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

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

(11) **1-0049317**

(51)[2020.01] **A61K 38/28**

(13) **B**

(21) 1-2022-01712
(22) 15/12/2017
(62) 1-2019-02925
(86) PCT/EP2017/083013 15/12/2017
(87) WO2018/109162 21/06/2018
(30) 16204688.2 16/12/2016 EP
(45) 25/07/2025 448
(43) 25/05/2022 410A
(73) NOVO NORDISK A/S (DK)
Novo Allé, 2880 Bagsværd, Denmark
(72) NORRMAN, Mathias (SE); HOSTRUP, Susanne (DK); STEENSGAARD, Dorte, Bjerre (DK); STRAUSS, Holger, Martin (DE); HANSEN, Rosa, Rebecca, Erritzøe (DK); HAVELUND, Svend (DK); SCHLEIN, Morten (DK); PEDERSEN, Jesper, Søndergaard (DK).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM DƯỢC CHỨA DẪN XUẤT INSULIN

(21) 1-2022-01712

(57) Sáng chế đề xuất các chế phẩm dược để điều trị các tình trạng bệnh lý liên quan đến bệnh đái tháo đường. Cụ thể hơn là sáng chế đề xuất các chế phẩm dược bao gồm dẫn xuất được axyl hóa có tác dụng lâu dài của insulin tương tự của con người, để điều trị bằng cách sử dụng insulin nền.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm dược để điều trị các tình trạng bệnh lý liên quan đến bệnh đái tháo đường. Cụ thể hơn là sáng chế đề xuất các chế phẩm dược bao gồm dẫn xuất được axyl hóa có tác dụng lâu dài của insulin tương tự ở người, và sử dụng các chế phẩm như vậy về y học cho liệu pháp sử dụng insulin nền.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Mục đích chính của liệu pháp insulin trong điều trị các rối loạn trao đổi chất là tạo ra glycemia gần như bình thường được duy trì bằng cách thay thế hoặc bổ sung sự bài tiết insulin nội sinh theo cách sinh lý nhất có thể, sau bữa ăn cũng như giữa các bữa ăn và qua đêm. Việc tách các yêu cầu insulin nền và có liên quan đến bữa ăn (bolus - nhanh trước bữa ăn) thể hiện sự tiếp cận có hệ thống đến liệu pháp insulin dưới da.

Đặc tính dược lý liên quan nhất của insulin cho trước bất kỳ – khởi phát hoạt tính, profin tác dụng đỉnh, thời gian hoạt tính, v.v. – phần lớn được xác định bởi động học hấp thụ từ điểm tiêm dưới da vào trong tuần hoàn vòng lớn.

Sự oligom hóa qua trung gian kẽm không cộng hóa trị là tính chất dễ xác định của các sản phẩm insulin. Ở pH sinh lý, insulin ở người có thể hòa tan nhưng có xu hướng tự kết hợp thành các hexame dễ xác định (ví dụ bộ sáu phân tử insulin), bằng cách phối hợp hai ion kẽm (Zn^{++}) với các điểm liên kết (B10His) có ái lực cao. Cũng được biết đến rằng các phối tử phenolic, đặc biệt là phenol, liên kết đặc biệt với hexame insulin và thúc đẩy sự hình thành hexame trạng thái R. Khi tiêm, các phối tử phenolic khuếch tán nhanh từ vị trí tiêm. Khi không có phenol ở vị trí tiêm, cấu hình riêng và kích thước của oligome insulin có thể thay đổi, cũng như độ nhớt của dung dịch chứa insulin, góp phần vào profin hoạt tính được kéo dài.

Jonassen và các cộng sự, Pharm. Res. 2012 29 2104-2114 mô tả cơ chế kéo dài của degludec insulin, dẫn xuất insulin với chuỗi diaxit béo được axyl hóa cho việc sử dụng một lần mỗi ngày, và mô tả sự tương quan giữa nồng độ kẽm cao và sự kéo dài. WO 2009/115469 mô tả các dẫn xuất insulin có tác dụng lâu dài khác nhau với các chuỗi diaxit béo được axyl hóa. WO 2013/153000 mô tả sự công thức bào chế các dẫn xuất insulin có tác dụng lâu dài để sử dụng dưới da này, mà chứa hàm lượng kẽm cao (không ít hơn 3,5 Zn^{++}/sáu mol các dẫn xuất

insulin). Nó được thiết kế để thu được thời gian hoạt tính kéo dài tương xứng với profin sử dụng một lần mỗi tuần. Hàm lượng Zn^{++} cao trong các công thức bào chế được mô tả trong WO 2009/115469 dẫn đến profin PK được kéo dài.

WO 2009/063072 bộc lộ các chế phẩm dược để sử dụng theo đường tiêm bao gồm dẫn xuất insulin nền (ví dụ degludec) và dẫn xuất GLP-1 (ví dụ liraglutit). Do monome liraglutit liên kết với kẽm để tạo ra di-heptame, hàm lượng kẽm cao hơn công thức bào chế đơn degludec là cần thiết trong công thức bào chế kết hợp, để đạt được profin PK có thể so sánh được của degludec, và đạt được độ ổn định vật lý có thể chấp nhận được.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo sáng chế việc bào chế mới các dẫn xuất insulin có tác dụng lâu dài đã được phát triển, mà có khả năng thúc đẩy trạng thái cấu hình riêng và mẫu oligom hóa càng gần giống với insulin ở người, ví dụ các hexame, đặc biệt là các hexame R6.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm dược bao gồm dẫn xuất insulin có tác dụng lâu dài được chọn trong tổ hợp duy nhất của các tá dược được công thức bào chế cẩn thận để giảm sự tạo ra của các oligome ở vị trí tiêm, trong khi vẫn thể hiện các đặc tính PK/PD phù hợp với việc sử dụng một lần mỗi tuần.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm dược với độ nhớt được giảm khi tiêm và theo đó xu hướng để tạo ra sự khó chịu bất kỳ khi tiêm được giảm.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm dược với độ ổn định được nâng cao.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm dược để sử dụng làm thuốc để điều trị rối loạn trao đổi chất.

Các mục đích khác của sáng chế sẽ biểu kiến với người có trình độ trong lĩnh vực từ mô tả chi tiết và các ví dụ sau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế còn được minh họa bằng cách tham chiếu đến các hình vẽ liên quan, trong đó:

Fig.1 thể hiện sự oligom hóa của các Công thức bào chế đơn A, B và C của Hợp chất 1 ở các tình trạng vị trí tiêm mô phỏng:

Fig.1A: Bán kính thủy động trung bình biểu kiến (rH) [nm] được đo bởi DLS;

Fig.1B: Trọng lượng phân tử trung bình biểu kiến được đo bởi CG-MALS;

Fig.1C: Hệ số sa lắng trung bình biểu kiến (S) được đo bởi AUC;

Các thanh trắng: Hợp chất 1, Công thức bào chế C với 2,2 Zn++ trên sáu insulin (mol:mol);

Các thanh xám: Hợp chất 1, Công thức bào chế B với 2,4 Zn++ trên sáu insulin (mol:mol);

Các thanh đen: Hợp chất 1, Công thức bào chế A chứa 4,5 Zn++ trên sáu insulin (mol:mol);

Fig.2 thể hiện sự oligom hóa các công thức bào chế đơn 01-06 của Hợp chất 1 ở các tình trạng vị trí tiêm mô phỏng:

Fig.2A: Bán kính thủy động trung bình biểu kiến (Rh, trung bình) [nm] được đo bởi DLS;

Fig.2B: Hệ số sa lắng trung bình biểu kiến (S*) được đo bởi AUC

Fig.3 thể hiện độ nhớt động biểu kiến [cP] (Fig.3A, và Fig.3C) và độ nhớt đặc hiệu [ηspec] (Fig.3B, Fig.3D) của các công thức bào chế trao đổi dung dịch đệm khác nhau của Hợp chất 1 và dung dịch đệm lỏng kẽ (ISF), dưới dạng hàm của nhiệt độ [°C];

Fig.3A và Fig.3B: Công thức bào chế A; Công thức bào chế B; Công thức bào chế C; Dung dịch đệm ISF;

Fig.3C và Fig.3D: Công thức bào chế 02; Công thức bào chế 03; Công thức bào chế 04; Dung dịch đệm ISF;

Fig.4 thể hiện trạng thái cấu hình riêng của Hợp chất 1 trong các công thức bào chế:

Fig.4A: Quang phổ lưỡng sắc tròn tia UV gần gần [Δε251nm(M-1 cm-1)] thể hiện các thay đổi cấu hình riêng (trạng thái T; trạng thái TR hỗn hợp; trạng thái R) dưới dạng hàm của Zn++ trên sáu insulin (mol:mol) cho các công thức bào chế 01-06;

Fig.4B: Quang phổ lưỡng sắc tròn tia UV gần gần [Δε251nm(M-1 cm-1)] thể hiện các thay đổi cấu hình riêng (trạng thái T; trạng thái TR hỗn hợp; trạng thái R) dưới dạng hàm của Zn++ trên sáu insulin (mol:mol) cho các công thức bào chế B1-B6, D1-D7, và insulin ở người các công thức bào chế với hàm lượng kẽm khác nhau:

Các hình tròn trắng: Insulin ở người (600 nmol/ml insulin ở người, 30 mM phenol, 150 mM NaCl, pH 7,4);

Các ô vuông đen: Hợp chất 1 được công thức bào chế với 25 mM phenol, 25 mM m-cresol và 20 mM NaCl;

Các hình tròn xám: Hợp chất 1 được công thức bào chế với 60 mM phenol, 10 mM m-cresol và 20 mM NaCl;

Fig.5 thể hiện sự phân phối oligome của Hợp chất 1 trong các công thức bào chế bởi SEC:

Fig.5A thể hiện sắc ký SEC nguyên bản của các công thức bào chế 01, 02, 03, 04, 05, và 06;

Fig.5B thể hiện sắc ký SEC nguyên bản của các công thức bào chế A và B1-B6;

Fig.6 thể hiện dữ liệu tán xạ SAXS [Cường độ (a.u.) đối với s(Å-1)] của Hợp chất 1 và insulin ở người trong trạng thái được lập công thức bào chế:

Fig.6A: Các đường cong tán xạ của Công thức bào chế A của Hợp chất 1 được thể hiện bằng màu đen và của insulin ở người được thể hiện bằng màu xám (Hợp chất 1, 4,2 mM, 4,5 Zn/hexame; insulin ở người 0,6 mM, 2,2 Zn/hexame);

Fig.6B: Các đường cong tán xạ của Công thức bào chế C của Hợp chất 1 được thể hiện bằng màu đen và của insulin ở người được thể hiện bằng màu xám (Hợp chất 1, 4,2 mM, 2,2 Zn/hexame; insulin ở người 0,6 mM, 2,2 Zn/hexame (R6-hexame));

Fig.7 thể hiện độ nguyên chất của Hợp chất 1 trong các công thức bào chế:

Fig.7A thể hiện độ nguyên chất (% tổng peptit) khi lưu trữ ở 30°C [Mốc thời gian (tháng)] cho Công thức bào chế A của Hợp chất 1 (đường đen), Công thức bào chế B (đường xám) và Công thức bào chế C (đường chấm chấm);

Fig.7B thể hiện độ nguyên chất (% của tổng peptit) khi lưu trữ ở 37°C [Mốc thời gian (tuần)] cho Hợp chất 1 cho các Công thức bào chế 01, 04, 05 và 06;

Các hình tròn trắng: Công thức bào chế 01, Các hình tròn đen: Công thức bào chế 04, Các hình vuông trắng: Công thức bào chế 05, Các ô vuông đen: Công thức bào chế 06;

Fig.8 thể hiện độ nguyên chất của Hợp chất 1 (% tổng Hợp chất 1) khi lưu trữ ở 37°C [Mốc thời gian (tuần)] khi kết hợp các công thức bào chế với semaglutide:

Các hình tròn trắng: Công thức bào chế kết hợp I, Các hình tròn đen: Công thức bào chế kết hợp II, Các hình tam giác trắng: Công thức bào chế kết hợp III, Các hình tam giác đen: Công thức bào chế kết hợp IV, Các hình vuông trắng: Công thức bào chế kết hợp V, Các ô vuông đen: Công thức bào chế kết hợp VI;

Fig.9 thể hiện sự oligom hóa của các công thức bào chế kết hợp ở các tình trạng vị trí tiêm mô phỏng:

Fig.9A: Bán kính thủy động trung bình biểu kiến (rH) [nm] được đo bởi DLS;

Fig.9B: thể hiện kích thước oligome của các công thức bào chế kết hợp sau khi dung dịch đệm được trao đổi như được quan sát bởi AUC (S*).

