hoặc sự thay đổi nồng độ sucroza $\pm 20\%$.

Các tác động dưới đây được quan sát:

- Không phát hiện thấy kết tủa theo quan sát bằng mắt thường hoặc theo các phương pháp đo độ đục (OD ở bước sóng 405 nm);
- Không quan sát thấy có sự hao hụt protein (RP-UPLC);
- Độ pH của dược phẩm vẫn giữ nguyên không đổi;
- Không quan sát thấy có sự chênh lệch đáng kể về lượng hạt không quan sát được bằng mắt thường, được xác định bằng phương pháp làm mờ ánh sáng (HIAC) hoặc hiện ảnh vi dòng (MFI) giữa các dược phẩm nghiên cứu. Có sự tăng nhẹ về lượng hạt không quan sát được bằng mắt thường sau hai chu kỳ F/T, mà có thể được loại bỏ bằng cách lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc bằng $0,22\mu\text{m}$ trước khi nạp DP.
- Không quan sát thấy có sự thay đổi đáng kể về độ tinh khiết, như được xác định bởi SE-UPLC, ở tất cả các dược phẩm sau hai chu kỳ đông lạnh và rã đông;

- Không quan sát thấy có sự thay đổi đáng kể về sự phân bố các biến thể mang điện tích, như được xác định bởi iCIEF, ở tất cả các dược phẩm sau hai chu kỳ đông lạnh và rã đông.

- Các kết quả của thử nghiệm sinh học đã chứng tỏ rằng hoạt tính mAb1 được duy trì ở tất cả các dược phẩm được tiến hành hai chu kỳ đông lạnh và rã đông.

Các kết luận

Các nghiên cứu tiền PAR và PAR dựa trên thiết kế thử nghiệm (Design-Of-experiment-DOE) được sử dụng để đánh giá tác động của các thông số dược phẩm cũng như là các tương tác đến độ ổn định của dược phẩm. Nghiên cứu tiền PAR về độ ổn định trong điều kiện tăng cường và chịu tác động đã xác định được độ pH, nồng độ mAb1, và nồng độ sucroza là các thông số dược phẩm có tính quyết định. Nghiên cứu PAR hệ số đầy đủ với độ ổn định trong thời hạn sử dụng dài đã chứng tỏ rằng sự thay đổi về các thông số dược phẩm có tính quyết định, nằm trong khoảng nghiên cứu, không làm ảnh hưởng đến chất lượng của DP mAb1.

Cụ thể là, độ ổn định và hiệu lực của DP mAb1 50mg/mL được bảo quản ở nhiệt độ 5°C trong 12 tháng không bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi nồng độ protein $\pm 10\%$, sự thay đổi nồng độ sucroza, L-prolin và/hoặc histidin $\pm 20\%$, và/hoặc sự thay đổi nồng độ polysorbat 80 $\pm 50\%$, và/hoặc sự thay đổi độ pH $\pm 0,3$ đơn vị.

Hiệu lực mạnh của dược phẩm mAb1 được chứng minh bằng nghiên cứu PAR. Nói chung, các kết quả thu được từ nghiên cứu tiền PAR và PAR đã chứng tỏ rằng sự thay đổi về thành phần của dược phẩm mAb1 nằm trong khoảng nghiên cứu sẽ không làm ảnh hưởng xấu đến độ ổn định của DP mAb1 trong các điều kiện bảo quản được khuyến cáo (2 đến 8°C).

Các mẫu FDS mAb1 50mg/mL đều ổn định sau hai chu kỳ đông lạnh và rã đông (đông lạnh -30°C và rã đông ở nhiệt độ phòng). Độ ổn định của FDS mAb1 với tác dụng đông lạnh/rã đông không bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi nồng độ mAb1 $\pm 10\%$, sự thay đổi nồng độ sucroza $\pm 20\%$, và/hoặc sự thay đổi độ pH $\pm 0,3$ đơn vị so với FDS mAb1 đối chứng (50mg/mL). Các kết quả thu được từ các nghiên cứu đông lạnh/rã đông này đã chứng tỏ rằng FDS mAb1 50mg/mL có thể được đông

lạnh và rã đông trong quá trình sản xuất DP mAb1 mà không gây ra tác động xấu nào đến độ ổn định của FDS.

Ví dụ 14: Đồ chứa

Dược phẩm mAb1 trong lọ thủy tinh (để phân phối bằng cách truyền tĩnh mạch) được phát triển. Đồ chứa sản phẩm được mAb1 được dự định để triển khai lâm sàng sau đó và thương mại hóa sản phẩm cũng là bơm tiêm nạp sẵn, mà được trình bày dưới dạng bơm tiêm độc lập để tự tiêm hoặc được lắp vào thiết bị tiêm tự động để tự sử dụng.

Ví dụ 15: Độ ổn định của dược phẩm mAb1 trong các lọ thủy tinh

Bảng 32 – 35 thể hiện tóm tắt độ ổn định của các dược phẩm mAb1 được lấy làm ví dụ trong các lọ thủy tinh có dung tích 10mL.

Bảng 32: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 được bảo quản ở 2 – 8°C

Dược phẩm		mAb1 50mg/mL, L-histidin 10mM, sucroza 5% (w/v), L-prolin 1,5% (w/v), và polysorbat 80 0,2% (w/v), pH 6,0							
Thể tích nạp		5,5mL							
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ thủy tinh loại 1 có dung tích 10mL với nút clorobutyl 4432/50 được phủ 20mm FluroTec®							
Thử nghiệm		Thời gian bảo quản ở 5°C (tháng)							
		0	1	3	6	9	12	18	24
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
pH		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo MFI (N/mL)	2 đến 10µm	175	NR	62	772	NR	1730	NR	
	≥ 10µm	8	NR	3	144	NR	18	NR	
	≥ 25µm	0	NR	1	19	NR	4	NR	
% Protein được thu hồi bởi SE-UPLC		100	102	103	101	105	103	104	
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,1	NR	NR	99,1	NR	99,2	NR	
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	NR	100	NR	100	NR	
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	
	% Monome	99,1	99,3	99,3	99,3	99,2	99,2	99,2	
	% LMW	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC ⁻	% đỉnh axit	18,9	18,9	18,9	19,8	20,5	19,8	18,9	
	% đỉnh chính	53,5	53,3	53,4	54,7	54,3	54,0	52,9	
	% đỉnh bazơ	27,5	27,8	27,7	25,6	25,2	26,2	28,2	
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	33,8	NR	34,3	34,2	NR	34,9	NR	
	% đỉnh chính	54,8	NR	54,2	54,3	NR	54,3	NR	
	% đỉnh bazơ	11,4	NR	11,4	11,4	NR	10,8	NR	

% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)	92	NR	NR	122	NR	112	NR	
--	----	----	----	-----	----	-----	----	--

CEX, Trao đổi cation; DS, Dược chất; HMW, Khối lượng phân tử cao; iCIEF, tập trung đẳng điện mao dẫn hiện ảnh, LMW, Khối lượng phân tử thấp; MFI, Hiện ảnh vi dòng; NR, Không được yêu cầu; OD, Mật độ quang; RP, Pha đảo; SE, Loại trừ theo kích thước; UPLC, Sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Bảng 33: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 ở các điều kiện tăng cường và chịu tác động

