



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

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

(11)



1-0023318

(51)⁷ A61K 9/08; A61K 31/4172; A61K
31/195; A61K 31/198

(13) B

(21) 1-2013-04052

(22) 01/06/2012

(86) PCT/KR2012/004369 01/06/2012

(87) WO2012/165917 06/12/2012

(30) 10-2011-0053890 03/06/2011 KR

(45) 27/04/2020 385

(43) 25/04/2014 313A

(73) LG LIFE SCIENCES LTD. (KR)

(Sinmunno 2-ga) 58, Saemunan-ro, Jongno-gu, Seoul 110-062, Republic of Korea

(72) CHOI, Suk Young (KR); KO, Youn Kyung (KR); SO, Jin Eon (KR)

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHẾ PHẨM DẠNG LÔNG CHỨA ETANERCEPT

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm dạng lông chứa etanercept (protein dung hợp p75 sTNFR:Fc tái tổ hợp) có tính ổn định khi cất giữ, và cụ thể hơn là đến chế phẩm dạng lông chứa một hoặc nhiều chất làm ổn định được chọn từ nhóm bao gồm metionin, lysin, histidin, và các muối được dung của nó với lượng đủ để làm giảm sự tạo ra sản phẩm phụ của etanercept trong khi cất giữ. Chế phẩm dạng lông theo sáng chế làm giảm một cách hiệu quả do sự tạo ra các sản phẩm phụ của etanercept và duy trì một cách ổn định các hiệu quả dược tính của nó trong khoảng thời gian cất giữ dài. Nhờ vậy, không cần phải có quá trình hoàn nguyên trước khi cung cấp, và chế phẩm vô trùng này có thể được cấp cho bệnh nhân để đảm bảo an toàn cho bệnh nhân. Do vậy, nó có thể được áp dụng cho các lĩnh vực cần điều trị bằng etanercept.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm dạng lỏng chứa etanercept (protein dung hợp p75 sTNFR:Fc tái tổ hợp), và cụ thể hơn là đến chế phẩm dạng lỏng chứa một hoặc nhiều chất làm ổn định được chọn từ nhóm bao gồm metionin, lysin, histidin, và các muối được dung của nó với lượng đủ để làm giảm các sản phẩm phụ của etanercept trong khi cất giữ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Etanercept là một chất điều biến quá trình viêm sinh học có chức năng như một chất ức chế cạnh tranh của TNF- α , gắn kết với thụ thể TNF- α của bề mặt tế bào, để ức chế các đáp ứng miễn dịch thông qua trung gian TNF- α . Etanercept là một đại phân tử có trọng lượng phân tử khoảng 150kDa, và là một homodimer của hai protein dung hợp Fc được liên kết bởi một cầu nối disulfua, mỗi protein dung hợp Fc có một thụ thể p75 TNF hòa tan của người được nối ghép với phần Fc của globulin miễn dịch của người G phân nhóm 1 (Goldenberg, Clinical Therapeutics, 21(1): 75-87, 1999; Moreland et al., Ann. Intern. Med., 130(6): 478-486, 1999).

Protein dung hợp prototypic (nguyên mẫu) này lần đầu tiên được tổng hợp vào những năm đầu 1990 bởi Bruce A. Beutler ở University of Texas Southwestern Medical Center, và của hãng Amgen dưới tên thương mại Enbrel vào năm 2002. Etanercept là một chất ức chế TNF- α dùng để điều trị bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, và bệnh viêm cột sống dính khớp, và điều trị bệnh viêm mạch trong các thử nghiệm lâm sàng, bệnh Alzheimer, và bệnh Crohn.

Cũng như các dược chất protein, các dược chất kháng thể có chu kỳ bán rã rất ngắn, và sự biến chất hoá học và vật lý có thể dễ dàng xảy ra do nhiệt độ không thuận lợi, ứng suất cắt, sự rung, sự đóng băng-tan băng, tiếp xúc với tia cực tím, sự thay đổi độ pH quá mức, các dung môi hữu cơ, và sự ô nhiễm vi sinh vật. Sự biến chất hoá học bao gồm sự phân ly dime, sự oxy hóa, sự khử amit, sự đồng phân hóa, và sự polyme hóa, chúng bị tác động bởi các axit amin cấu thành kháng thể và các điều kiện của dung môi chứa kháng thể (độ muối, độ pH và nhiệt độ).