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm dược bao gồm dẫn xuất insulin được chọn từ nhóm bao gồm

A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)-etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30; (Hợp chất 1);

A14E, B16H, B25H, B29K(N$^{\varepsilon}$-Hexadecandioyl-γGlu), insulin ở người desB30 (Hợp chất 2);

A14E, B16H, B25H, B29K(N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu), desB30 insulin ở người (Hợp chất 3); và

A14E, B25H, desB27, B29K(N$^{\varepsilon}$-Octadecandioyl-γGlu), insulin ở người desB30 (Hợp chất 4); và còn bao gồm từ khoảng 1 đến khoảng 2% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol; từ khoảng 45 đến khoảng 75 mM phenol; từ khoảng 0 đến khoảng 19 mM m-cresol; từ khoảng 1,5 đến khoảng 2,5 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin đã đề cập; không lớn hơn khoảng 75 mM natri clorua; và có trị số pH trong phạm vi từ 7,2 đến 8,0.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các chế phẩm dược còn bao gồm hợp chất insulinotropic GLP-1, và cụ thể hợp chất insulinotropic GLP-1 được biết đến là semaglutit.

Semaglutide có thể được mô tả bằng kết cấu Aib8,Lys26(OEG-OEG-gamma-Glu-C18-diacid),Arg34)GLP-1 H(7-37)-OH, mà có thể cũng được chỉ định là (N-epsilon26-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-Carboxy-4-(17-carboxyheptadecanoylamino) butyrylamino]etoxy} etoxy)axetylamino]etoxy}etoxy)-axetyl][Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37), so với bộc lộ trong WO 2006/097537.

Sáng chế có thể được đặc trưng thêm bằng cách tham chiếu đến một hoặc nhiều các đặc tính hoặc các phương án sau:

1. Chế phẩm dược theo sáng chế bao gồm dẫn xuất insulin, mà là A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]-axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1).

2. Chế phẩm dược theo sáng chế bao gồm dẫn xuất insulin, mà là A14E, B16H, B25H, B29K(N$^{\varepsilon}$-Hexadecandioyl-γGlu), insulin ở người desB30 (Hợp chất 2).

3. Chế phẩm dược theo sáng chế bao gồm dẫn xuất insulin, mà là A14E, B16H, B25H, B29K(N^{ε}-Eicosanedioyl-γGlu), desB30 insulin ở người (Hợp chất 3).

4. Chế phẩm dược theo sáng chế bao gồm dẫn xuất insulin, mà là A14E, B25H, desB27, B29K(N^{ε}-Octadecandioyl-γGlu), insulin ở người desB30 (Hợp chất 4).

5. Chế phẩm dược theo các phương án trước, trong đó dẫn xuất insulin trong phạm vi từ khoảng 3,5 đến khoảng 5,0 mM.

6. Chế phẩm dược theo các phương án trước, trong đó dẫn xuất insulin trong phạm vi từ khoảng 4,0 đến khoảng 4,5 mM .

7. Chế phẩm dược theo các phương án trước, trong đó dẫn xuất insulin khoảng 4,2 mM.

8. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 1 đến khoảng 2% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol.

9. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 1,4 đến khoảng 1,8% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol.

10. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 1,5% hoặc 1,6% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol.

11. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 45 đến khoảng 75 mM phenol.

12. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 50 đến khoảng 70 mM phenol.

13. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 55 đến khoảng 65 mM phenol.

14. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, hoặc 70 mM phenol.

15. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 0 đến khoảng 19 mM *m*-cresol.

16. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm 0 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM *m*-cresol.

17. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 0 đến khoảng 15 mM *m*-cresol.

18. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM hoặc 19 mM *m*-cresol.

19. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 1,5 đến khoảng 2,5 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin.

20. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 2,0 đến khoảng 2,4 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin.

21. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 2,0 hoặc 2,1 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin.

22. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 2,2 hoặc 2,3 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin.

23. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 2,4 hoặc 2,5 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin.

24. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm ít hơn khoảng 75 mM natri clorua.

25. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 5 đến khoảng 50 mM natri clorua.

26. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 10 đến khoảng 25 mM natri clorua.

27. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 15 đến khoảng 25 mM natri clorua.

28. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 20 mM, 50 mM hoặc 75 mM natri clorua.

29. Chế phẩm dược theo các phương án trước, mà có trị số pH trong phạm vi từ 7,2 đến 8,0.

30. Chế phẩm dược theo các phương án trước, mà có trị số pH trong phạm vi từ 7,2 đến 7,6.

31. Chế phẩm dược theo các phương án trước, mà có trị số pH khoảng 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, hoặc 7,9.

32. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm

từ khoảng 4,0 đến khoảng 4,5 mM dẫn xuất insulin;

từ khoảng 1 đến khoảng 2% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol;

từ khoảng 50 đến khoảng 70 mM phenol;

từ khoảng 0 đến khoảng 15 mM *m*-cresol;

từ khoảng 2,0 đến khoảng 2,5 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin;

ít hơn khoảng 50 mM natri clorua; và

có trị số pH trong phạm vi từ 7,2 đến 7,6.

33. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm

khoảng 4,2 mM dẫn xuất insulin;

khoảng 1,5% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol;

khoảng 60 mM phenol;

khoảng 0 mM *m*-cresol;

khoảng 2,0 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin;

khoảng 20 mM natri clorua; và

có trị số pH khoảng 7,4.

34. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm

khoảng 4,2 mM dẫn xuất insulin;

khoảng 1,5% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol;

khoảng 60 mM phenol;

khoảng 10 mM *m*-cresol;

khoảng 2,0 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin;

khoảng 20 mM natri clorua; và

có trị số pH khoảng 7,4.

35. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm

khoảng 4,2 mM dẫn xuất insulin;

khoảng 1,5% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol;

khoảng 60 mM phenol;

khoảng 0 mM *m*-cresol;

khoảng 2,2 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin;

khoảng 20 mM natri clorua; và

có trị số pH khoảng 7,4.

36. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm

khoảng 4,2 mM dẫn xuất insulin;

khoảng 1,5% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol;

khoảng 60 mM phenol;

khoảng 10 mM *m*-cresol;

khoảng 2,2 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin;

khoảng 20 mM natri clorua; và

có trị số pH khoảng 7,4.

37. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm

khoảng 4,2 mM dẫn xuất insulin;

khoảng 1,5% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol;

khoảng 60 mM phenol;

khoảng 0 mM *m*-cresol;

khoảng 2,4 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin;

khoảng 20 mM natri clorua; và

có trị số pH khoảng 7,4.

38. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm

khoảng 4,2 mM dẫn xuất insulin;

khoảng 1,5% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol;

khoảng 60 mM phenol;

khoảng 10 mM *m*-cresol;

khoảng 2,4 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin;

khoảng 20 mM natri clorua; và

có trị số pH khoảng 7,4.

39. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 4,2 mM dẫn xuất insulin; từ khoảng 1 đến khoảng 2% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol; từ khoảng 45 đến khoảng 75 mM phenol; từ khoảng 0 đến khoảng 15 mM *m*-cresol; từ khoảng 1,5 đến khoảng 2,5 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin đã đề cập; không lớn hơn khoảng 50 mM natri clorua; và có trị số pH trong phạm vi từ 7,2 đến 8,0 .

40. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 0mM *m*-cresol.

41. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 5 đến khoảng 10 mM *m*-cresol.

42. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 10 mM *m*-cresol.

43. Chế phẩm dược theo các phương án trước, còn bao gồm semaglutide.

44. Chế phẩm dược bao gồm A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1); và semaglutide; và còn bao gồm từ khoảng 1 đến khoảng 2% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol; từ khoảng 45 đến khoảng 75 mM phenol; từ 0-15 mM m-cresol; từ khoảng

1,5 đến khoảng 2,5 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin đã đề cập; không lớn hơn khoảng 25 mM natri clorua; và có trị số pH trong phạm vi từ 7,2 đến 8,0.

45. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 0,20 đến khoảng 0,70 mM semaglutide.

46. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 0,30 đến khoảng 0,70 mM semaglutide.

47. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 3,5 mM đến khoảng 5,0 mM A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)-etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1).

48. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm từ khoảng 0,30 đến khoảng 0,70 mM semaglutide, và từ khoảng 3,5 mM đến khoảng 5,0 mM A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1).

49. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 0,30 mM semaglutide, và từ khoảng 3,5 mM đến khoảng 5,0 mM A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1).

50. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 0,40 mM semaglutide, và 4,2 mM A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)-etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1).

51. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 0,49 mM hoặc 0,50 mM semaglutide, và 4,2 mM A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1).

52. 35. Chế phẩm dược theo các phương án trước, bao gồm khoảng 0,60 mM semaglutide, và 4,2 mM A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1).

53. Chế phẩm dược (đồng công thức bào chế) bao gồm A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1); và semaglutide; và còn bao gồm khoảng 1,5% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol; khoảng 60 mM phenol; khoảng 0 mM m-cresol; khoảng 2,2 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin đã đề cập; khoảng 20 mM natri clorua; và có trị số pH khoảng 7,4.

54. Chế phẩm dược (đồng công thức bào chế) bao gồm A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1); và semaglutide; và còn bao gồm khoảng 1,5% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol; khoảng 60 mM phenol; khoảng 10 mM m-cresol; khoảng 2,2 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin đã đề cập; khoảng 20 mM natri clorua; và có trị số pH khoảng 7,4.

55. Chế phẩm dược theo các phương án trước, để sử dụng cho đối tượng cần chế phẩm này ở các khoảng ít thường xuyên hơn một lần mỗi ngày (ví dụ ở các khoảng dài hơn 24 giờ), trong khoảng thời gian ít nhất 3 tháng, ít nhất 6 tháng, hoặc ít nhất 1 năm.

56. Chế phẩm dược theo các phương án trước, để sử dụng cho đối tượng cần sử dụng cho đối tượng với tần suất trong phạm vi trung bình từ mỗi ngày thứ 2 đến mỗi ngày thứ 11.

57. Chế phẩm dược theo các phương án trước, để sử dụng cho đối tượng cần sử dụng cho đối tượng với tần suất trong phạm vi trung bình từ mỗi ngày thứ 3 đến mỗi ngày thứ 10.

58. Chế phẩm dược theo các phương án trước, để sử dụng cho đối tượng cần sử dụng cho đối tượng với tần suất trong phạm vi trung bình từ mỗi ngày thứ 4 đến mỗi ngày thứ 9.

59. Chế phẩm dược theo các phương án trước, để sử dụng cho đối tượng cần sử dụng cho đối tượng với tần suất trong phạm vi trung bình từ mỗi ngày thứ 5 đến mỗi ngày thứ 8.

60. Chế phẩm dược theo các phương án trước, để sử dụng cho đối tượng cần sử dụng cho đối tượng với tần suất trong phạm vi trung bình từ mỗi ngày thứ 6 đến mỗi ngày thứ 7.

61. Chế phẩm dược theo các phương án trước, để sử dụng cho đối tượng cần sử dụng cho đối tượng trung bình một lần mỗi tuần, ví dụ vào mỗi ngày thứ 7, trong khoảng thời gian ít nhất 3 tháng, ít nhất 6 tháng, hoặc ít nhất 1 năm.

62. Phương pháp tạo ra chế phẩm dược có thể tiêm được bao gồm:

(i) Điều chế dung dịch bằng cách hòa tan A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 trong nước

(ii) Điều chế dung dịch bằng cách hòa tan các chất bảo quản và các chất đẳng trương trong nước

(iii) Điều chế dung dịch bằng cách hòa tan các ion kẽm trong nước

(iv) Trộn dung dịch a) và dung dịch b)

(v) Thêm dung dịch c) vào dung dịch a+b

(vi) Hòa tan semaglutide trong dung dịch hỗn hợp a+b+c

(vii) Điều chỉnh độ pH của hỗn hợp f) đến độ pH mong muốn, sau đó là bước lọc vô trùng.

Sự kết hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều các phương án được mô tả ở đây được xem là nằm trong phạm vi của sáng chế.

Hoạt tính sinh học

Theo khía cạnh khác sáng chế đề xuất các chế phẩm dược hữu dụng làm các thuốc để điều trị các bệnh, rối loạn hoặc các tình trạng bệnh về trao đổi chất, và, cụ thể, các bệnh, rối loạn hoặc các tình trạng bệnh liên quan đến bệnh đái tháo đường.

Theo một phương án, chế phẩm dược theo sáng chế để sử dụng trong điều trị hoặc làm dịu nhẹ của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh liên quan đến bệnh đái tháo đường, bệnh đái tháo đường Loại 1, bệnh đái tháo đường Loại 2, dung nạp glucoza bị suy giảm, tăng đường huyết, rối loạn mỡ máu, béo phì, hoặc hội chứng chuyển hóa (hội chứng chuyển hóa X, hội chứng đề kháng insulin).

Theo phương án khác, chế phẩm dược theo sáng chế để sử dụng trong điều trị hoặc làm dịu nhẹ bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh liên quan đến bệnh đái tháo đường, và cụ thể bệnh đái tháo đường Loại 1, hoặc bệnh đái tháo đường Loại 2.

Liều lượng thực tế tùy thuộc vào bản chất và mức độ nghiêm trọng của bệnh đang được điều trị, và theo quyết định của bác sĩ, và có thể được thay đổi bằng cách chuẩn độ liều lượng cho các trường hợp cụ thể theo sáng chế để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế còn được minh họa với việc tham chiếu đến các ví dụ sau, mà không định làm giới hạn phạm vi của sáng chế như được yêu cầu bảo hộ bằng bất kỳ cách nào.