Dược phẩm		mAb1 50mg/mL, L-histidin 10mM, sucroza 5% (w/v), L-prolin 1,5% (w/v), và polysorbat 80 0,2% (w/v), pH 6,0						
Thể tích nạp		5,5mL						
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ thủy tinh loại 1 có dung tích 10mL với nút clorobutyl 4432/50 được phủ 20mm FluroTec®						
			Bảo quản 25°C/60% RH (tháng)			Bảo quản 40°C (ngày)		
Thử nghiệm		0	1	3	6	7	14	28
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pH		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo MFI (#/mL)	2-10µm	175	NR	326	2083	NR	NR	288
	≥ 10µm	8	NR	4	109	NR	NR	14
	≥ 25µm	0	NR	3	3	NR	NR	1
% Protein được thu hồi bởi SE-UPLC		100	102	104	101	100	101	102
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,1	NR	NR	98,8	NR	NR	98,6
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	NR	99,7	NR	NR	99,7
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,3	0,4	0,5	0,6	0,5	0,8	1,2
	% Monome	99,1	99,1	99,1	99,0	98,7	98,5	98,1
	% LMW	0,6	0,5	0,4	0,4	0,7	0,7	0,7
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	18,9	19,4	22,1	28,3	20,0	22,0	27,1
	% đỉnh chính	53,5	52,7	51,2	48,6	51,9	50,2	46,7
	% đỉnh bazơ	27,5	27,9	26,8	23,2	27,1	27,7	26,2
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	33,8	NR	NR	41,9	NR	NR	46,4
	% đỉnh chính	54,8	NR	NR	46,5	NR	NR	40,9
	% đỉnh bazơ	11,4	NR	NR	11,6	NR	NR	12,7
% Hiệu quả tương đối bằng thử nghiệm sinh học		92	NR	NR	91	NR	NR	83

CEX, Trao đổi cation; DS, Dược chất; HMW, Khối lượng phân tử cao; iCIEF, tập trung đẳng điện mao dẫn hiện ảnh, LMW, Khối lượng phân tử thấp; MFI, Hiện ảnh vi dòng; NR, Không được yêu cầu; OD, Mật độ quang; RP, Pha đảo; SE, Loại trừ theo kích thước; UPLC, Sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Bảng 34: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 được bảo quản ở 2 – 8°C

Dược phẩm		mAb1 50mg/mL, L-histidin 10mM, sucroza 5% (w/v), L-prolin 1,5% (w/v), và polysorbat 80 0,2% (w/v), pH 6,0							
Thể tích nạp		7,44mL							
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ thủy tinh loại 1 có dung tích 10mL với nút clorobutyl 4432/50 được phủ 20mm FluroTec®							
Thử nghiệm		Thời gian bảo quản ở 2-8 °C (tháng)							
		0	1	3	6	9	12	18	24
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt			
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
pH		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0			
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo HIAC (N/mL)	≥ 10 µm	3	NR	2	4	NR			
	≥ 25 µm	0	NR	0	1	NR			
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo MFI (N/mL)	2 đến 10µm	183	NR	207	1044	NR			
	≥ 10µm	3	NR	7	19	NR			
	≥ 25µm	1	NR	3	5	NR			
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	99	102	102	94			
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,2	NR	99,4	99,2	NR			
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	100	100	NR			
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,7	0,6	0,5	0,5	0,6			
	% Monome	98,8	98,8	98,9	99,0	98,9			
	% LMW	0,6	0,6	0,5	0,4	0,5			
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	21,2	21,2	22,3	19,6	21,5			
	% đỉnh chính	52,0	52,1	52,0	51,9	52,0			
	% đỉnh bazơ	26,8	26,8	25,7	28,6	26,6			
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	34,3	NR	34,7	34,6	NR			
	% đỉnh chính	52,1	NR	51,9	51,9	NR			
	% đỉnh bazơ	13,7	NR	13,4	13,4	NR			
% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)		113	NR	105	128	NR			

CEX, Trao đổi cation; DS, Dược chất; HMW, Khối lượng phân tử cao; iCIEF, tập trung đẳng điện mao dẫn hiện ảnh, LMW, Khối lượng phân tử thấp; MFI, Hiện ảnh vi dòng; NR, Không được yêu cầu; OD, Mật độ quang; RP, Pha đảo; SE, Loại trừ theo kích thước; UPLC, Sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Bảng 35: Nghiên cứu độ ổn định của dược phẩm mAb1 ở các điều kiện tăng cường và chịu tác động

Dược phẩm		mAb1 50mg/mL, L-histidin 10mM, sucroza 5% (w/v), L-prolin 1,5% (w/v), và polysorbat 80 0,2% (w/v), pH 6,0						
Thể tích nạp		7,44mL						
Đồ chứa/Đồ kín		Lọ thủy tinh loại 1 có dung tích 10mL với nút clorobutyl 4432/50 được phủ 20mm FluroTec®						
			Bảo quản 25°C/60% RH (tháng)			Bảo quản 40°C (ngày)		
Thử nghiệm		0	1	3	6	7	14	28
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pH		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo HIAC (N/mL)	≥ 10 µm	3	NR	4	11	NR	NR	5
	≥ 25 µm	0	NR	0	2	NR	NR	0
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo MFI (#/mL)	2-10µm	183	NR	540	1439	NR	NR	799
	≥ 10µm	3	NR	18	16	NR	NR	92
	≥ 25µm	1	NR	1	1	NR	NR	1
% Protein được thu hồi bởi SE-UPLC		100	100	101	101	101	99	100
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	99,2	NR	99,3	98,7	NR	NR	98,6
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	100	NR	100	100	NR	NR	99,5
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,7	0,6	0,7	0,8	0,6	0,8	1,3
	% Monome	98,8	98,8	98,8	98,7	98,7	98,5	97,9
	% LMW	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	21,2	21,7	25,3	24,4	20,5	23,2	25,8
	% đỉnh chính	52,0	52,1	51,4	50,5	52,4	51,0	49,7
	% đỉnh bazơ	26,8	26,2	23,3	25,1	27,0	25,9	24,6
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	34,3	NR	40,0	45,4	NR	NR	46,9
	% đỉnh chính	52,1	NR	47,1	43,7	NR	NR	39,7
	% đỉnh bazơ	13,7	NR	12,9	11,0	NR	NR	13,3
% Hiệu quả tương đối bằng thử nghiệm sinh học		113	NR	143	99	NR	NR	88

CEX, Trao đổi cation; DS, Dược chất; HMW, Khối lượng phân tử cao; iCIEF, tập trung đẳng điện mao dẫn hiện ảnh, LMW, Khối lượng phân tử thấp; MFI, Hiện ảnh vi dòng; NR, Không được yêu cầu; OD, Mật độ quang; RP, Pha đảo; SE, Loại trừ theo kích thước; UPLC, Sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Hai dược phẩm ở các thể tích nạp khác nhau được nhận thấy là ổn định với điều kiện tác động (40°C/75% RH) (số liệu không được thể hiện).

Ví dụ 16: Độ ổn định của dược phẩm mAb1 trong các bơm tiêm nạp sẵn

Bảng 36 – 38 thể hiện tóm tắt độ ổn định của dược phẩm chứa mAb1 có nồng độ cao trong các bơm tiêm nạp sẵn.