Sự biến chất vật lý bao gồm sự mất cấu trúc bậc ba, sự kết tụ cộng hóa trị/không cộng hóa trị và sự bám dính của các monome, mà bị tác động bởi các mảng kỵ nước trên bề mặt protein bị biến đổi bởi các môi trường bao quanh chứa kháng thể như các dung môi, các cấu trúc protein phức tạp như sự phân bố điện tích, và độ bền nhiệt. Sự biến chất vật lý hoặc hoá học của kháng thể sẽ gây ra sự thất thoát các hoạt tính sinh lý học của nó. Do sự biến chất này là một quy trình không thuận nghịch, nên sau khi bị biến chất, các kháng thể không thể hồi phục được đặc tính tự nhiên của chúng về trạng thái ban đầu, dẫn đến việc làm giảm các hiệu quả trị liệu của chúng. Cũng đã có sự kết tụ của các monome gây ra các đáp ứng miễn dịch. Do đó, nhiều nghiên cứu đã và đang được thực hiện trên các chế phẩm kháng thể chứa lượng hữu hiệu sinh lý học mà không có các khối kết tụ (Ishikawa et al., Biol. Pharm. Bull., 33(8): 1413-1417, 2010; Levin et al., The Development of Therapeutic Monoclonal Antibody Products, editors. Boston (MA): BioProcess Technology Consultants, Inc, Chapter 9).

Hiện có nhiều phương pháp để ngăn ngừa sự biến chất protein trong các chế phẩm dạng lỏng. Trong một số được chất là protein, các vấn đề về độ ổn định được khắc phục bằng cách làm đông khô nhanh. Ví dụ, Patent Mỹ số 7,592,004 đề cập đến chế phẩm được làm khô nhanh chứa daclizumab được làm ổn định bằng cách sử dụng 5 tới 25mM dung dịch đệm histidin (độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5), từ 0,005 tới 0,03% chất hoạt động bề mặt không ion, polysorbat và 100 tới 300mM đường không khử, sucroza. Công bố Patent Mỹ số 2010-0158925 đề cập đến chế phẩm được làm khô nhanh chứa cetuximab được làm ổn định bằng cách sử dụng dung dịch đệm histidin và axit lactobionic. Tuy nhiên, quy trình làm đông khô nhanh tạo các ứng suất đông lạnh và làm khô như sự hình thành các tinh thể đá, thay đổi độ pH, và nồng độ cao của chất hòa tan, và các ứng suất này có thể gây ra sự biến chất kháng thể. Ngoài ra, do cần phải có thiết bị làm đông khô nhanh công suất lớn cho quy trình làm đông khô nhanh trong quá trình sản xuất, nên chi phí sản xuất cao sẽ gia tăng đối với việc sản xuất quy mô lớn. Việc hòa tan sản phẩm đã được làm khô nhanh trong môi trường nước tiệt trùng trước khi sử dụng cũng được xem như một sự bất tiện.

Một phương án khác nhằm giải quyết các hạn chế này là chất làm ổn định

được bổ sung trong các chế phẩm dạng lỏng nhằm cải thiện độ ổn định của kháng thể. Đã biết các chất hoạt động bề mặt, các albumin huyết thanh, các polysacarit, các axit amin, các polyme, các muối hoặc các chất tương tự là các chất làm ổn định cho các protein bao gồm các kháng thể (Wang, *Int. J. Pharm.*, 185: 129-188, 1999; Wang et al., *J. Pharm. Sci.*, 96(1): 1-26, 2007).

Công bố patent Mỹ số 2011-0070231 đề cập đến chế phẩm dạng lỏng ổn định của kháng thể IgG, trong đó được phẩm lỏng ổn định này chứa daclizumab với lượng lớn hơn hoặc bằng 50mg/mL trong 20 tới 60mM của dung dịch đệm succinat (độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5), từ 0,02 tới 0,04% polysorbat, và từ 75 tới 150mM natri clorua.