Ví dụ 1

Các đặc tính lý sinh được cải thiện ở các tình trạng vị trí tiêm mô phỏng

Tiến trình

API của các công thức bào chế là A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1), thu được như được mô tả trong ví dụ WO 2009/115469, xem Ví dụ 33.

Sự oligom hóa của Hợp chất 1 được xác định ở các tình trạng vị trí tiêm mô phỏng. Các tình trạng vị trí tiêm mô phỏng đạt được bằng cách lần lượt làm cạn hết phenol và/hoặc metacresol, và trao đổi dung dịch đệm thành dung dịch đệm lỏng kẽ được mô phỏng. Quy trình

này gần như loại bỏ tất cả các phối tử phenolic nhưng duy trì tỷ lệ kẽm/insulin của công thức bào chế gốc.

Các công thức bào chế được trao đổi dung dịch đệm thành dung dịch đệm chất lỏng kẽ (ISF-) qua cột PD-MidiTrap G-25 theo tiến trình của nhà sản xuất.

Các cột được cân bằng với dung dịch đệm đích bằng cách rửa cột với thể tích đủ của dung dịch đệm đích, và sự công thức bào chế được áp dụng với thể tích thích hợp và được rửa giải với dung dịch đệm đích. Dung dịch đệm ISF bao gồm 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgSO4, 2 mM CaCl2, 10 mM Hepes, pH 7,4.

Trừ khi được quy định cụ thể, quy trình như sau:

Trao đổi dung dịch đệm ở 22°C;

Ủ tiếp theo ở 37°C trong 14-18 giờ; và

Đo tiếp theo ở 22°C (trừ khi được quy định cụ thể).

Thông thường các phép đo được thực hiện khoảng 1 giờ sau khi kết thúc ủ ở 37°C. Nếu không thể thực hiện điều trên, các mẫu được lưu trữ ở 22°C cho đến khi được đo.

Trừ khi được quy định cụ thể, các mẫu được đo mà không được pha loãng. Nên được lưu ý rằng kích thước oligome thu được từ quy trình làm cạn phenol được mô tả là quá trình phụ thuộc, và đối với công thức bào chế cho trước it có thể thay đổi với các yếu tố như thời gian, nhiệt độ, và lô của cột. Do đó mong muốn rằng các phép đo cho tập hợp các công thức bào chế cho trước được so sánh trong cùng thử nghiệm và không qua các thử nghiệm. Do đó, đối với cùng công thức bào chế tham chiếu đã được thử nghiệm cùng với công thức bào chế khác khau của sáng chế trong các thử nghiệm khác nhau. Ví dụ, công thức bào chế A đối với công thức bào chế B và C; công thức bào chế 01 đối với các công thức bào chế 02-06.

Bán kính thủy động trung bình biểu kiến (r_H) được đo bởi tán xạ ánh sáng động (DLS), bằng cách sử dụng DynaPro PR™ (Wyatt technology, Santa Barbara, CA, USA). Trước khi các mẫu phân tích được ly tâm trong 5 phút ở 1200 vòng/phút để loại bỏ các hạt bụi bất kỳ trong dung dịch. Các phép đo được thực hiện ở 25°C bằng cách sử dụng 40 thu nhận và thời gian thu nhận là 2 giây.

Trọng lượng phân tử trung bình biểu kiến (kDa) được đo bởi Chế phẩm-Gradien, Tán xạ ánh sáng tĩnh đa góc (CG-MALS) bằng cách sử dụng hệ thống bao gồm bộ chuẩn độ Wyatt Technology Corporation (WTC) Calypso II được ghép với thiết bị dò tán xạ ánh sáng WTC DAWN8+ (vận hành ở 664 nm) và khúc xạ kế WTC Optilab T-rEX (vận hành ở 660 nm) ở 25°C. Các mẫu được lọc qua bộ lọc 0,45 µm tiếp theo là bộ lọc 0,22 µm trước khi đo.

Các thử nghiệm về tốc độ làm lắng được thực hiện với Máy siêu ly tâm phân tích XL-I (BeckmanCoulter, Brea, CA) trong các chi tiết ở giữa hai vùng 12-mm hoặc 3-mm được đậy với các cửa sổ bằng saphia. Các mẫu được quay ở 40000 vòng/phút và 20°C cho đến khi sự sa lắng được hoàn thành và được giám sát với quang học nhiễu của dụng cụ. Phân phối hệ số sa lắng (SCD) được tính với SedFit, bản 11.8 (www.analyticalultracentrifugation.com) bằng cách sử dụng mẫu c(s) với lưới tọa độ là 100 trị số s trong phạm vi đủ để mô tả tất cả vật liệu lắng, như được đánh giá bởi rmsd và mô hình chạy phần dư. Tỷ lệ ma sát f/fo được xem như là biến số để được tối ưu hóa trong quá trình điều chỉnh (P Schuck, MA Perugini, NR Gonzales, GJ Howlett và D Schubert: Phân tích phân phối kích thuốc của các protein bằng máy siêu ly tâm phân tích: các chiến lược và ứng dụng với các hệ thống mẫu; (Biophys. J. 2002 82:1096). Các trị số hệ số sa lắng trung bình thu được qua tính vẹn toàn của các phân phối c(s) kết quả.

Độ nhớt động phụ thuộc vào nhiệt độ được đo với nhớt kế loại bóng lăn Lovis2000 (Anton Paar, Graz, Austria). Nhiệt độ được giảm từ 40°C đến 4°C với các bước giảm 2°C, cho phép cân bằng nhiệt độ trong 5 phút giữa các bước. Tỷ trọng của dung dịch đệm được đo đồng thời với tỷ trọng kế DMA5000, cũng của Anton Paar.

Ba công thức bào chế đơn, ví dụ công thức bào chế A đại diện cho lĩnh vực kỹ thuật liên quan (xem ví dụ WO 2013/153000), và các công thức bào chế B, C đại diện cho sáng chế (60 mM phenol/10 mM m-cresol), được điều chế.

Bảng 1A: Các công thức bào chế đơn so sánh A, B, và C

Thành phần	Công thức bào chế A Theo lĩnh vực kỹ thuật liên quan	Công thức bào chế B Theo sáng chế	Công thức bào chế C Theo sáng chế
Hợp chất 1	4200 nmol/ml (4,2 mM)	4200 nmol/ml (4,2 mM)	4200 nmol/ml (4,2 mM)
Kẽm (dưới dạng kẽm axetat)	206 µg/ml (~4,5 Zn^{++}/hexame)	110 µg/ml (~2,4 Zn^{++}/hexame)	101 µg/ml (~2,2 Zn^{++}/hexame)
glyxerol	16 mg/ml (1,6%)	15 mg/ml (1,5%)	15 mg/ml (1,5%)
Phenol	2,35 mg/ml (25 mM)	5,65 mg/ml (60 mM)	5,65 mg/ml (60 mM)
Meta-cresol	2,70 mg/ml (25 mM)	1,08 mg/ml (10 mM)	1,08 mg/ml (10 mM)
Natri clorua	1,17 mg/ml (20 mM)	1,17 mg/ml (20 mM)	1,17 mg/ml (20 mM)
Độ pH	7,4	7,4	7,4

Sáu công thức bào chế đơn khác, ví dụ công thức bào chế 01 (giống như công thức bào chế A), và các công thức bào chế 02, 03, 04, 05 và 06 đại diện cho sáng chế, được tạo ra (Bảng 1B). Hàm lượng kẽm được thay đổi từ 4,5 Zn^{++}/sáu insulin đến 2,4, 2,2, và 2,0 Zn^{++}/sáu insulin. Ngoài ra các hệ thống bảo quản của 25/25 mM phenol/m-cresol hoặc 60/0 mM phenol/m-cresol được thử nghiệm.

Bảng 1B: Các công thức bào chế so sánh

Thành phần	Công thức bào chế					
	01*	02	03	04	05	06
Hợp chất 1 (mM)	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
Zn(axetat)2 (µg/ml)	206	206	101	101	110	92

n Zn/6 insulinulin (mol/mol)	~4,5	~4,5	~2,2	~2,2	~2,4	~2,0
Phenol	25 mM	60 mM	25 mM	60 mM	60 mM	60 mM
m-cresol	25 mM	0	25 mM	0	0	0
glyxerol	1,6%	1,5%	1,6%	1,5%	1,5%	1,5%
Chất dẫn thuốc (tất cả các công thức bào chế)	20 mM NaCl Độ pH 7,4					

* Giống như Công thức bào chế A

Kích thước oligome được cải thiện của các công thức bào chế đơn được trao đổi dung dịch đệm có 60 mM phenol và 10 m-cresol (Bảng 2A; Fig.1A, 1B, và 1C)

Bảng 2A: Kích thước oligome ở vị trí tiêm được mô phỏng

	A	B	C
Rh(trung bình) [nm]	37,31	9,21	8,37
S*(trung bình) [S]	17,32	10,53	9,41
Mw (trung bình) [kDa]	1059,8	190,5	184,7

Kích thước oligome được cải thiện của các công thức bào chế đơn được trao đổi dung dịch đệm có 60 mM phenol và 0 m-cresol (Bảng 2B; Fig.2A và 2B)

Bảng 2B kích thước oligome ở vị trí tiêm được mô phỏng

	01	02	03	04	05	06
Rh(trung bình) [nm]	19,42	14,20	5,83	4,51	5,20	3,98
S*(trung bình) [S]	8,46	11,00	5,39	4,78	5,33	4,32

Kết luận

Hàm lượng kẽm được giảm từ 4,5 Zn^{++}/sáu insulin trong công thức bào chế A lần lượt đến 2,4 và 2,2 Zn^{++}/sáu insulin trong các công thức bào chế B và C (với phenol được tăng và metacresol được giảm). Việc giảm kẽm đi kèm với giảm kích thước oligome (xem Fig.1A, 1B và 1C) như được xác định ở các tình trạng vị trí tiêm mô phỏng bằng phương pháp được mô tả ở trên.

Các kết quả từ công thức bào chế 01-06 xác nhận thêm rằng kích thước oligome giảm khi Zn giảm từ 4,5 Zn^{++}/sáu insulin đến 2,2 ± 0,2 Zn^{++}/sáu insulin. Đối với 2,2 ± 0,2 Zn^{++}/sáu insulin kích thước oligome giảm thêm khi phenol/cresol giảm từ 25mM/25mM đến 60mM/0mM. Xem Fig.2A và 2B.

Độ nhớt được cải thiện của các công thức bào chế đơn được trao đổi dung dịch đệm có 60 mM phenol và 10 mM m-cresol (xem Bảng 3A; Fig.3A và 3B)

Bảng 3A: Độ nhớt của các Công thức bào chế trao đổi dung dịch đệm A, B, C

	Độ nhớt động (cP)				Độ nhớt đặc hiệu		
	Công thức bào chế				Công thức bào chế		
Nhiệt độ (C)	A	B	C	Dung dịch đệm ISF	A	B	C
40	1,194	0,633	0,628	0,605	0,97355	0,04628	0,03802
38	1,359	0,659	0,653	0,627	1,16746	0,05104	0,04147
36	1,548	0,687	0,68	0,651	1,37788	0,0553	0,04455
34	1,758	0,718	0,709	0,677	1,59675	0,06056	0,04727
32	1,989	0,751	0,74	0,704	1,82528	0,06676	0,05114
30	2,237	0,787	0,773	0,733	2,05184	0,07367	0,05457
28	2,506	0,825	0,809	0,765	2,27582	0,07843	0,05752
26	2,792	0,866	0,847	0,798	2,49875	0,08521	0,0614
24	3,098	0,91	0,889	0,835	2,71018	0,08982	0,06467
22	3,409	0,958	0,934	0,874	2,90046	0,09611	0,06865
20	3,729	1,01	0,982	0,916	3,07096	0,10262	0,07205
18	4,051	1,066	1,035	0,962	3,21102	0,10811	0,07588
16	4,321	1,126	1,092	1,012	3,26976	0,11265	0,07905
14	4,597	1,191	1,153	1,066	3,31238	0,11726	0,08161
12	4,865	1,262	1,22	1,125	3,32444	0,12178	0,08444
10	5,131	1,338	1,293	1,19	3,31176	0,12437	0,08655
8	5,369	1,421	1,372	1,26	3,26111	0,12778	0,08889
6	5,593	1,514	1,458	1,338	3,18012	0,13154	0,08969
4	5,795	1,612	1,556	1,424	3,06952	0,13202	0,0927

Độ nhớt được cải thiện của các công thức bào chế đơn được trao đổi dung dịch đệm có 60 mM phenol và 0 m-cresol (xem Bảng 3B; Fig.3C và 3D)

Bảng 3B: Độ nhớt của dung dịch đệm được trao đổi các Công thức bào chế 02, 03 và 04