Bảng 36: Nghiên cứu độ ổn định của sản phẩm dược phẩm mAb1 trong bơm tiêm nạp sẵn (PFS) được bảo quản ở nhiệt độ 5°C

Dược phẩm		mAb1 175mg/mL, histindin 10mM, sucroza 5% (w/v), L-prolin 1,5% (w/v), polysorbat 80 0,2% (w/v), pH 6,0					
Thể tích nạp		1,2mL					
Đồ chứa/Đồ kín		Bơm tiêm thủy tinh có dung tích 2,25mL Nuova Ompi EZ Fill với kim tiêm thành mỏng 1/2 27G và nắp kim tiêm FM30 được làm kín với pittong caosu 4023/50 được phủ FluroTec®					
		Thời gian bảo quản ở 5°C (tháng)					
Thử nghiệm		0	1	3	6	9	12
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
pH		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo HIAC (#/mL)	≥ 10 µm	35	NR	17	59	NR	13
	≥ 25 µm	0	NR	4	1	NR	1
Phân tích hạt bằng MFI (hạt/mL)	2 đến 10µm	21326	NR	8613	NA	NR	NA
	≥ 10µm	82	NR	303	NA	NR	NA
	≥ 25µm	3	NR	2	NA	NR	NA
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	96	97	100	98	100
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	97,6	NR	NR	97,7	97,1	NA
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	99,6	NR	NR	99,8	99,8	NA

Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,9
	% nguyên thể	99,1	98,9	99,1	98,7	98,7	98,6
	% LMW	0,3	0,5	0,2	0,5	0,5	0,5
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	18,6	18,5	18,2	18,6	19,3	18,8
	% đỉnh chính	53,4	54,8	54,3	53,2	53,5	55,5
	% đỉnh bazơ	27,9	26,8	27,5	25,3	25,6	24,3
Phân tích biến thể không mang điện tích theo icIEF	% đỉnh axit	30,2	NR	30,2	32,9	NR	NA
	% đỉnh chính	55,9	NR	55,9	53,4	NR	NA
	% đỉnh bazơ	13,9	NR	13,9	13,7	NR	NA
% Hiệu quả tương đối (thử nghiệm sinh học)		87	NR	NR	141	NR	NA

Bảng 37: Nghiên cứu độ ổn định của sản phẩm dược phẩm mAb1 trong bơm tiêm nạp sẵn (PFS) được bảo quản ở các điều kiện tăng cường

Dược phẩm	mAb1 175mg/mL, histindin 10mM, sucroza 5% (w/v), L-prolin 1,5% (w/v), polysorbat 80 0,2% (w/v), pH 6,0
-----------	--

Thể tích nạp		1,2mL						
Đồ chứa/Đồ kín		Bơm tiêm thủy tinh có dung tích 2,25mL Nuova Ompi EZ Fill với kim tiêm thành mỏng 1/2 27G và nắp kim tiêm FM30 được làm kín với pittong caosu 4023/50 được phủ FluroTec®						
			Bảo quản ở 25°C/60% RH (tháng)			Bảo quản ở 40°C (ngày)		
Thứ nghiệm		0	1	3	6	7	14	28
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
pH		6,0	6,0	6,0	6,1	6,0	6,0	6,0
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo HIAC (#/mL)	≥ 10 μm	3	NR	13	30	NR	NR	14
	≥ 25 μm	1	NR	1	1	NR	NR	3
Phân tích hạt bằng MFI (hạt/mL)	2-10μm	21326	NR	4605	NA	NR	NR	3717
	≥ 10μm	82	NR	225	NA	NR	NR	51
	≥ 25μm	3	NR	2	NA	NR	NR	8
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	98	98	100	100	100	98
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	97,6	NR	97,7	96,5	NR	NR	96,8
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	99,6	NR	99,2	99,7	NR	NR	99,4
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,6	0,9	1,2	1,6	1,6	2,5	3,9
	% nguyên thể	99,1	98,6	98,5	97,7	97,8	96,9	95,5
	% LMW	0,3	0,5	0,3	0,6	0,6	0,7	0,6
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	18,6	19,0	21,3	25,5	20,0	22,1	24,3
	% đỉnh chính	53,4	54,3	52,0	46,5	51,8	49,8	48,9
	% đỉnh bazơ	27,9	26,8	26,6	28,1	28,3	28,1	26,8
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	30,2	NR	36,8	44,9	NR	NR	45,6
	% đỉnh chính	55,9	NR	49,6	42,8	NR	NR	40,5
	% đỉnh bazơ	13,9	NR	13,6	12,3	NR	NR	13,9
% Hiệu quả tương đối bằng thử nghiệm sinh học		87	NR	NR	137	NR	NR	83

Bảng 38: Nghiên cứu độ ổn định của sản phẩm dược phẩm mAb1 trong bơm tiêm nạp sẵn (PFS) – Tác động của các điều kiện chịu tác động

Dược phẩm	mAb1 175mg/mL, histidin 10mM, sucroza 5% (w/v), L-prolin 1,5% (w/v), polysorbat 80 0,2% (w/v), pH 6,0
Thể tích nạp	1,2mL
Đồ chứa/Đồ kín	Bơm tiêm thủy tinh có dung tích 2,25mL Nuova Ompi EZ Fill với kim tiêm thành mỏng 1/2 27G và nắp kim tiêm FM30 được làm kín

		với pittong caosu 4023/50 được phủ FluroTec®		
			Khuấy (phút)	
Thử nghiệm		0	60	120
Màu sắc và vẻ bề ngoài		Đạt	Đạt	Đạt
Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)		0,00	0,00	0,00
pH		6,0	6,0	6,0
Phân tích hạt không quan sát được bằng mắt thường theo HIAC (#/mL)	≥ 10µm	3	NR	5
	≥ 25µm	1	NR	5
Phân tích hạt bằng MFI (hạt/mL)	2 đến 10µm	21326	NR	13896
	≥ 10µm	82	NR	55
	≥ 25µm	3	NR	3
% Protein được thu hồi bởi RP-UPLC		100	100	100
Độ tinh khiết theo MCE-SDS	Không khử; % đỉnh chính	97,6	NR	97,9
	Khử; % chuỗi nặng + chuỗi nhẹ	99,6	NR	99,5
Độ tinh khiết theo SE-UPLC	% HMW	0,6	0,6	0,6
	% nguyên thể	99,1	98,9	98,8
	% LMW	0,3	0,6	0,6
Phân tích biến thể không mang điện tích theo CEX-UPLC	% đỉnh axit	18,6	18,8	19,0
	% đỉnh chính	53,4	53,2	53,5
	% đỉnh bazơ	27,9	28,1	27,5
Phân tích biến thể không mang điện tích theo iCIEF	% đỉnh axit	30,2	NR	30,4
	% đỉnh chính	55,9	NR	55,5
	% đỉnh bazơ	13,9	NR	14,1
% Hiệu quả tương đối bằng thử nghiệm sinh học		87	NR	100

Ví dụ 17: Độ tương thích của dược phẩm mAb1 trong các thiết bị phân phối qua đường tĩnh mạch (IV)

Để đánh giá độ tương thích, dược phẩm mAb1 50mg/mL được bổ sung vào túi IV có dung tích 100mL, chứa dung dịch tiêm natri clorua 0,9% hoặc dung dịch tiêm dextroza 5%, để đánh giá liệu mAb1 có ổn định khi được phân phối qua đường tĩnh mạch hay không. Để chứng minh sự thay đổi về cân nặng của bệnh nhân, hai nồng độ kết hợp, mAb1 1,0mg/mL và mAb1 25mg/mL, được đánh giá trong nghiên cứu này để phản ánh các tình trạng dùng liều cao và thấp. Các thành phần trong hỗn hợp IV dưới đây được sử dụng trong các nghiên cứu đánh giá độ tương thích:

- Sản phẩm dược phẩm
 - DP mAb1 50mg/mL

- Chất pha loãng
 - dung dịch tiêm natri clorua 0,9%
 - dung dịch tiêm dextroza 5%
- Túi IV
 - Túi IV làm bằng polyvinyl clorua (PVC) và di-(2-ethylhexyl)phtalat (DEHP) được nạp sẵn dung dịch tiêm natri clorua 0,9%
 - Túi IV làm bằng polyvinyl clorua (PVC) và DEHP được nạp sẵn dung dịch tiêm dextroza 5%
 - Túi IV làm bằng polyolefin (PO) được nạp sẵn dung dịch tiêm natri clorua 0,9%
 - Túi IV làm bằng polyolefin (PO) được nạp sẵn dung dịch tiêm dextroza 5%
 - Túi IV làm bằng polypropylen được nạp sẵn dung dịch tiêm natri clorua 0,9%
 - Lọ IV làm bằng polypropylen được nạp sẵn dung dịch tiêm natri clorua 0,9%
- Bơm IV
 - Bơm nhu động
 - Bơm dịch chuyển chất lỏng
- Bộ truyền IV
 - Bộ IV làm bằng PVC và DEHP
 - Bộ IV làm bằng PVC và dioctyl terephtalat (DEHT)
 - Bộ IV làm bằng PVC và trioctyl trimellitrat (TOTM)
 - Bộ IV làm bằng PVC được lót polyetylen
 - Bộ IV làm bằng polyuretan
- Bộ lọc
 - bộ lọc trực tiếp bằng polyetessulfon có kích thước lỗ lọc bằng 0,2µm
 - bộ lọc trực tiếp bằng polyetessulfon có kích thước lỗ lọc bằng 1,2µm

- bộ lọc trực tiếp bằng polyetesulfon có kích thước lỗ lọc bằng 5µm
- bộ lọc trực tiếp bằng polyetesulfon có kích thước lỗ lọc bằng 15µm.

Các DP được sử dụng trong nghiên cứu này là GMP được sản xuất bằng cách sử dụng quy trình sản xuất DP mang tính thương mại điển hình. Các túi IV chứa hỗn hợp ban đầu được giữ ở nhiệt độ 5°C trong 24 giờ; sau đó ủ các túi trong ít nhất 8 giờ ở nhiệt độ 25°C. Sau các lần ủ này, mỗi bộ truyền được nối với túi IV, được môi bằng hỗn hợp và được giữ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, mỗi hỗn hợp được bơm qua bộ truyền tương ứng ở tốc độ 25mL/giờ và 500mL/giờ.

Các phương pháp được sử dụng để đánh giá độ tương thích của hỗn hợp: Độ tương thích của hỗn hợp mAb1 với các nguyên liệu được sử dụng trong thiết bị phân phối IV được đánh giá bằng cách sử dụng các thử nghiệm sau:

- Màu sắc và vẻ bề ngoài theo quan sát bằng mắt thường
- pH
- Độ đục được đo bằng cách tăng mật độ quang (OD) ở bước sóng 405nm
- Phân tích lượng hạt không quan sát được bằng mắt thường ở hỗn hợp bằng cách làm mờ ánh sáng (HIAC)
- Nồng độ protein của mAb1 theo sắc ký lỏng siêu hiệu năng pha đảo (RP-UPLC)
- Độ tinh khiết theo SE-UPLC
- Phân tích biến thể mang điện tích theo CEX-UPLC
- Hiệu lực, theo thử nghiệm sinh học: Hiệu lực tương đối của mỗi mẫu được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh học và được xác định là: $(IC_{50} \text{ mẫu đối chứng} / IC_{50} \text{ mẫu}) * 100\%$. Hiệu lực đo được của các mẫu đánh giá độ ổn định trong quá trình bảo quản phải nằm trong khoảng 50-150% của hiệu lực đo được của mẫu chuẩn đối chứng.

Kết quả và kết luận: dược phẩm mAb1 50mg/mL, được pha loãng trong dung dịch tiêm natri clorua 0,9% hoặc dung dịch tiêm dextroza 5% đến nồng độ bằng

1,0mg/mL hoặc 25mg/mL là ổn định cả về mặt vật lý và hóa học trong mọi điều kiện thử nghiệm trong khoảng liều và điều kiện sử dụng được đề xuất. Số liệu này chứng minh cho các kết luận về việc bào chế liều và việc sử dụng IV của DP mAb1 dưới đây:

- Túi IV chứa dung dịch tiêm natri clorua 0,9% và dung dịch tiêm dextroza 5% làm bằng PVC và DEHP, PO, và polypropylen là phù hợp với việc sử dụng IV mAb1.
- DP mAb1 có thể được pha loãng đến nồng độ thấp bằng 1,0mg/mL trong các túi IV PVC, PO hoặc polypropylen chứa natri clorua 0,9% hoặc Dextroza 5% để sử dụng IV.
- DP mAb1 có thể được pha loãng đến nồng độ cao bằng 25,0mg/mL trong các túi IV PVC, PO hoặc polypropylen chứa natri clorua 0,9% hoặc Dextroza 5% để sử dụng IV.
- Hỗn hợp mAb1 trong natri clorua 0,9% hoặc dextroza 5% là ổn định sau khi ủ trong túi IV PVC, PO hoặc polypropylen trong khoảng thời gian tối đa 24 giờ ở nhiệt độ 5°C và 8 giờ ở nhiệt độ 25°C. DP mAb1 đã pha loãng có thể được sử dụng trong vòng 6 giờ bào chế.
- MAb1 đã pha loãng có thể được sử dụng bằng cách sử dụng bơm truyền chuẩn.
- mAb1 đã pha loãng có thể được sử dụng với bộ truyền làm bằng PVC chứa DEHP, PVC chứa TOTM, polyetylen hoặc polyuretan.
- mAb1 phù hợp với việc sử dụng bộ lọc trực tiếp polyetesulfon có kích thước lỗ lọc bằng 0,2µm – 5µm.
- mAb1 đã pha loãng có thể được sử dụng ở tốc độ nằm trong khoảng từ 25 đến 500mL/giờ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa:

(a) kháng thể liên kết đặc hiệu với protein chết theo chương trình của người 1 (human programmed death-1-PD-1), trong đó kháng thể bao gồm ba vùng quyết định bổ trợ chuỗi nặng (complementarity determining region-CDR) (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) nằm trong vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region-HCVR) và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region-LCVR), trong đó HCDR1 bao gồm SEQ ID NO: 3, HCDR2 bao gồm SEQ ID NO: 4 và HCDR3 bao gồm SEQ ID NO: 5, LCDR1 bao gồm SEQ ID NO: 6; LCDR2 bao gồm SEQ ID NO: 7 và LCDR3 bao gồm SEQ ID NO: 8;

(b) dung dịch đệm bao gồm histidin;

(c) dung môi hữu cơ bao gồm polysorbat;

(d) sucroza làm chất làm ổn định; và

(e) prolin làm chất cải biến độ nhớt;

trong đó dược phẩm dạng lỏng ổn định có độ pH bằng $6,0 \pm 0,3$.