	Độ nhớt động (cP)				Độ nhớt đặc hiệu		
	Công thức bào chế				Công thức bào chế		
	ISF	_02	_03	_04	_02	_03	_04
3,99	1,5447	2,7441	1,9996	1,6278	0,77646	0,29449	0,0538
6	1,4513	2,5087	1,8529	1,5296	0,72859	0,27672	0,05395
8	1,3668	2,3492	1,7355	1,4414	0,71876	0,26975	0,05458
10	1,2917	2,2389	1,6335	1,3615	0,7333	0,26461	0,05404
12	1,2209	2,1624	1,5448	1,2894	0,77115	0,2653	0,05611
14	1,1555	2,1078	1,4678	1,2215	0,82415	0,27027	0,05712
16	1,095	2,06	1,4063	1,1575	0,88128	0,28429	0,05708
18	1,04	2,0041	1,3516	1,0984	0,92702	0,29962	0,05615
20	0,9893	1,927	1,3014	1,043	0,94784	0,31548	0,05428
22	0,9423	1,8351	1,247	0,9916	0,94747	0,32336	0,05232
24	0,8991	1,7221	1,1941	0,9447	0,91536	0,32811	0,05072
26	0,8588	1,597	1,1404	0,9003	0,85957	0,3279	0,04832
28	0,8216	1,4748	1,085	0,8594	0,79503	0,32059	0,04601
30	0,7869	1,3608	1,0249	0,8219	0,72932	0,30245	0,04448
32	0,7544	1,2594	0,9713	0,7867	0,66941	0,28751	0,04282
34	0,7239	1,1654	0,9215	0,754	0,60989	0,27297	0,04158
36	0,7004	1,0795	0,8749	0,7236	0,54126	0,24914	0,03312
38	0,6951	1,0027	0,8321	0,6948	0,44253	0,19709	-4,32E-04
40	0,7107	0,9345	0,7927	0,6682	0,3149	0,11538	-0,0598

Kết luận

Các thử nghiệm này thể hiện độ nhớt của công thức bào chế ở các tình trạng vị trí tiêm mô phỏng theo phương pháp này phụ thuộc nhiều vào hàm lượng kẽm sao cho việc giảm tỷ lệ kẽm dẫn đến độ nhớt thấp hơn.

Ví dụ 2

t_{max} và đào thải $t_{1/2}$

t_{max} thể hiện thời gian đến nồng độ tối đa (tiếp xúc huyết tương tối đa), và $t_{½}$ thể hiện thời gian bán thải trong đó một nửa hợp chất mất đi khỏi huyết tương sau khi sử dụng.

Các đặc tính lý sinh đã thay đổi được mô tả trong Ví dụ 1 thích hợp với profin PK thể hiện t_{max} trước đó ở lợn (xem Bảng 3). Điều này chỉ ra rằng thời gian lưu trú của Hợp chất 1 trong mô dưới da giảm khi được công thức bào chế theo sáng chế, và ngược lại với cùng hợp chất được tạo ra trong công thức bào chế theo các giải pháp kỹ thuật đã biết.

Ngạc nhiên là, hàm lượng kẽm giảm hầu như không có ảnh hưởng với thời gian hoạt tính (ví dụ đào thải $t_{1/2}$ không bị ảnh hưởng), mà tạo ra sự công thức bào chế theo sáng chế và

sự công thức bào chế theo các giải pháp kỹ thuật đã biết phù hợp như nhau đối với việc sử dụng một lần mỗi tuần.

Bảng 4

Công thức bào chế	**Loài**	**t_{max} (giờ)**	**$t_{1/2}$ (giờ)**
Hợp chất 1, Công thức bào chế A **4,5 kẽm**/hexame, 25 mM phenol, 25 mM m-cresol	Lợn	20	47
	Người	42	185
Hợp chất 1, Công thức bào chế C **2,2 kẽm**/hexame, 60 mM phenol, 10 mM m-cresol, 20 mM NaCl	Lợn	8	45

Kết luận

Các thử nghiệm này thể hiện rằng thời gian lưu trú trong mô dưới da (t_{max}) của Hợp chất 1 giảm đáng kể do giảm Zn^{++}/hexame. Sự quan sát phù hợp với dữ liệu được biểu thị trong Ví dụ 1, mà thể hiện việc giảm kích thước của các oligome được tạo ra ở các tình trạng vị trí tiêm mô phỏng.

Vì vậy, khi được công thức bào chế theo sáng chế, Hợp chất 1 tạo ra các oligome nhỏ hơn ở vị trí tiêm dẫn đến profin PK/PD với thời gian lưu trú ngắn hơn trong mô dưới da được (t_{max} giảm).

Nhưng ngạc nhiên là, mặc dù thời gian lưu trú trong mô dưới da (t_{max}) của Hợp chất 1 giảm đáng kể, các sự tạo ra theo sáng chế được duy trì cùng thời gian bán thải (đào thải $t_{1/2}$ không bị ảnh hưởng). Điều này có nghĩa là các công thức bào chế theo sáng chế có thể tạo điều kiện các dẫn xuất insulin có tác dụng lâu dài nhanh đạt đến nồng độ tối đa trong tuần hoàn, trong khi vẫn duy trì nồng độ tối đa với thời gian lâu hơn.

Phát hiện bất ngờ này cũng cho phép hạn chế sự tạo ra các oligome lớn ở vị trí tiêm, trong khi vẫn duy trì thời gian hoạt tính dài tương xứng với profin sử dụng một lần mỗi tuần. Sự tạo ra các oligome lớn với độ nhớt cao ở vị trí tiêm có thể gây khó chịu khi tiêm.

Ví dụ 3

Trạng thái cấu hình riêng được nâng cao trong công thức bào chế

Với sự có mặt của kẽm, insulin ở người tồn tại dưới dạng các hexame trong công thức bào chế. Các hexame insulin ở người có thể có hai trạng thái cấu hình riêng khác nhau tùy

thuộc vào cấu hình riêng của các monome. Tám gốc axit amin đầu N của chuỗi B monome insulin có thể là cấu hình riêng được kéo dài (Trạng thái T) hoặc cấu hình riêng xoắn ốc α (Trạng thái R). Với sự có mặt của phenol và NaCl, insulin ở người có cấu hình riêng R, mà là cấu hình riêng thuận lợi liên quan đến sự ổn định vật lý và hóa học (Dunn MF. tổ hợp điều biến các tương tác kẽm-phối tử và ổn đình của hexame insulin: A review. Biometals 2005; 18; 295-303).

Tiến trình

Các thay đổi cấu hình riêng của hexame insulin được theo bởi 251 nm CD-signature (Krüger P, Gilge G, Cabuk Y và Wollmer A; Biol. Chem. Hoppe-Seyler 1990 **371** 669-673). Các mẫu được đo bằng cách sử dụng dụng cụ Jasco 815 và độ dài quãng đường là 0,02 cm. Các chuẩn độ trắng được trừ đi và Δε 251nm kết quả được vẽ đồ thị đối với Zn/6 insulinulin (mol/mol).

Trạng thái cấu hình riêng của các công thức bào chế đơn có 60 mM phenol/0 m-cresol

Trạng thái cấu hình riêng của các công thức bào chế 01-06 được thể hiện trong Bảng 5A và Fig.4A.

Bảng 5A: Trạng thái cấu hình riêng xu hướng trong công thức bào chế 01-06 với 60 mM phenol/0 m-cresol

Công thức bào chế	01	02	03	04	05	06
Trạng thái R xu hướng Δε (M-1cm-1) @251 nm	-6,15	-6,65	-7,63	-8,12	-7,98	-8,19

Fig.4A thể hiện các thay đổi cấu hình riêng (Trạng thái T; Trạng thái TR hỗn hợp; Trạng thái R) dưới dạng hàm của Zn^{++} trên sáu insulin (mol:mol) cho các công thức bào chế 01-06.

Trạng thái cấu hình riêng của các công thức bào chế đơn có 60 mM phenol và 10 mM m-cresol

Hai dãy công thức bào chế được điều chế. Tất cả công thức bào chế bao gồm 4,2mM Hợp chất 1, 16 mg/ml (1,6%) glyxerol, 20 mM NaCl, với độ pH là 7,4. Các công thức bào chế dãy B bao gồm 60 mM phenol và 10 mM m-cresol, với hàm lượng kẽm được thay đổi là 1,5 (B1), 2,0(B2), 2,3(B3), 2,5(B4), 3,0(B5), và 4,0(B6) trên 6 insulinulin. Dãy D bao gồm

25 mM phenol và 25 mM m-cresol, với hàm lượng kẽm được thay đổi là 1,5, 2,0, 2,3, 2,5, 3,0, 4,0 và 4,5 trên 6 insulinulin. Đồng thời dãy các công thức bào chế insulin ở người được điều chế, với hàm lượng kẽm khác nhau. Trạng thái cấu hình riêng được thể hiện trong Bảng 5B và Fig.4B.

Bảng 5B Xu hướng trạng thái cấu hình riêng trong các công thức bào chế B1-B6 với 60 mM phenol và 10 m-cresol, và các công thức bào chế D1-D7 với 25 mM phenol và 25 m-cresol

Xu hướng trạng thái R Δε (M-1cm-1) @251 nm	Dãy B	Dãy D
Zn/6 insulinulin	60/10 phe/cre	25/25 phe/cre
*1,5	-6,83 (B1)	-6,58 (D1)
2,0	-7,67 (B2)	-7,06 (D2)
2,3	-7,42 (B3)	-6,88 (D3)
2,5	-7,23 (B4)	-6,67 (D4)
3,0	-7,54 (B5)	-6,45 (D5)
4,0	-6,72 (B6)	-5,58 (D6)
4,5	không áp dụng	-5,03 (D7)

* Không bao gồm trong Fig.4B

Fig.4B thể hiện các thay đổi cấu hình riêng (Trạng thái T; Trạng thái TR hỗn hợp; Trạng thái R) dưới dạng hàm của Zn++ trên sáu insulin (mol:mol) cho các công thức bào chế Dãy B và Dãy D, và các công thức bào chế insulin ở người.

Kết luận

Dữ liệu quang phổ lưỡng sắc tròn tia UV gần thể hiện cấu hình riêng T/R của Hợp chất 1 phụ thuộc vào nồng độ kẽm. Giảm kẽm đi kèm với thay đổi trong trạng thái cấu hình riêng của Hợp chất 1 trong sự công thức bào chế từ trạng thái T/R hỗn hợp đến trạng thái R, mà đồng thời đi kèm với mức độ hexame cao được tạo ra trong các công thức bào chế (xem Ví dụ 4 ở dưới). Trạng thái R và mức độ hexame còn được tăng cường bằng sự thay đổi trong tỷ lệ phenol/meta-cresol từ 25/25 mM thành 60/10 mM (Fig.4B).

Dữ liệu của các công thức bào chế 01-06 thể hiện trạng thái R của Hợp chất 1 trong các công thức bào chế được làm phong phú thêm bằng cách giảm Zn từ 4,5 thành 2,2Zn ± 0,2Zn /6 Hợp chất 1 và bằng cách bỏ qua m-cresol (Fig.4A).

Ví dụ 4

Sự phân phối oligome được nâng cao trong công thức bào chế

Tiến trình

Sắc ký loại trừ kích thước (SEC) là phương pháp chính xác định lượng sự phân phối oligome không cộng hóa trị của các công thức bào chế insulin. SEC được thực hiện bằng cách sử dụng cột BEH200, 1,7 µm 4,6x150mm với dung dịch đệm chạy sắc ký bao gồm 8,0 mM phenol, 140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, độ pH là 7,4. Sắc ký được thực hiện ở 22 C bằng cách sử dụng 2 µL thể tích tiêm và dòng chảy 0,3 ml/phút. Đối với các tiêu chuẩn trọng lượng phân tử albumin, hexame insulin cộng hóa trị, và insulin đơn thể được sử dụng. Các sắc ký đồ được phân tích bằng sự tích hợp để biểu diễn các loài lớn hơn hexame (3,0-3,8 phút), hexame (3,8-4,3 phút), và các loài nhỏ hơn hexame (4,3-5,5 phút). Hãy lưu ý rằng các giới hạn tích hợp chính xác cho mỗi bộ dữ liệu sẽ thay đổi nhẹ do các thay đổi trong hiệu suất cột.

Dữ liệu phân tán tia X góc hẹp (SAXS) được thu thập bằng cách sử dụng dụng cụ BioSAXS-2000 được trang bị với tế bào dòng chảy và thiết bị dò Dectris 100K có phạm vi q là 0,008-0,661 $Å^{-1}$. Các phép đo dung dịch đệm được trừ ra từ các phép đo mẫu để có được các profin tán xạ protein. Dữ liệu từ mẫu tham chiếu của insulin ở người trong trạng thái hexame với cấu hình riêng R được thu thập theo cùng quy trình, từ mẫu 0,6 mM insulin ở người, 3 Zn^{++}/sáu insulin, dung dịch đệm 16 mM phenol, 20 mM NaCl và 7 mM phosphat có độ pH là 7,4.

Sự phân phối oligome cho các công thức bào chế bao gồm 60 mM phenol và 0 m-cresol

Sắc ký SEC nguyên bản so sánh các công thức bào chế 01, 02, 03, 04, 05, và 06 được tạo ra (xem Bảng 6 và Fig.5A). .

Bảng 6: Sự phân phối các loài như thu được bởi SEC nguyên bản bằng cách tích hợp các sắc ký đồ

	Sự gán đỉnh	Công thức bào chế					
		01	02	03	04	05	06

		% các loài trong công thức bào chế					
(3,0-3,8 phút)	Lớn hơn hexame	8,8	9,4	1,1	0,6	0,7	0,2
(3,8-4,3 phút)	Hexame	34,5	48,9	95,1	98,1	95,9	98,9
(4,3-5,5 phút)	Nhỏ hơn hexame	56,8	41,7	3,8	1,3	3,5	0,9

Sự phân phối oligome cho các công thức bào chế bao gồm 60 mM phenol và 10 mM m-cresol

Sắc ký SEC nguyên bản so sánh các công thức bào chế B1-B6 và công thức bào chế A được tạo ra (xem Bảng 6 và Fig.5B). Diện tích dưới đường cong là tương tự cho tất cả các sắc ký đồ. Các sắc ký đồ được phân tích bằng sự tích hợp để biểu diễn các loài lớn hơn hexame (3,0-3,8 phút), hexame (3,8-4,3 phút), và các loài nhỏ hơn hexame (4,3-5,5 phút). Hãy lưu ý rằng các giới hạn tích hợp chính xác cho mỗi dữ liệu set sẽ thay đổi nhẹ do các thay đổi trong hiệu suất cột.

Bảng 7: Sự phân phối oligome bởi SEC

Sự gán đỉnh	**Công thức bào chế**						
	B1	**B2**	**B3**	**B4**	**B5**	**B6**	**A**
	% các loài trong công thức bào chế						
Lớn hơn hexame	0,2	0,5	0,8	0,7	2,2	4,9	18,2
Hexame	80,3	94,8	86,7	82,1	65,5	41,8	22,0
Nhỏ hơn hexame	19,5	4,8	12,5	17,2	32,3	53,3	59,8

Kết luận

Dữ liệu SEC của các công thức bào chế 01-06 (Bảng 6, Fig.5A) thể hiện sự phân phối oligome của Công thức bào chế 01 Hợp chất 1 được biểu thị đặc điểm bởi các bởi các băng rộng mà không có loài oligome chiếm ưu thế rõ ràng. Sự phân phối oligome của Hợp chất 1 trong Các công thức bào chế 03-06 hẹp hơn so với Các công thức bào chế 01 và 02. Thời gian duy trì của đỉnh chính của các công thức bào chế 03-06 phù hợp với hexame và đỉnh nhỏ với thời gian duy trì là 5 phút phù hợp với monome hoặc dime.

Dữ liệu SEC của các công thức bào chế B1-B6 và A (Bảng 7, Fig.5B) cũng thể hiện với 2,0-2,5 kẽm/6 insulinulin, đỉnh hexame được làm tốt thêm, so với 4,0 hoặc 4,5 Zn.

Do đó, đỉnh hexame được làm tốt thêm với hàm lượng kẽm thấp (ví dụ, từ 2,0 Zn đến 2,5 Zn) so với hàm lượng kẽm cao (ví dụ 4,0 hoặc 4,5 Zn). Đối với cả hexame 4,5 Zn và 2,2 Zn được làm tốt thêm với 60mM/0 hoặc 10mM phenol/m-cresol liên quan đến 25/25 mM phenol/m-cresol. Khi được lập công thức bào chế theo sáng chế hàm lượng hexame tăng và sự oligom hóa trở nên được định ra rõ hơn.

Dữ liệu SAXS cũng xác nhận mẫu oligom hóa của Công thức bào chế A của Hợp chất 1 với 4,5 Zn^{++}/hexame không giống như hexame insulin ở người kinh điển trong khi kết cấu có gốc hexame của Hợp chất 1 là vượt trội trong công thức bào chế C (Fig.6). Khi được lập công thức bào chế theo sáng chế (Công thức bào chế C) mẫu oligom hóa trở nên định ra rõ hơn và phù hợp với kết cấu có gốc hexame tương tự với insulin ở người.

Ví dụ 5

Độ ổn định hóa học và độ ổn định vật lý được nâng cao

Các kết quả thực nghiệm trong Ví dụ thể hiện cả độ ổn định hóa học và độ ổn định vật lý của Hợp chất 1 được nâng cao của tcác công thức bào chế mới so với công thức bào chế A tham chiếu. Cụ thể, với hàm lượng phenol cao và hàm lượng m-cresol thấp, cả độ ổn định hóa học và độ ổn định vật lý của Hợp chất 1 tăng khi nồng độ kẽm giảm.

Tiến trình

Độ nguyên chất được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cực cao pha đảo (RP-UHPLC) mà các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng Acquity CSH Fluoro Phenyl, 130Å, 1,7 µm, 2,1x150mm column, rửa giải gradien bằng axetonitril trong pha động của axetonitril và dung dịch đệm photphorơ trong nước với sự phát hiện UV tiếp theo (215 nm) với dòng chảy 0,30 ml/phút với thể tích tiêm mẫu là 2-3 µl. Độ nguyên chất được đánh giá bằng diện tích của đỉnh chính được chia cho diện tích của tất cả các đỉnh x 100%.

Độ ổn định hóa học của công thức bào chế Hợp chất 1 với 60 mM phenol và 10 mM m-cresol

Độ ổn định được đo dưới dạng % độ nguyên chất của tổng peptit với RP-UHPLC thể hiện độ ổn định được tăng đáng kể của Hợp chất 1 trong Công thức bào chế B và Công thức bào chế C, mà bao gồm 60 mM phenol và 10 mM m-cresol, so với Công thức bào chế A của Hợp chất 1, mà bao gồm 25 mM phenol và 25 mM m-cresol. Xem Bảng 8 và Fig.7A.

Bảng 8: % Độ nguyên chất của Hợp chất 1

Công thức bào chế	Thời gian lưu trữ ở 30°C (tháng)			
	0	1	2	3
A	95,4	93,8	93,3	91,3
B	95,3	94,3	95,0	94,3
C	95,7	94,7	95,0	94,6

Độ ổn định hóa học của các công thức bào chế của Hợp chất 1 với 60 mM phenol và 0 m-cresol

Độ ổn định của các công thức bào chế được thể hiện trong Bảng 9 được đo là % Độ nguyên chất của tổng peptit với RP-UHPLC xác nhận thêm rằng độ ổn định hóa học của Hợp chất 1 tăng dưới dạng hàm của nồng độ kẽm trong các công thức bào chế với hàm lượng phenol tương đối cao và hàm lượng m-cresol thấp. Các kết quả thể hiện độ ổn định tăng của Hợp chất 1 khi kẽm được giảm từ 4,5 Zn^{++}/sáu insulin đến 2,4, 2,2 và 2,0 Zn^{++}/sáu insulin trong các công thức bào chế với sự thay đổi trong hệ thống bảo quản từ 25/25 mM phenol/m-cresol đến 60 mM phenol và 0 m-cresol. Xem Bảng 9 và Fig.7B.

Bảng 9: % Độ nguyên chất của Hợp chất 1

Công thức bào chế	Thời gian lưu trữ ở 37°C (tuần)			
	0	2	4	6
01	97,5	96,1	94,3	92,8
04	97,4	96,7	96,0	95,3
05	97,6	96,7	96,0	95,3
06	97,3	96,7	96,0	95,2

Kết luận

Khi được lập công thức bào chế theo sáng chế (xem các công thức bào chế B, C, 04, 05, và 06; cá Bảng 8 và 9, và Fig.7A và Fig.7B) độ ổn định hóa học tăng so với lĩnh vực kỹ thuật đã được biết đến (các Công thức bào chế A và Công thức bào chế 01).

Độ ổn định vật lý

Tiến trình:

Các công thức bào chế của Hợp chất 1 được thử nghiệm trong tấm microtiter 96 giếng với 4 bản sao có thể tích là 200 µl. ThT (thioflavin T) được bổ sung vào 1,0 ml từ mỗi công thức bào chế, đến nồng độ 1 µM. Xét nghiệm Thioflavin T (ThT) cho xu hướng để tạo ra các sợi nhỏ dạng tinh bột được thực hiện trên Thermo Fluoroskan, lắc 960 vòng/phút, 37□C, trong 45 giờ. Sự phát xạ ThT được quét trước và sau khi xét nghiệm. Thời gian trễ cho đến khi khởi phát phát xạ huỳnh quang ThT là phép đo độ ổn định vật lý. Các thời gian trễ được xác định từ các đường cong huỳnh quang được tính trung bình trên 4 bản sao. Thời gian trễ dài hơn chỉ ra độ ổn định vật lý cao hơn.

Nên được lưu ý rằng các kết quả ThT thu được từ tiến trình được mô tả có thể thay đổi giữa các thử nghiệm. Do đó mong muốn rằng các phép đo cho bộ các công thức bào chế cho trước được so sánh trong cùng thử nghiệm và không trong các thử nghiệm chéo. Trong Ví dụ này, cùng công thức bào chế tham chiếu được thử nghiệm cùng với các công thức bào chế khác nhau theo sáng chế trong các thử nghiệm khác nhau. Ví dụ, công thức bào chế A đối với Công thức bào chế C; Công thức bào chế 01 đối với các Công thức bào chế 04-06.

Các thời gian trễ được thể hiện trong Bảng 10 dưới đây. Công thức bào chế A hoặc Công thức bào chế 01 là công thức bào chế tham chiếu để so sánh.

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 10A và Bảng 10B.

Độ ổn định vật lý của Hợp chất 1 trong các công thức bào chế với 60 mM phenol và 10 m-cresol

Bảng 10A: Các thời gian trễ Tht (1)

	Công thức bào chế C	Công thức bào chế A
Thời gian trễ (giờ)	11,3	10,0

Bảng 10B: Các thời gian trễ Tht (2)

	01	04	05	06
Thời gian trễ (giờ)	9,7	29,3	13,3	>45

Kết luận

Các thời gian trễ thu được trong xét nghiệm ThT chỉ ra độ ổn định vật lý của Hợp chất 1 được nâng cao trong các công thức bào chế với hàm lượng kẽm thấp, hàm lượng phenol cao, và hàm lượng m-cresol thấp. Dữ liệu thể hiện khi giảm kẽm từ 4,5Zn/6 insulinulin đến 2,2 ±0,2Zn/6 insulinulin và đồng thời tăng phenol từ 25 mM đến 60mM và việc giảm m-cresol từ 25 mM đến 10 mM dẫn đến thời gian trễ dài hơn và do đó độ ổn định vật lý được nâng cao. Đối với m-cresol được loại bỏ, độ ổn định vật lý của Hợp chất 1 được nâng cao hơn trong các công thức bào chế với hàm lượng kẽm thấp (xem Bảng 10B).

Ví dụ 6

Các công thức bào chế kết hợp và và độ ổn định vật lý và hóa học của chúng

Hợp chất 1 có thể được lập công thức đồng bào chế cùng với semaglutide tương tự GLP-1 một lần mỗi tuần cho sự kết hợp tỷ lệ cố định.

Các công thức bào chế kết hợp từ 1 đến 6 sau của Hợp chất 1 và semaglutide được điều chế. Công thức bào chế đơn của Hợp chất 1 cũng được điều chế như công thức bào chế đơn công thức bào chế tham chiếu 1. Các trị số đích được dự định được thể hiện trong Bảng 11, dưới đây.

Bảng 11: Các công thức bào chế kết hợp của Hợp chất 1 và semaglutide

	Công thức bào chế đơn Công thức bào chế tham chiếu 1	Công thức bào chế kết hợp 1	Công thức bào chế kết hợp 2	Công thức bào chế kết hợp 3	Công thức bào chế kết hợp 4	Công thức bào chế kết hợp 5	Công thức bào chế kết hợp 6
Hợp chất 1 (mM)	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
Semaglutide (mM)/(mg/ml)	không áp dụng	0,49/2,0	0,4/1,6	0,6/2,4	0,3/1,25	0,49/2,0	0,49/2,0
$Zn(axetat)_2$ (mM)	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54	1,4	1,75
n Zn/6 insulinulin	~2,2	~2,2	~2,2	~2,2	~2,2	~2,0	~2,5

Chất dẫn thuốc (tất cả các công thức bào chế)	60 mM phenol 10 mM m-cresol 1,5% glyxerol 20 mM NaCl độ pH 7,4

Các nồng độ của Hợp chất 1 và semaglutide trong các công thức bào chế được tạo ra được đo bằng cách sử dụng RP-HPLC và các vật liệu tham chiếu. Các nồng độ này được nêu trong Bảng 12A và 12B, dưới đây.