2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó nồng độ kháng thể là:

(a) từ $5 \text{ mg/mL} \pm 0,75 \text{ mg/mL}$ đến $250 \text{ mg/mL} \pm 37,5 \text{ mg/mL}$;

(b) $25 \text{ mg/mL} \pm 3,75 \text{ mg/mL}$;

(c) $50 \text{ mg/mL} \pm 7,5 \text{ mg/mL}$;

(d) $150 \text{ mg/mL} \pm 22,5 \text{ mg/mL}$; hoặc

(e) $175 \text{ mg/mL} \pm 26,25 \text{ mg/mL}$.

3. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nồng độ dung dịch đệm histidin là nằm trong khoảng từ $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ đến $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$, tùy ý trong đó:

(a) nồng độ dung dịch đệm histidin là $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$; và/hoặc

(b) dung dịch đệm histidin được điều chế từ L-histidin và L-histidin monohydroclorua monohydrat, ngoài ra tùy ý trong đó dung dịch đệm histidin được

điều chế từ L-histidin $4,8 \text{ mM} \pm 0,96 \text{ mM}$ và L-histidin monohydroclorua monohydrat $5,2 \text{ mM} \pm 1,04 \text{ mM}$.

4. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nồng độ polysorbat là từ $0,01\% \pm 0,005\%$ đến $0,5\% \pm 0,25\% \text{ w/v}$, tùy ý trong đó:

(a) nồng độ polysorbat là $0,1\% \pm 0,05\% \text{ w/v}$ hoặc $0,2\% \pm 0,1\% \text{ w/v}$; và/hoặc

(b) polysorbat là polysorbat 80.

5. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó nồng độ sucroza là từ $1\% \pm 0,2\%$ đến $20\% \pm 4\% \text{ w/v}$, tùy ý trong đó nồng độ sucroza là từ $1\% \pm 0,2\%$ đến $10\% \pm 2\% \text{ w/v}$ như $5\% \pm 1\% \text{ w/v}$.

6. Dược phẩm theo điểm 5, trong đó nồng độ sucroza là $5\% \pm 1\% \text{ w/v}$ và nồng độ prolin là từ $1\% \pm 0,2\%$ đến $5\% \pm 1\% \text{ w/v}$ như $1,5\% \pm 0,3\% \text{ w/v}$.

7. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa:

(a) kháng thể với nồng độ từ $5 \text{ mg/mL} \pm 0,75 \text{ mg/mL}$ đến $250 \text{ mg/mL} \pm 37,5 \text{ mg/mL}$,

(b) dung dịch đệm histidin với nồng độ $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$,

(c) polysorbat với nồng độ $0,2\% \pm 0,1\% \text{ w/v}$,

(d) sucroza với nồng độ $5\% \pm 1\% \text{ w/v}$, và

(e) prolin với nồng độ $1,5\% \pm 0,3\% \text{ w/v}$;

ở pH $6,0 \pm 0,3$;

tùy ý, trong đó nồng độ kháng thể là: (i) $175 \text{ mg/mL} \pm 26,25 \text{ mg/mL}$ kháng thể; (ii) $150 \text{ mg/mL} \pm 22,5 \text{ mg/mL}$ kháng thể; (iii) $50 \text{ mg/mL} \pm 7,5 \text{ mg/mL}$ kháng thể; hoặc (iv) $25 \text{ mg/mL} \pm 3,75 \text{ mg/mL}$ kháng thể.

8. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa:

- (a) kháng thể với nồng độ từ 5 mg/mL $\pm$ 0,75mg/mL đến 250 mg/mL $\pm$ 37,5 mg/mL,
 - (b) L-histidin với nồng độ 0,74 mg/mL,
 - (c) L-histidin monohydroclorua monohydrat với nồng độ 1,1 mg/mL,
 - (d) polysorbat với nồng độ 2 mg/mL,
 - (e) sucroza với nồng độ 50 mg/mL, và
 - (f) prolin với nồng độ 15 mg/mL;
- ở pH 6,0 $\pm$ 0,3;

tùy ý, trong đó nồng độ kháng thể là: (i) 175 mg/mL $\pm$ 26,25 mg/mL kháng thể; (ii) 150 mg/mL $\pm$ 22,5 mg/mL kháng thể; (iii) 50 mg/mL $\pm$ 7,5 mg/mL kháng thể; hoặc (iv) 25 mg/mL $\pm$ 3,75 mg/mL kháng thể.

9. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó:

- (a) ít nhất 90% kháng thể có cấu hình nguyên thể sau 28 ngày ở 45°C; và/hoặc
- (b) ít nhất 35% kháng thể là biến thể mang điện tích chính của kháng thể sau 28 ngày ở 45°C; và/hoặc
- (c) ít nhất 94% kháng thể có cấu hình nguyên thể sau ba tháng ở 25°C; và/hoặc
- (d) ít nhất 44% kháng thể là biến thể mang điện tích chính của kháng thể sau ba tháng ở 25°C; và/hoặc
- (e) ít nhất 96% kháng thể có cấu hình nguyên thể sau 12 tháng ở 5°C; và/hoặc
- (f) ít nhất 45% kháng thể là biến thể mang điện tích chính của kháng thể sau 12 tháng ở 5°C; và/hoặc
- (g) ít nhất 96% kháng thể có cấu hình nguyên thể sau 12 tháng ở -20°C, -30°C, và/hoặc -80°C; và/hoặc
- (h) ít nhất 40% kháng thể là biến thể mang điện tích chính của kháng thể sau 12 tháng ở -20°C, -30°C, và/hoặc -80°C.

10. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó kháng thể bao gồm HCVR nêu trong SEQ ID NO: 1 và LCVR nêu trong SEQ ID NO: 2.

11. Được phẩm theo điểm 10, trong đó nồng độ kháng thể là: (i) 175 mg/mL $\pm$ 26,25 mg/mL kháng thể; (ii) 150 mg/mL $\pm$ 22,5 mg/mL kháng thể; (iii) 50 mg/mL $\pm$ 7,5 mg/mL kháng thể; hoặc (iv) 25 mg/mL $\pm$ 3,75 mg/mL kháng thể.

12. Được phẩm theo điểm 11, trong đó:

(a) $\geq 90\%$ kháng thể có khối lượng phân tử bằng 143 kDa $\pm$ 1 kDa; và/hoặc

(b) được phẩm có độ nhớt nhỏ hơn 20 mPa-s ở 25°C, tùy ý nhỏ hơn 15 mPa-s ở 25°C.

13. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó kháng thể bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó:

(a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9;

(b) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11;

(c) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10;

(d) kháng thể bao gồm chuỗi nặng/chuỗi nhẹ có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9/10; hoặc

(e) kháng thể bao gồm chuỗi nặng/chuỗi nhẹ có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11/10.

14. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó được phẩm này thích hợp để sử dụng dưới da hoặc trong tĩnh mạch.

15. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó được phẩm này được đựng trong đồ chứa, tùy ý trong đó:

(a) đồ chứa là lọ;

(b) đồ chứa là lọ và lọ này là lọ thủy tinh trong loại 1 có dung tích 10 mL;

(c) đồ chứa là bơm tiêm;

(d) đồ chứa là bơm tiêm và bơm tiêm là thủy tinh vonfam thấp;

- (e) đồ chứa là bơm tiêm nạp sẵn; hoặc
- (f) đồ chứa là bơm tiêm tự động.

16. Kit chứa được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, đồ chứa, và hướng dẫn sử dụng, tùy ý trong đó:

- (a) đồ chứa là lọ thủy tinh;
- (b) đồ chứa là bơm tiêm nạp sẵn; hoặc
- (c) đồ chứa là bơm tiêm tự động.

17. Được phẩm theo điểm 1, trong đó được phẩm này chứa:

- (a) kháng thể với nồng độ $50 \text{ mg/mL} \pm 7,5 \text{ mg/mL}$,
- (b) L-histidin với nồng độ $0,74 \text{ mg/mL}$,
- (c) L-histidin monohydroclorua monohydrat với nồng độ $1,1 \text{ mg/mL}$,
- (d) polysorbat 80 với nồng độ 2 mg/mL ,
- (e) sucroza với nồng độ 50 mg/mL , và
- (f) prolin với nồng độ 15 mg/mL ;

trong nước ở độ pH $6,0 \pm 0,3$.

Dược phẩm	mAb1 150mg/mL, Histidin 10mM										
Thể tích nạp	0,4mL										
Đồ chứa/đồ đựng											
Tá dược	pH	Màu sắc và vẻ bề ngoài	Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405 nm)	pH	% mAb1 được thu hồi bởi RP-UPLC	Độ tinh khiết theo SE-UPLC			Các biến thể mang điện tích theo CEX-UPLC		
						% HMW	% nguyên thể	% LMW	% Axit	% chính	% bazơ
Nguyên liệu ban đầu (a1)	-	không đạt	0,00	-	100	3,4	96,1	0,5	26,2	48,9	24,9
-	5,3	Không đạt	Mẫu được gell hóa								
	5,6	Không đạt	Mẫu được gell hóa								
	5,9	Không đạt	0,40	5,8	95	49,3	49,9	0,8	32,5	39,1	28,4
	6,0	Không đạt	0,51	6,0	99	44,1	55,0	0,9	36,9	41,9	21,3
	6,4	Không đạt	0,65	6,3	98	38,1	61,0	0,9	45,9	34,8	19,4
	5,3	Đạt	0,14	5,3	95	46,9	52,4	0,7	33,7	37,6	28,6
Sucroza 9%	5,5	Đạt	0,16	5,5	99	34,9	64,2	0,9	35,7	36,3	28,0
	5,9	Đạt	0,13	5,8	100	25,5	73,6	1,0	36,0	37,2	26,8
	6,0	Đạt	0,14	6,0	99	21,9	77,1	1,0	40,0	34,5	25,5
	6,4	Đạt	0,15	6,3	98	19,6	79,4	1,0	48,9	26,7	24,4
	5,4	Không đạt	Mẫu được gell hóa								
	5,6	Không đạt	Mẫu được gell hóa								
Sucroza 5% Arginin 70mM	5,9	Không đạt	Mẫu được gell hóa								
	6,0	Không đạt	Mẫu được gell hóa								
	6,4	Không đạt	Mẫu được gell hóa								
	6,4	Không đạt	0,46	6,3	100	45,8	53,1	1,0	46,6	31,1	22,3