Bảng 12A: Các nồng độ được đo của Hợp chất 1 và semaglutide

	Công thức bào chế đơn **Công thức bào chế tham chiếu-1**	**Công thức bào chế kết hợp 1**	**Công thức bào chế kết hợp 2**	**Công thức bào chế kết hợp 3**	**Công thức bào chế kết hợp 4**
Hợp chất 1 (mM) Được đo	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
Semaglutide (mM) Được đo	không áp dụng	0,5	0,4	0,6	0,3

Bảng 12B: Các nồng độ được đo của Hợp chất 1 và semaglutide (lô riêng từ Bảng 12A)

	Công thức bào chế đơn **Công thức bào chế tham chiếu-1**	**Công thức bào chế kết hợp 5**	**Công thức bào chế kết hợp 6**
Hợp chất 1 (mM)	4,2	4,3	4,3

Được đo			
Semaglutide (mM) Được đo	không áp dụng	0,49	0,49

Do đó, các nồng độ được đo lệch ít hơn 3% từ các trị số đích dự định.

Các công thức bào chế kết hợp I-VI sau của Hợp chất 1 và semaglutide cũng được điều chế sau. Công thức bào chế đơn của Hợp chất 1 được điều chế như công thức bào chế đơn tham chiếu 2. Các trị số đích dự định được thể hiện trong Bảng 13, dưới đây.

Bảng 13

	Công thức bào chế đơn Công thức bào chế tham chiếu 2	Công thức bào chế kết hợp I	Công thức bào chế kết hợp II	Công thức bào chế kết hợp III	Công thức bào chế kết hợp IV	Công thức bào chế kết hợp V	Công thức bào chế kết hợp VI
Hợp chất 1 (mM)	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
Semaglutide (mM)/(mg/ml)	không áp dụng	0,49/2,0	0,49/2,0	0,3/1,25	0,49/2,0	0,49/ 2,0	0,3/1,25
$Zn(axetat)_2$ (µg/ml)	101	206	101	101	101	110	110
n Zn/6 insulinulin	~2,2	~4,5	~2,2	~2,2	~2,2	~2,4	~2,4
Phenol	60 mM	25 mM	60 mM	60 mM	25 mM	60 mM	60 mM
m-cresol	0	25 mM	0	0	25 mM	0	0

Chất dẫn thuốc (tất cả các công thức bào chế)	1,5% glyxerol 20 mM NaCl pH 7,4

Độ ổn định vật lý

Tiến trình:

Các công thức bào chế được thử nghiệm trong tấm microtiter 96 giếng với 8 bản sao 200 µl. ThT (thioflavin T) được bổ sung vào 1,0 ml từ mỗi công thức bào chế, đến nồng độ 1 µM. Xét nghiệm Thioflavin T (ThT) cho xu hướng để tạo ra các sợi nhỏ dạng tinh bột được thực hiện trên Thermo Fluoroskan, lắc 960 vòng/phút, 37°C, trong 45 giờ. Sự phát xạ ThT được quét trước khi và sau khi xét nghiệm Thời gian trễ cho đến khi khởi phát của sự phát xạ huỳnh quang ThT (sự tạo ra của các sợi nhỏ dạng tinh bột) là phép đo của độ ổn định vật lý. Các thời gian trễ được xác định từ các đường cong huỳnh quang được tính trung bình trên 8 bản sao. Các thời gian trễ được thử nghiệm hai lần lần lượt cho các công thức bào chế kết hợp 1-4 và các công thức bào chế kết hợp 5 và 6; và mỗi thử nghiệm với công thức bào chế đơn được thử nghiệm làm tham chiếu, làm cho các kết quả có thể so sánh được. Thời gian trễ dài hơn chỉ ra độ ổn định vật lý cao hơn.

Công thức bào chế đơn tham chiếu và các công thức bào chế kết hợp của Hợp chất 1 được thử nghiệm trong thử nghiệm tấm microtiter 96 giếng Thioflavin T (ThT) cho xu hướng để tạo ra các sợi nhỏ dạng tinh bột.

Các thời gian trễ được thể hiện trong Bảng 14A, 14B, 14C dưới đây.

Bảng 14A: Các thời gian trễ trong công thức bào chế kết hợp

	Công thức bào chế đơn **Công thức bào chế tham chiếu 1**	**Công thức bào chế kết hợp 1**	**Công thức bào chế kết hợp 2**	**Công thức bào chế kết hợp 3**	**Công thức bào chế kết hợp 4**
Thời gian trễ (giờ)	11,0	19,3	18,0	21,6	23

Bảng 14B: Các thời gian trễ trong công thức bào chế kết hợp

	Công thức bào chế đơn Công thức bào chế tham chiếu 1	Công thức bào chế kết hợp 5	Công thức bào chế kết hợp 6
Thời gian trễ (giờ)	9,9	20,6	45

Bảng 14C: Các thời gian trễ trong công thức bào chế kết hợp

	Công thức bào chế đơn tham chiếu 2	Công thức bào chế kết hợp I	Công thức bào chế kết hợp II	Công thức bào chế kết hợp III	Công thức bào chế kết hợp IV	Công thức bào chế kết hợp V	Công thức bào chế kết hợp VI
Thời gian trễ (giờ)	29,3	44,3	45	45	28,6	45	45

Kết luận:

Xét nghiệm ThT chỉ ra rằng nếu không tăng hàm lượng kẽm, các công thức bào chế kết hợp của Hợp chất 1 và semaglutide không làm hỏng độ ổn định vật lý của Hợp chất 1 so với công thức bào chế đơn Hợp chất 1. Trên thực tế, các thời gian trễ của các công thức bào chế kết hợp dài hơn nhiều so với các thời gian trễ của công thức bào chế đơn Hợp chất 1, thể hiện sự lập công thức đồng bào chế của Hợp chất 1 với semaglutide trên thực tế ổn định công thức bào chế đối với sự tạo ra sợi nhỏ dạng tinh bột không mong muốn. Khi được so với công thức bào chế kết hợp của dẫn xuất insulin có tác dụng lâu dài khác và dẫn xuất GLP-1 (ví dụ degludec và liraglutide), phát hiện này bất ngờ và đáng ngạc nhiên.

Các kết quả Bảng 14C thể hiện giảm hàm lượng m-cresol có thể nâng cao độ ổn định vật lý của công thức bào chế kết hợp của Hợp chất 1 và semaglutide hơn nữa; và tăng hàm lượng phenol cũng nâng cao độ ổn định vật lý của công thức bào chế kết hợp của Hợp chất 1 và semaglutide.

Các kết quả Bảng 14C cũng thể hiện khi lập công thức đồng bào chế Hợp chất 1 với semaglutide trong công thức bào chế theo sáng chế, độ ổn định vật lý của Hợp chất 1 tăng, so với sử dụng công thức bào chế trong lĩnh vực kỹ thuật đã được biết đến (Công thức bào chế I) cho công thức bào chế kết hợp của Hợp chất 1 và semaglutide.

Độ ổn định hóa học

Tiến trình

Độ nguyên chất được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cực cao pha đảo (RP-UHPLC) mà các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng Acquity CSH Fluoro Phenyl, 130Å, 1,7 um, cột 2,1x150mm, phát xạ gradien bởi axetonitril trong pha động của axetonitril và dung dịch đệm photphorơ trong nước với sự phát hiện UV tiếp theo (215 nm) với dòng chảy 0,30 ml/phút với thể tích tiêm mẫu là 2-3 µl. Độ nguyên chất được đánh giá là diện tích của đỉnh chính được chia cho diện tích của tất cả đỉnh x 100%.

Độ ổn định của các công thức bào chế được thể hiện trong Bảng 15 được đo dưới dạng % Độ nguyên chất của tổng Hợp chất 1 với RP-UHPLC.

Các kết quả xác nhận độ ổn định hóa học tăng của Hợp chất 1 trong các công thức bào chế kết hợp khi kẽm được giảm từ 4,5 Zn++/sáu insulin đến 2,4, 2,2 và 2,0 Zn++/sáu insulin (Bảng 15, Fig.8). Thay đổi trong hệ thống bảo quản từ 25/25 mM phenol/m-cresol đến 60 mM phenol và 0 m-cresol dẫn đến sự cải thiện bổ sung trong độ ổn định hóa học của Hợp chất 1 trong công thức bào chế kết hợp.

Bảng 15: Độ nguyên chất của Hợp chất 1 trong công thức bào chế kết hợp

Công thức bào chế kết hợp	Độ nguyên chất với thời gian lưu trữ ở 37°C (tuần)			
	0	2	4	6
I	97,5%	96,1%	94,4%	92,9%
II	97,6%	96,6%	95,8%	95,0%
III	97,6%	96,7%	95,9%	95,2%
IV	97,2%	96,4%	95,4%	94,4%
V	97,3%	96,6%	95,9%	95,1%
VI	97,3%	96,6%	95,9%	95,2%

Kết luận

Khi lập công thức đồng bào chế Hợp chất 1 với semaglutide trong công thức bào chế theo sáng chế, độ ổn định hóa học của Hợp chất 1 tăng, so với sử dụng công thức bào chế trong lĩnh vực kỹ thuật được đề cập (Công thức bào chế I) cho công thức bào chế kết hợp của Hợp chất 1 và semaglutide.

Ví dụ 7

Các đặc tính PK của các công thức đồng bào chế với semaglutide trong mẫu PK ở lợn LYD

Trong các công thức bào chế được tạo ra trong Ví dụ 6, công thức bào chế đơn tham chiếu và công thức bào chế kết hợp 1 và công thức bào chế kết hợp 2 của Hợp chất 1 được định rõ đặc điểm trong mẫu động vật PK ở lợn LYD. Quan trọng là các biến số PK t_{max} và $t_{½}$ của Hợp chất 1, cũng như thời gian ổn định trung bình (MRT) của Hợp chất 1 không thay đổi đáng kể khi lập công thức đồng bào chế với semaglutide.

Nghiên cứu chéo với 16 động vật (n=8 cho mỗi công thức bào chế) được thực hiện.

Bảng 16: Các biến số PK của Hợp chất 1

	Công thức bào chế đơn Công thức bào chế tham chiếu 1	Công thức bào chế kết hợp 1	Công thức bào chế kết hợp 2
t_{max} (giờ)	13,0 ± 7,0	9,0 ± 2,0	8,0 ± 2,0
$t_{½}$ (giờ)	48,0 ± 4,1	48,6 ± 3,2	47,9 ± 5,3
MRT (giờ)	71 ± 6	69,0 ± 4,0	68,0 ± 4,0

Các trị số trung bình ± độ lệch chuẩn được thể hiện.

Các biến số PK cho Hợp chất 1 khi được lập công thức đồng bào chế với semaglutide trong Công thức bào chế kết hợp 1 và Công thức bào chế kết hợp 2 không thay đổi đáng kể so với Hợp chất 1 được sử dụng như công thức bào chế đơn. Các trị số t_{max} hơi thấp hơn cho các công thức đồng bào chế, nhưng với độ lệch chuẩn cho các trị số tham chiếu của Hợp chất 1 chồng nhau. $t_{½}$ và MRT rất tương tự cho Hợp chất 1 trong các công thức đồng bào chế so với công thức bào chế đơn tham chiếu. Kết luận là các đặc tính PK của Hợp chất 1 không bị ảnh hưởng đáng kể bởi công thức đồng bào chế với semaglutide.

Ví dụ 8

Kích thước oligome được cải thiện của dung dịch đệm được trao đổi các công thức đồng bào chế 60/0

Sự oligom hóa của các công thức bào chế kết hợp I-VI được tạo ra ở các tình trạng vị trí tiêm mô phỏng của Hợp chất 1 được xác định theo tiến trình được mô tả trong Ví dụ 1. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 17 và Fig.9A và Fig.9B.

Bảng 17: Kích thước oligome của các công thức bào chế kết hợp

	Công thức bào chế kết hợp I	Công thức bào chế kết hợp II	Công thức bào chế kết hợp III	Công thức bào chế kết hợp IV	Công thức bào chế kết hợp V	Công thức bào chế kết hợp VI
Rh(trung bình) [nm]	13,7	4,1	4,0	4,6	4,5	4,7
S*(trung bình) [S]	8,32	4,30	4,40	4,72	4,67	4,96

Kết luận

Các thử nghiệm này thể hiện kích thước của các oligome được tạo ra ở các tình trạng vị trí tiêm mô phỏng phụ thuộc nhiều vào hàm lượng kẽm.

Kích thước trung bình của các oligome được tạo ra từ các công thức bào chế kết hợp ở các tình trạng vị trí tiêm mô phỏng giảm đáng kể trong các công thức bào chế với hàm lượng kẽm thấp (ví dụ, 2,4 và 2,2 Zn++/sáu insulin) được so sánh với các công thức bào chế với hàm lượng kẽm cao (ví dụ 4,5 Zn++/sáu insulin). Tăng mức độ phenol và giảm mức độ m-cresol làm giảm thêm kích thước trung bình của các oligome được tạo ra từ các công thức bào chế kết hợp ở các tình trạng vị trí tiêm mô phỏng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm dược bao gồm A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1); và semaglutide;

và còn bao gồm

từ 1 đến 2% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol; từ 45 đến 75 mM phenol; từ 0 đến 19 mM m-cresol; từ 1,5 đến 2,5 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin này; từ 5 đến 50 mM natri clorua; và có trị số pH trong phạm vi từ 7,2 đến 8,0.