Fig.1

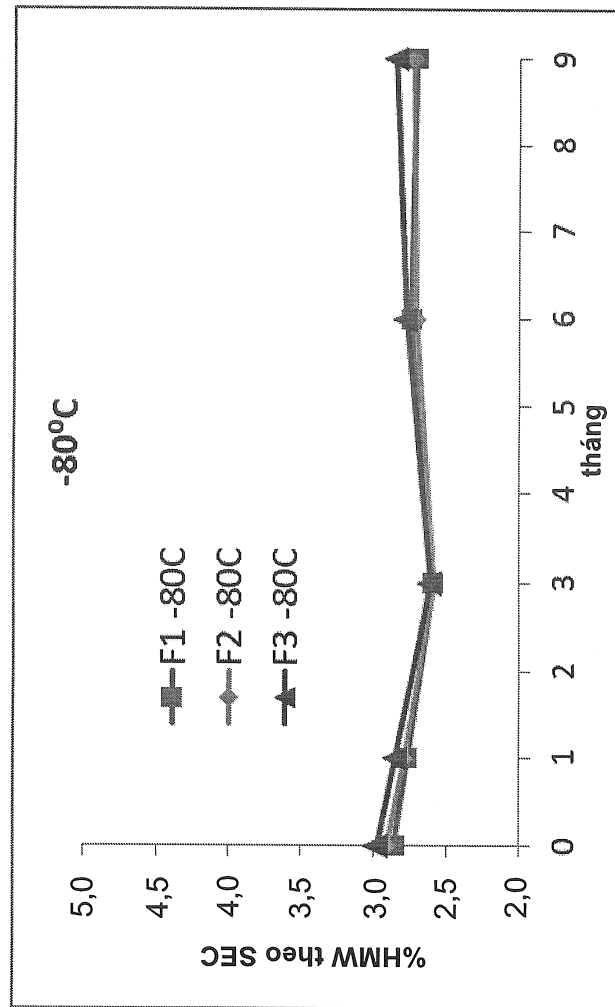


Fig.2A

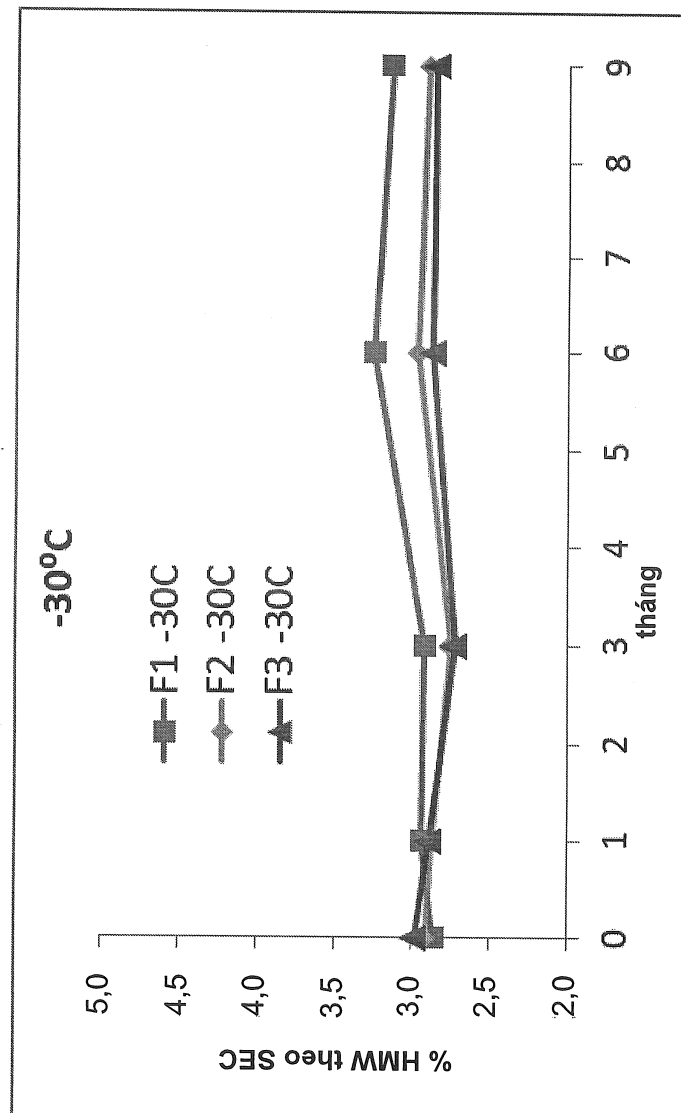


Fig.2B

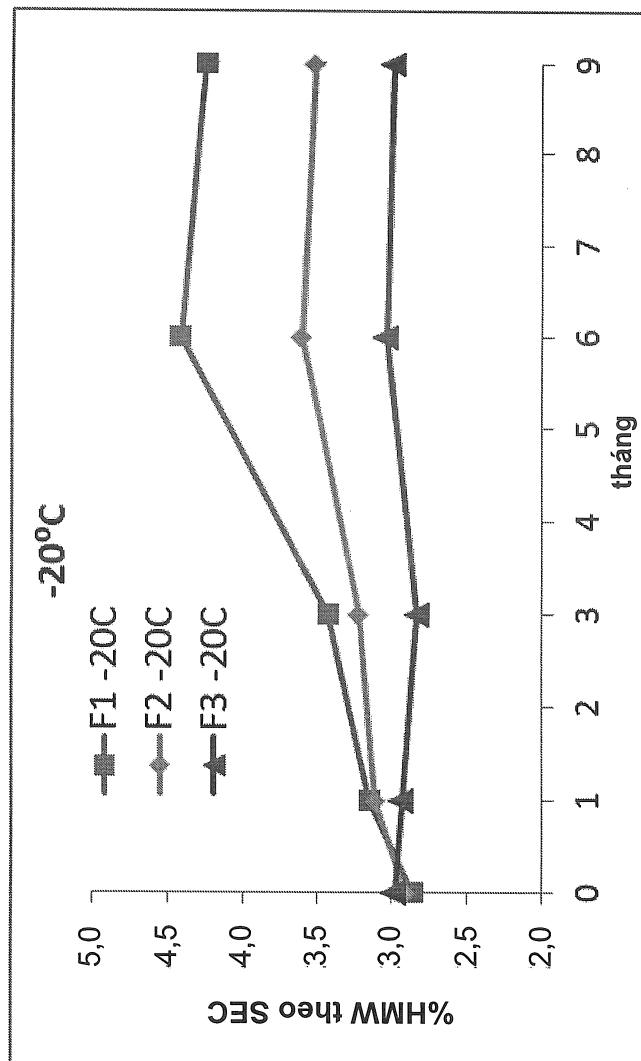


Fig.2C

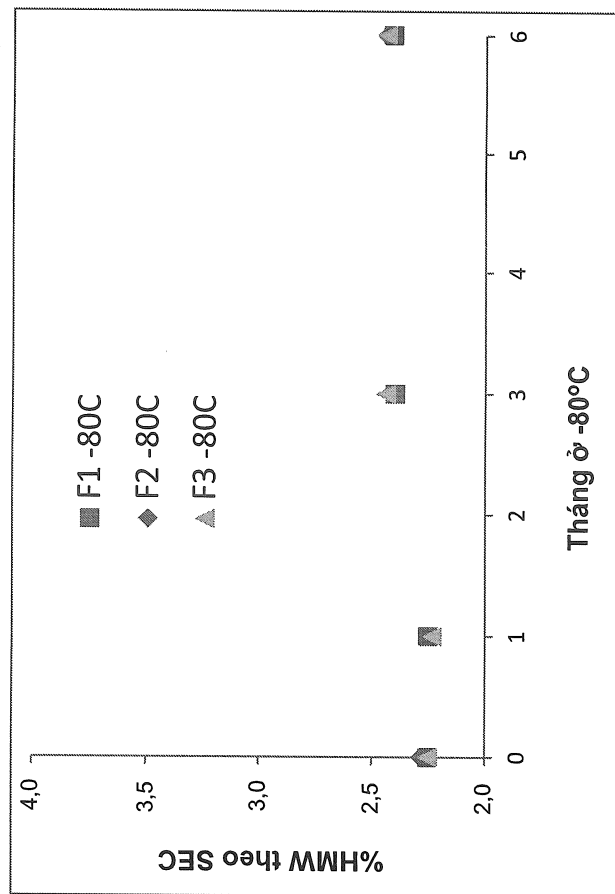


Fig.3A

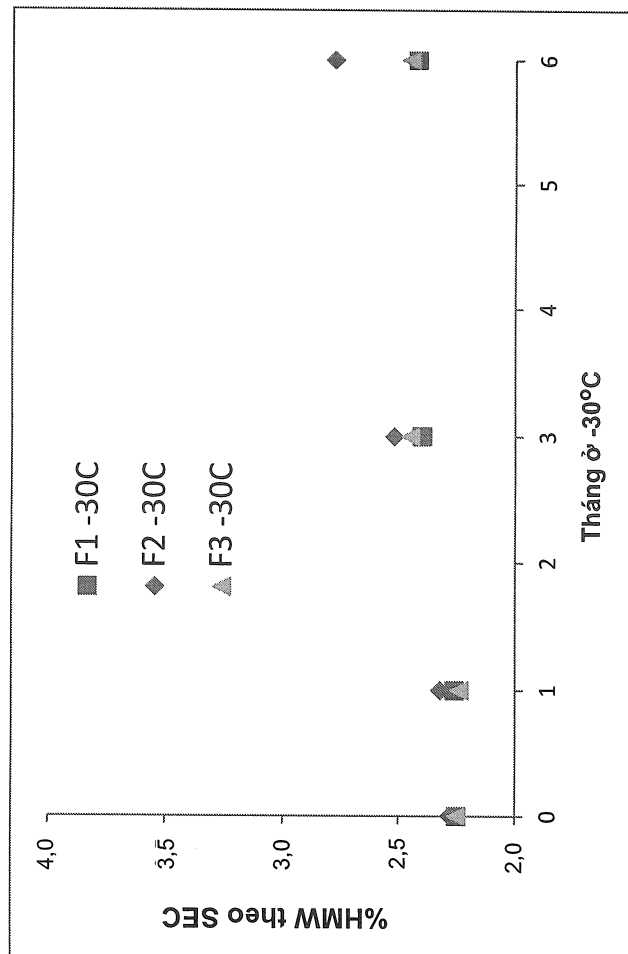


Fig.3B

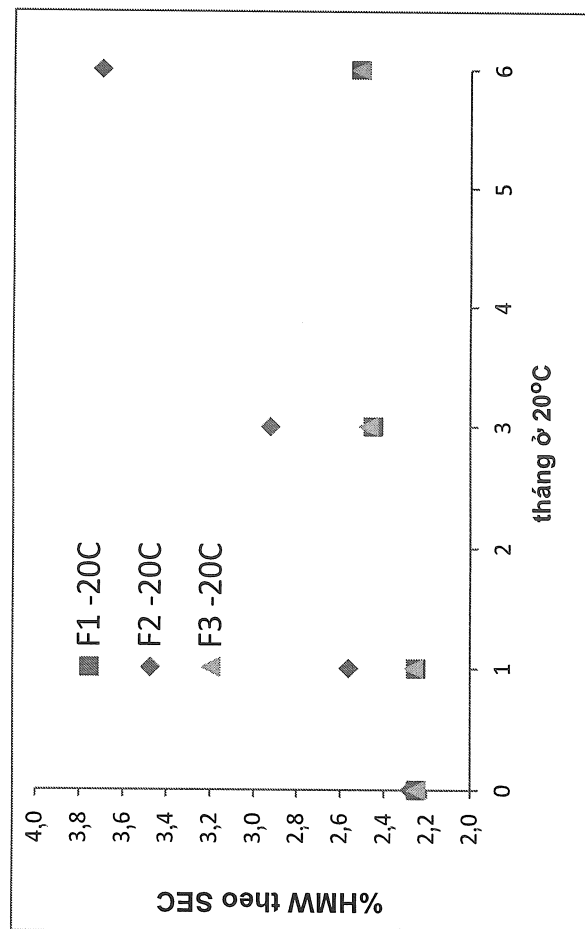


Fig.3C

Dược phẩm	Thành phần được phẩm									Độ nhớt (20C)
	RG2810 (mg/mL)	Histidin (mM)	pH	Sucroza (%)	Prolin (%)	NaCl (mM)	Mg(OAc) ₂ (mM)	Arg-HCl (mM)	PS-80 (%)	
1	150	10	6,0	9,0						10,6
2	150	10	6,0	5,0				70,0		8,0
3	150	10	6,0	5,0		70,0				7,4
4	150	10	6,0	5,0			25,0			7,9
5	150	10	6,0	5,0	2,0					9,6
6	150	10	6,0		3,5					8,3
7	150	10	6,0		2,0			70,0		7,1
8	150	10	6,0		2,0	70,0				7,2
9	150	10	6,0		2,0		25,0			7,2
10	150	10	6,0	9		0	0	0	0,1	11,0
11	150	10	6,0	9		25			0,1	10,0
12	150	10	6,0	9		50			0,1	10,2
13	150	10	6,0	9		75			0,1	9,4
14	150	10	6,0	9		100			0,1	9,7
15	150	25	6,0	9					0,1	10,6
16	150	50	6,0	9					0,1	10,3
17	150	75	6,0	9					0,1	10,1
18	150	100	6,0	9					0,1	9,8
19	150	10	6,0	9			10		0,1	10,8
20	150	10	6,0	9			25		0,1	10,3
21	150	10	6,0	9			50		0,1	9,9
22	150	10	6,0	9				25	0,1	10,0
23	150	10	6,0	9				50	0,1	9,9
24	150	10	6,0	9				70	0,1	10,0

Fig.4

Dược phẩm	mAb1 175mg/mL, Histidin 10mM (ngoại trừ F9 với 25mM), polysorbat 80 0,1%											
Thể tích nạp	0,4mL											
Đồ chứa/đồ đựng	Lọ thủy tinh borosilicat loại 1 có dung tích 2mL với nút caosu butyl 4432/50 được phủ FloroTec.											
Tá dược	Được phẩm số	Độ đục (tăng OD ở bước sóng 405nm)	màu sắc và vẻ bề ngoài	pH	%mAb1 được thu hồi bởi RP-UPLC	Độ tinh khiết theo SE-UPLC			Các biến thể mang điện tích theo CEX-UPLC			
						% HMW	% nguyên thể	% LMW	% axit	% chính	% bazơ	
Nguyên liệu ban đầu (a1)	-	0,00	Đạt	6,1	100	2,3	97,1	0,6	26,1	46,8	27,1	
-	F1	0,20	Đạt	6,1	72	51,4	48,0	0,6	28,1	44,9	27,0	
Sucroza 9%	F2	0,08	Đạt	6,1	94	26,6	72,6	0,8	30,0	42,9	27,1	
Sucroza 5% Prolin 1,5%	F3	0,06	Đạt	6,1	93	31,1	68,1	0,7	30,2	43,5	26,3	
Sucroza 5% Prolin 3,0%	F4	0,07	Đạt	6,1	93	28,9	70,3	0,8	30,4	43,3	26,3	
Prolin 3,0%	F5	0,16	Đạt	6,1	88	45,5	53,9	0,6	28,7	41,9	29,4	
Sucroza 5% Prolin 1,5% Argin 25mM	F6	0,13	Đạt	6,1	94	39,5	59,8	0,7	28,2	41,5	30,3	
Sucroza 5% Prolin 1,5% Mg(OAc) ₂ 25mM	F7	0,15	Đạt	6,2	91	41,1	58,1	0,8	32,7	35,5	31,8	
Sucroza 5% Prolin 1,5% NaCl 25mM	F8	0,16	Đạt	6,1	84	40,4	58,9	0,7	28,7	42,0	29,3	
Sucroza 5% Prolin 1,5% Histidin 25mM	F9	0,13	Đạt	6,1	90	40,0	59,2	0,7	28,9	43,8	27,3	

Fig.5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
Qingyan Hu
Dingjiang Liu

<120> Dược phẩm dạng lỏng chứa kháng thể liên kết đặc hiệu với protein chết theo chương trình của người 1 và kit chứa dược phẩm này

<130> 10171WO01

<150> 62/482,270

<151> 2017-04-06

<160> 11

<170> FastSEQ đối với phiên bản Windows 4.0

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 1

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Phe
			20						25					30	
Gly	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gly	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Asp	Thr	Tyr	Phe	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Gly	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Val	Lys	Trp	Gly	Asn	Ile	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105					110		
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115												

<210> 2

<211> 107.

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 3

```

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly
 1           5

```

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 4

```

Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr
 1           5

```

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 5

```

Val Lys Trp Gly Asn Ile Tyr Phe Asp Tyr
 1           5           10

```

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 6
 Leu Ser Ile Asn Thr Phe
 1 5

<210> 7
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 7
 Ala Ala Ser
 1

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 8
 Gln Gln Ser Ser Asn Thr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> aa 1-117: HCVR
 aa 118-444: HC cố định

<400> 9
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
 20 25 30
 Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Phe Ala Asp Ser Val

50						55						60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser		Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75						80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Gly	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
Val	Lys	Trp	Gly	Asn	Ile	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
			100					105					110			
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	
		115					120					125				
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	
		130				135					140					
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
145					150					155					160	
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	
			165					170						175		
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	
		180					185						190			
Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	
	195					200					205					
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	
	210				215						220					
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	
225				230					235						240	
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
			245					250					255			
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	
		260				265						270				
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	
	275					280					285					
Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	
	290				295						300					
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	
305				310					315						320	
Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	
			325					330					335			
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	
		340				345						350				
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	
	355				360						365					
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	
	370				375					380						
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	
385				390					395						400	
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	
			405					410					415			
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	
		420				425						430				
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys					
	435					440										

<210> 10

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> aa 1-107: LCVR

aa 108-214: LC cố định

<400> 10

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Ser Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Leu Ser Ile Asn Thr Phe
20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Thr Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Thr Pro Phe
85           90           95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Val Val Asp Phe Arg 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> 11 .

<211> 443

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HC (trừ Lysin ở đầu C)

<400> 11

```

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

```

Val	Lys	Trp	Gly	Asn	Ile	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
			100					105					110			
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	
		115					120					125				
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	
		130				135					140					
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
145					150					155				160		
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	
				165				170						175		
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	
			180					185					190			
Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	
		195					200					205				
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	
		210				215					220					
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	
225					230					235					240	
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
				245				250						255		
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	
			260					265						270		
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	
		275					280					285				
Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	
		290				295					300					
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	
305					310					315					320	
Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	
				325					330					335		
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	
			340					345						350		
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	
		355					360					365				
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	
		370				375					380					
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	
385					390					395					400	
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	
				405					410					415		
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	
			420					425					430			
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly						
		435					440									