2. Chế phẩm dược theo điểm 1, trong đó lượng của hợp chất 1 trong phạm vi từ 3,5 đến 5,0 mM.

3. Chế phẩm dược theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó lượng của semaglutide trong phạm vi từ 0,3 đến 0,7 mM.

4. Chế phẩm dược theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 3, bao gồm từ 45 đến 75 mM phenol, như từ 55 mM đến 65 mM phenol; hoặc bao gồm 50 mM, 51 mM, 52 mM, 53 mM, 54 mM, 55 mM, 56 mM, 57 mM, 58 mM, 59 mM, 60 mM, 61 mM, 62 mM, 63 mM, 64 mM, 65 mM, 66 mM, 67 mM, 68 mM, 69 mM, hoặc 70 mM phenol.

5. Chế phẩm dược theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 4, bao gồm từ 0 đến 19 mM *m*-cresol, như từ 0 mM đến 15 mM *m*-cresol; hoặc bao gồm 0 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, hoặc 15 mM *m*-cresol.

6. Chế phẩm dược theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 5, bao gồm ít hơn 25 mM natri clorua.

7. Chế phẩm dược theo điểm 1, bao gồm

từ 4,0 đến 4,5 mM dẫn xuất insulin;

từ 1 đến 2% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol;

từ 50 đến 70 mM phenol;

từ 0 đến 15 mM *m*-cresol; từ 2,0 đến 2,5 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin;
từ 10 đến 25 mM natri clorua; và
có trị số pH trong phạm vi từ 7,2 đến 7,6.

8. Chế phẩm dược theo điểm 1, bao gồm
4,2 mM dẫn xuất insulin;
1,5% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol;
60 mM phenol;
0 mM *m*-cresol;
2,2 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin;
20 mM natri clorua; và
có trị số pH bằng 7,4.

9. Chế phẩm dược theo điểm 1, bao gồm
4,2 mM dẫn xuất insulin;
1,5% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol;
60 mM phenol;
10 mM *m*-cresol;
2,2 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin;
20 mM natri clorua; và
có trị số pH bằng 7,4.

10. Chế phẩm dược theo điểm 1, bao gồm A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1); và semaglutide; và còn bao gồm 1,5% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol; 60 mM phenol; 10 mM *m*-cresol; 2,2 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin; 20 mM natri clorua; và có trị số pH bằng 7,4.

11. Chế phẩm dược theo điểm 1, bao gồm
4,2 mM A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1);
0,49 mM semaglutide;

1,5% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol;

60 mM phenol;

10 mM m-cresol;

2,2 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin;

20 mM natri clorua; và

có trị số pH bằng 7,4.

12. Chế phẩm dược theo điểm 1, bao gồm

4,2 mM A14E, B16H, B25H, B29K((N$^{\varepsilon}$-Eicosanedioyl-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]axetylamino}etoxy)etoxy]axetyl)), insulin ở người desB30 (Hợp chất 1);

0,3 mM semaglutide;

1,5% (trọng lượng/trọng lượng) glyxerol;

60 mM phenol;

10 mM m-cresol;

2,2 mol các ion kẽm trên sáu mol dẫn xuất insulin;

20 mM natri clorua; và

có trị số pH bằng 7,4.

CÁC HÌNH VẼ

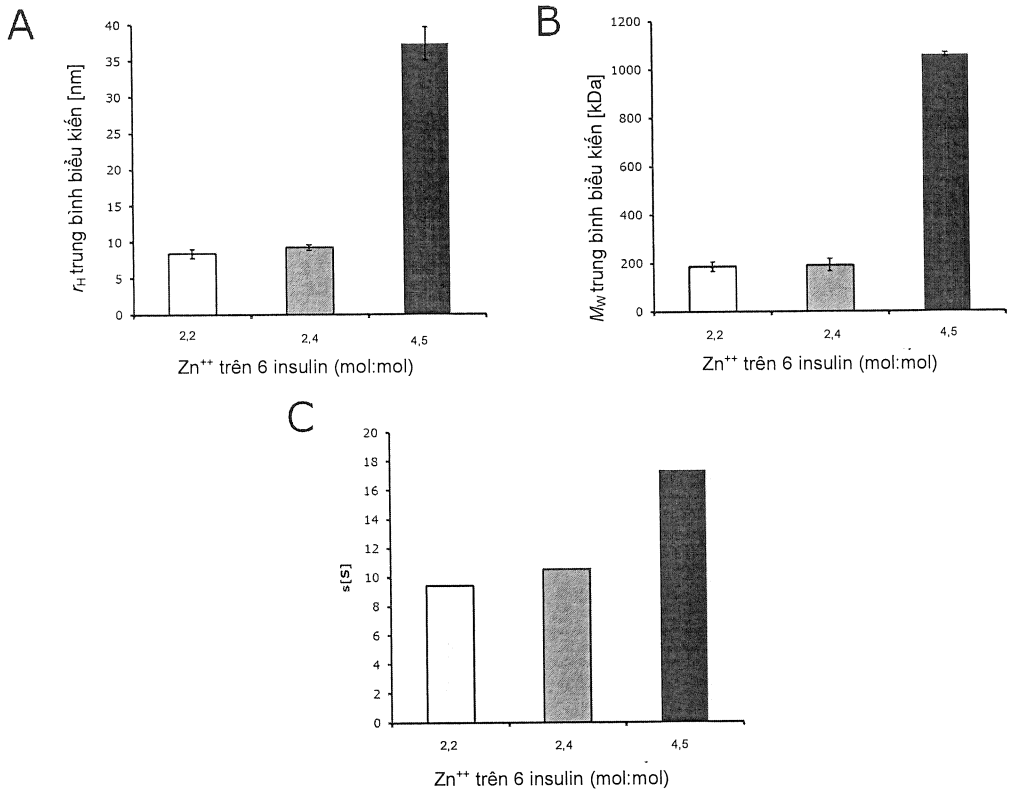

Fig.1

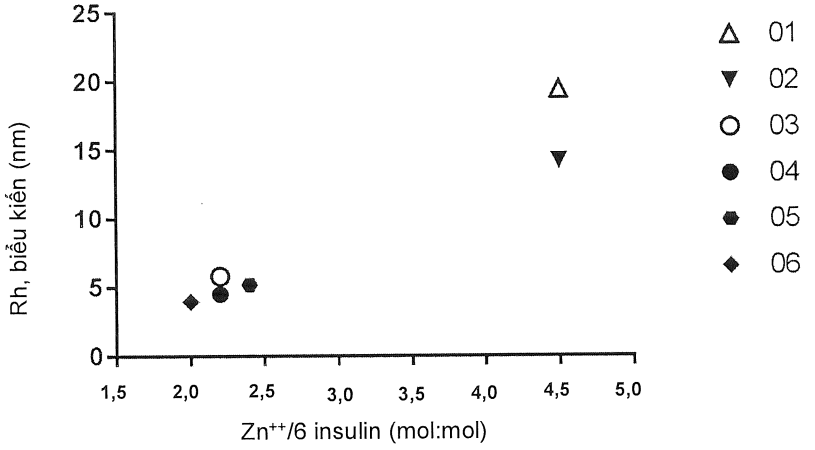
25
20
15
10
5
0
Rh, biểu kiến (nm)
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0
4,5
5,0
Zn++/6 insulin (mol:mol)
01
02
03
04
05
06

Fig.2A

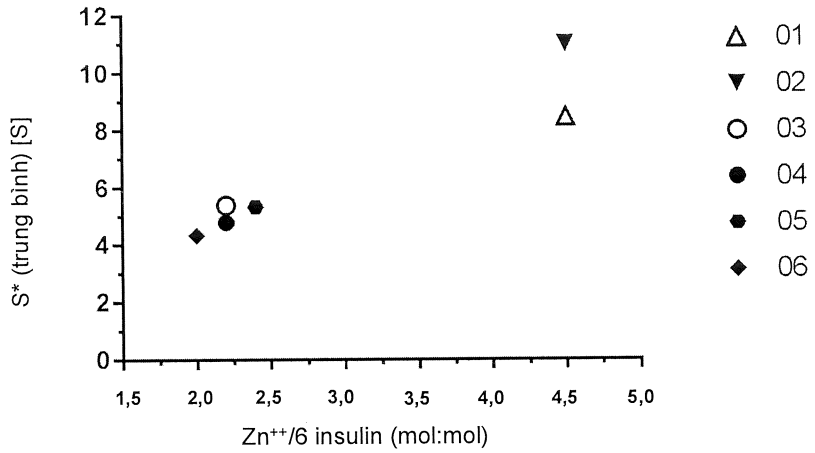
12
10
8
6
4
2
0
S* (trung bình) [S]
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0
4,5
5,0
Zn++/6 insulin (mol:mol)
01
02
03
04
05
06

Fig 2B

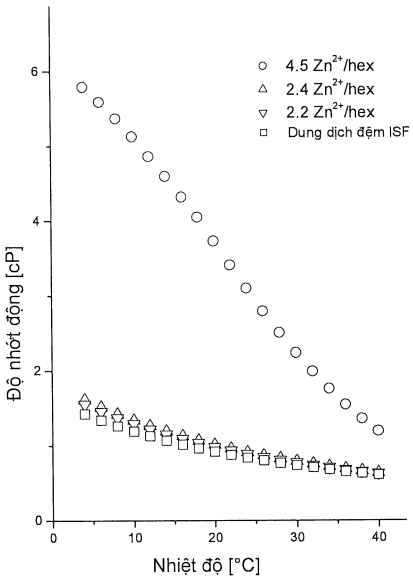

Fig.3A

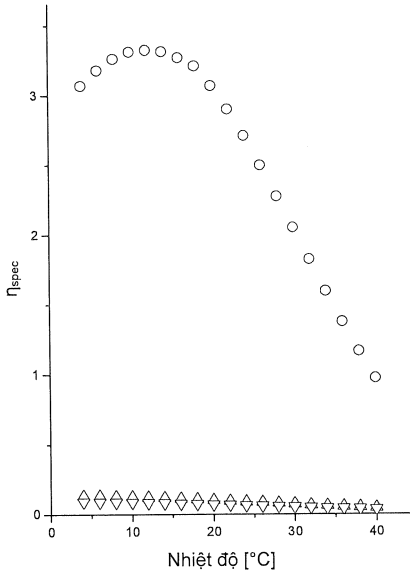

Fig.3B

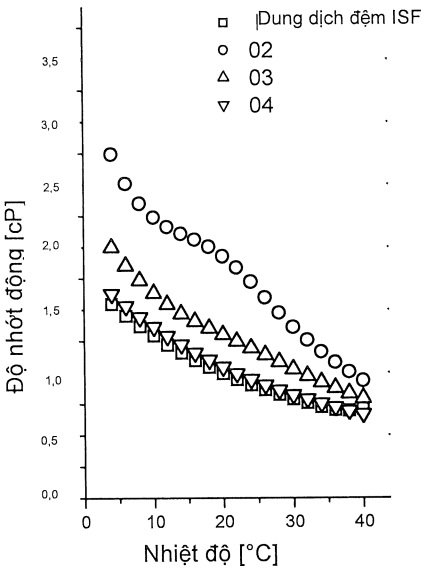

Fig.3C

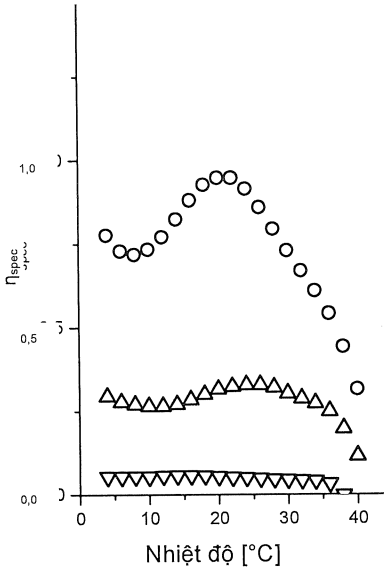

Fig.3D

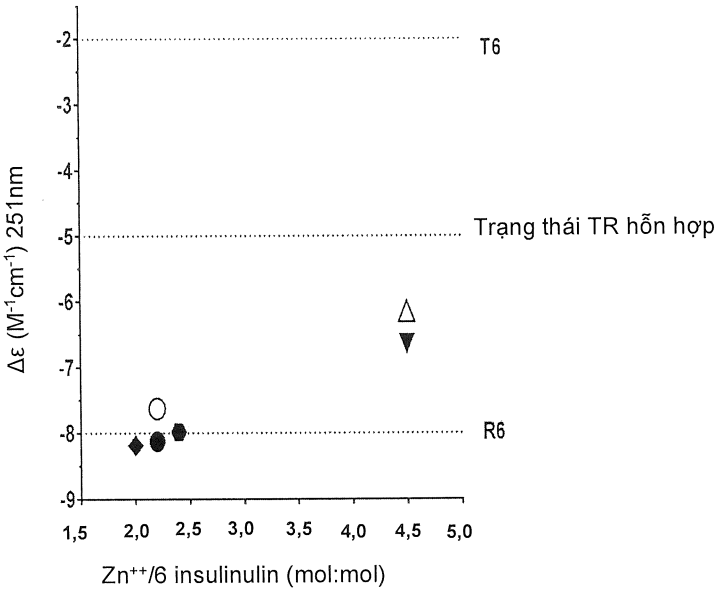
T6
Trạng thái TR hỗn hợp
R6
Δε (M-1cm-1) 251nm
-2
-3
-4
-5
-6
-7
-8
-9
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0
4,5
5,0
Zn++/6 insulinulin (mol:mol)

Fig.4A

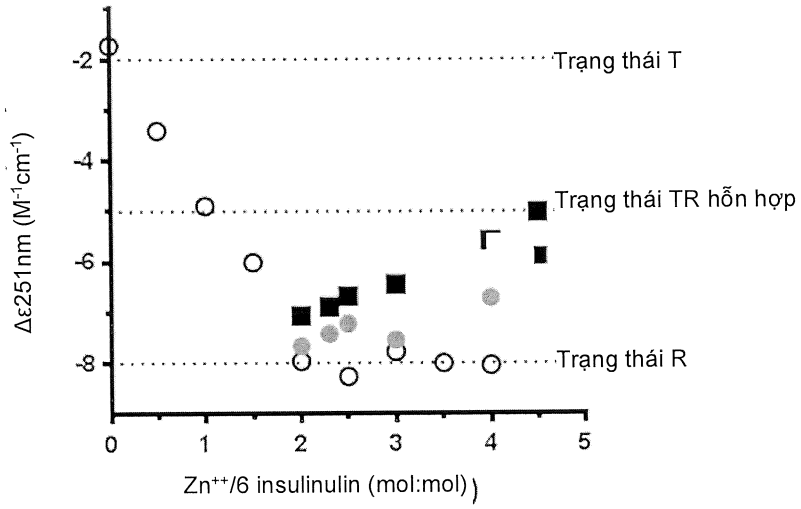
Trạng thái T
Trạng thái TR hỗn hợp
Trạng thái R
Δε251nm (M-1cm-1)
-2
-4
-6
-8
0
1
2
3
4
5
Zn++/6 insulinulin (mol:mol)

Fig.4B

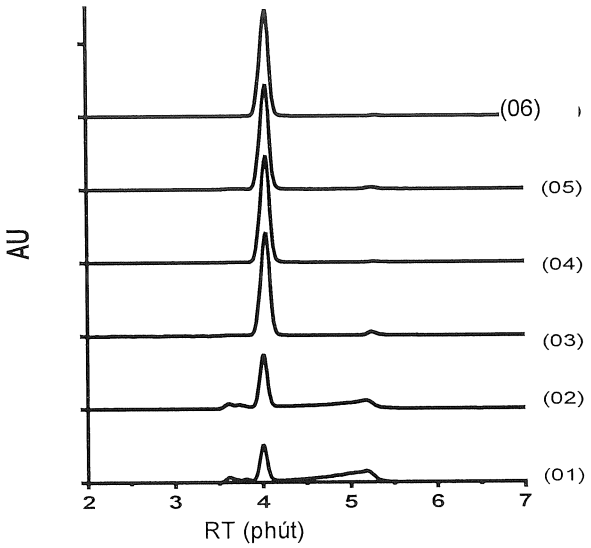

Fig 5A

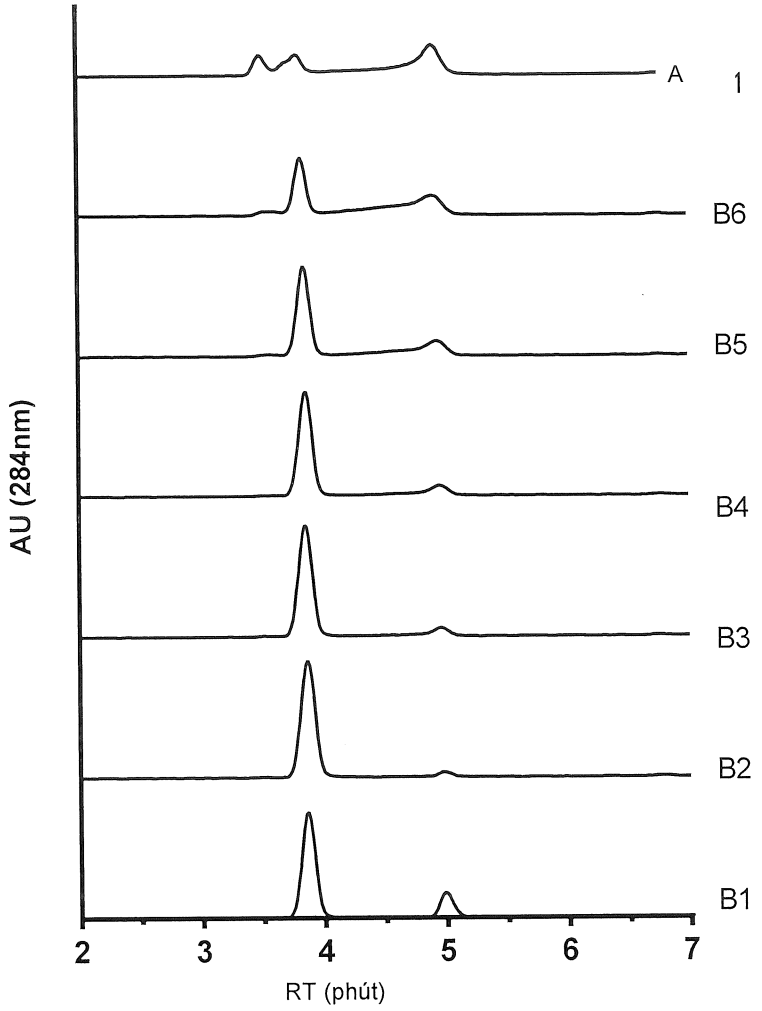

Fig.5B

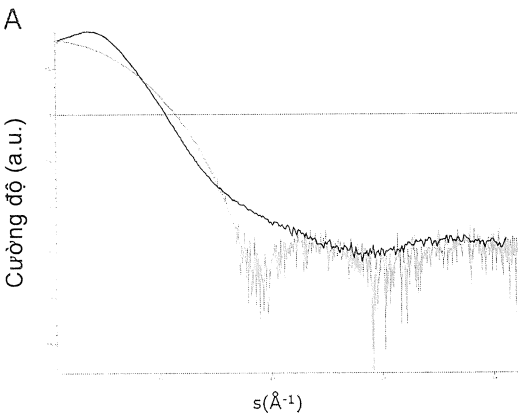

Fig.6A

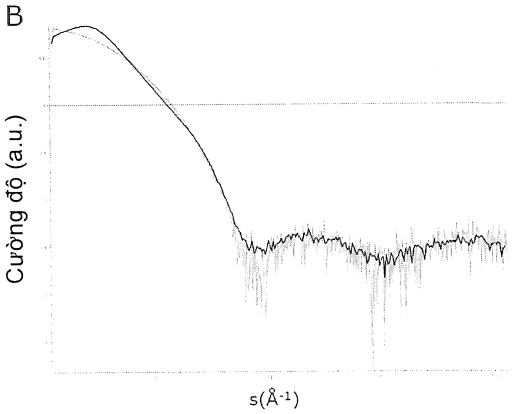

Fig.6B

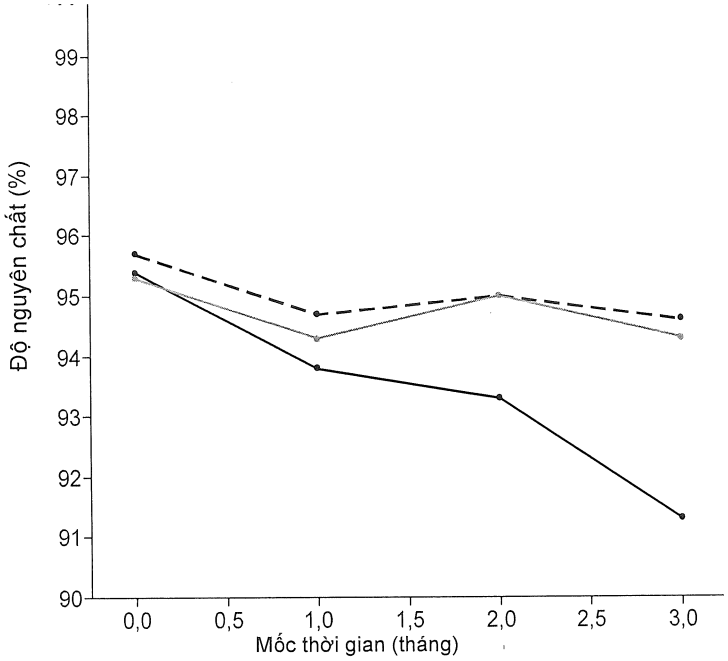
Độ nguyên chất (%)
99
98
97
96
95
94
93
92
91
90
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
Mốc thời gian (tháng)

Fig.7A

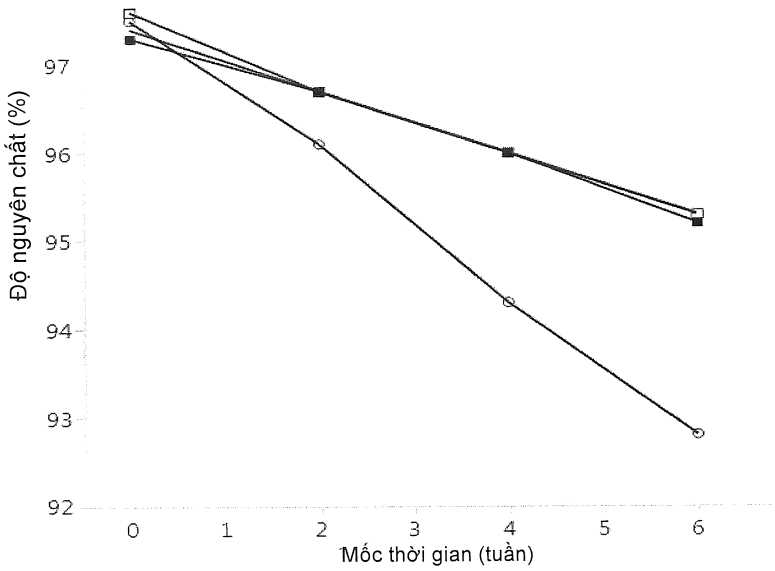

Fig.7B

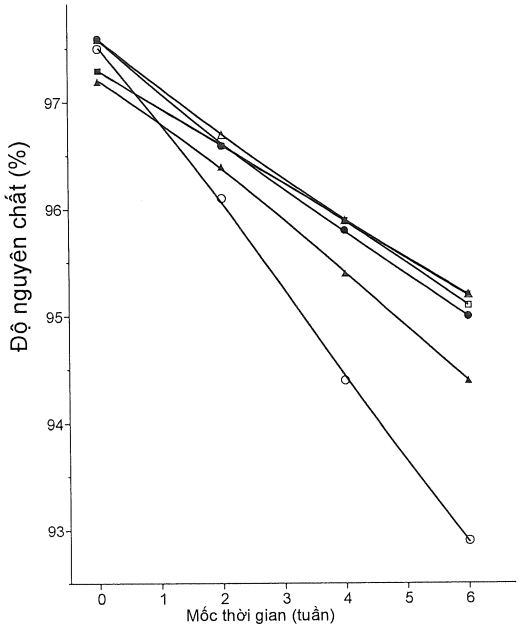

Fig.8

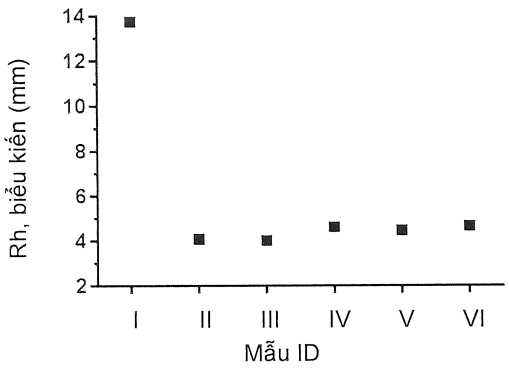
Rh, biểu kiến (mm)
14
12
10
8
6
4
2
I
II
III
IV
V
VI
Mẫu ID

Fig.9A

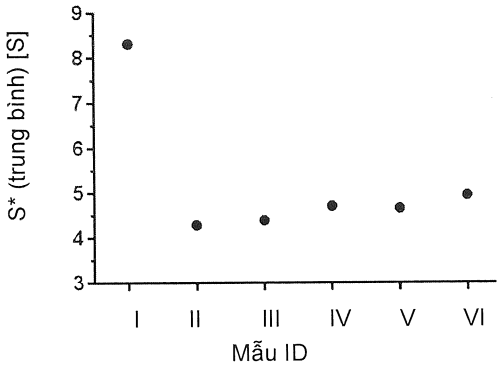
S* (trung binh) [S]
9
8
7
6
5
4
3
I
II
III
IV
V
VI
Mẫu ID

Fig.9B