Công bố patent Mỹ số 2011-0020328 đề cập đến lượng hữu hiệu trị liệu của chế phẩm kháng thể kháng CD20, trong đó chế phẩm được ổn định này bao gồm từ 10 tới 100mM natri axetat, từ 25 tới 100mM natri clorua, từ 0,5 tới 5% bazơ tự do arginin, từ 0,02 tới 0,2 mM EDTA và từ 0,01 tới 0,2% polysorbat 80, và độ pH của nó nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0.

Patent Mỹ số 7,785,592 đề cập đến chế phẩm ổn định, trong đó palivizumab với lượng lớn hơn hoặc bằng 75mg/mL được làm ổn định bằng cách sử dụng dung dịch đệm histidin và glyxin mà không cần các muối ion và một chất hoạt động bề mặt, và độ ổn định của nó được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 tới 8°C trong ít nhất 15 tháng.

Patent Mỹ số 6,991,790 đề cập đến chế phẩm được trong nước ổn định, chứa một lượng hữu hiệu trị liệu của kháng thể, dung dịch đệm axetat có độ pH nằm trong khoảng từ 4,8 đến 5,5, chất hoạt động bề mặt, và rượu polyhydric mà không cần chất đẳng trương như natri clorua.

Patent Mỹ số 7,648702 đề cập đến chế phẩm dạng lỏng, trong đó protein dung hợp của thụ thể yếu tố gây hoại tử khối u p75 của người được liên kết với phần Fc của globulin miễn dịch của người G1 (IgG1) được làm ổn định bằng cách sử dụng 10 tới 200mM L-arginin làm chất ngăn ngừa sự kết tụ. Patent này đưa ra một phương án duy nhất sử dụng etanercept làm hoạt chất.

Tuy nhiên, để bào chế các chế phẩm ổn định, các chất làm ổn định thích hợp sẽ được sử dụng trên cơ sở xem xét các đặc tính vật lý của mỗi hoạt chất. Nếu

các chất làm ổn định được sử dụng kết hợp, thì sự cạnh tranh giữa chúng và các tác dụng ngược có thể dẫn đến các tác dụng không mong muốn. Ngoài ra, các nồng độ của các kháng thể sẽ phải nằm trong khoảng thích hợp để làm ổn định, và các nồng độ của chúng là tương đối cao hơn so với các nồng độ của các dược chất là protein. Do vậy, nhiều nỗ lực và giải pháp là cần thiết nhằm làm ổn định các kháng thể trong các dung dịch (Shire et al., J. Pharm. Sci., 93(6): 1390-1402, 2004).

Có một vài nghiên cứu về các chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa etanercept, và có duy nhất một phương pháp làm ổn định etanercept mà các tác giả sáng chế đã biết là sử dụng L-arginin trong chế phẩm dạng lỏng. Do đó, có nhu cầu cấp bách nhằm phát triển một chế phẩm dạng lỏng mới có thể duy trì một cách ổn định hoạt tính của etanercept trong một khoảng thời gian dài và có hiệu quả hơn về độ ổn định của etanercept so với chế phẩm đã biết chứa L-arginin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã có nhiều nỗ lực nhằm phát triển phương pháp bào chế chế phẩm dạng lỏng có khả năng duy trì một cách ổn định hoạt tính của etanercept. Kết quả là, họ đã tìm ra một hoặc nhiều chất làm ổn định được chọn từ nhóm bao gồm metionin, lysin, và histidin thể hiện tác dụng đáng kể về khả năng làm ổn định etanercept trong dung dịch, nhờ đó hoàn tất sáng chế này.

Một mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm dung dịch nước, chứa các chất làm ổn định để làm giảm sự hình thành của các sản phẩm phụ của etanercept trong khi cất giữ trong một dung dịch và duy trì hoạt tính của nó trong một khoảng thời gian dài.

Chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể ngăn ngừa một cách hiệu quả sự hình thành của các sản phẩm phụ của etanercept và duy trì một cách ổn định các hiệu quả dược tính của nó trong khoảng thời gian cất giữ dài. Do đó, không cần phải có quá trình hoàn nguyên trước khi cung cấp, và chế phẩm vô trùng này có thể được cấp cho bệnh nhân để đảm bảo an toàn cho bệnh nhân. Do vậy, nó được dự liệu để áp dụng cho các lĩnh vực đòi hỏi việc điều trị bằng etanercept.

Theo một khía cạnh để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất chế

phẩm dạng lỏng, chứa một hoặc nhiều chất làm ổn định được chọn từ nhóm bao gồm metionin, lysin, histidin, và các muối được dụng của nó.

Chế phẩm theo sáng chế có thể là chế phẩm dạng lỏng chứa etanercept chứa etanercept; và một hoặc nhiều chất làm ổn định được chọn từ nhóm bao gồm metionin, lysin, histidin, và các muối được dụng của nó.

Chế phẩm này có độ ổn định cất giữ cao bằng cách khử các sản phẩm phụ của etanercept được tạo ra do sự biến chất trong khi cất giữ.

Để làm chất làm ổn định, metionin, lysin, histidin, hoặc các muối được dụng của nó có thể có mặt trong chế phẩm với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM.

Etanercept trong chế phẩm có thể có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL.

Chế phẩm này có thể còn bao gồm một hoặc nhiều chất liệu được chọn từ nhóm bao gồm chất đệm, chất đẳng trương, tá dược, và chất bảo quản.

Chất đệm có thể được chọn từ nhóm bao gồm xitrat, phosphat, succinat, tartrat, fumarat, gluconat, oxalat, lactat, axetat, histidin, và Tris, và có thể có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM.

Chất đẳng trương có thể được chọn từ nhóm bao gồm natri clorua, kali clorua, axit boric, natri borat, manitol, glyxerin, propylen glycol, polyetylen glycol, maltoza, sucroza, erytritol, arabitol, xylitol, sorbitol, và glucoza, và có thể có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM.

Chế phẩm etanercept theo sáng chế có thể là chế phẩm dạng lỏng, chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, metionin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM.

Chế phẩm etanercept theo sáng chế có thể là chế phẩm dạng lỏng, chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, lysin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM.

Chế phẩm etanercept theo sáng chế có thể là chế phẩm dạng lỏng, chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, histidin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM.

Chế phẩm etanercept theo sáng chế có thể là chế phẩm dạng lỏng, chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, histidin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, lysin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM.

Chế phẩm etanercept theo sáng chế có thể là chế phẩm dạng lỏng, chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, histidin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, metionin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM.

Chế phẩm etanercept theo sáng chế có thể là chế phẩm dạng lỏng, chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, metionin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, lysin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn.

Sáng chế đã được chứng tỏ ở việc lần đầu tiên metionin, lysin, histidin và các muối được dụng của nó có tác dụng làm giảm sự hình thành của các sản phẩm phụ của etanercept trong dung dịch và duy trì một cách ổn định hoạt tính của nó trong khoảng thời gian cất giữ dài, và do vậy đề xuất việc dùng chúng làm các chất làm ổn định lượng hữu hiệu được phẩm của etanercept.

Để bào chế các chế phẩm ổn định, các chất làm ổn định thích hợp sẽ được sử dụng trên cơ sở xem xét các đặc tính vật lý của mỗi hoạt chất. Tùy thuộc vào sự khác nhau về loại, nồng độ, và sự kết hợp của các chất liệu được bao gồm trong chế phẩm, sự cạnh tranh giữa các chất liệu trong chế phẩm có thể dẫn đến các tác dụng không được mong muốn. Do vậy, khó có thể bào chế được một chế phẩm đặc hiệu thuộc ổn định.

Trên cơ sở các xem xét nêu trên, các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng chế phẩm dạng lỏng chứa một hoặc nhiều chất làm ổn định được chọn từ nhóm bao gồm metionin, lysin, và histidin, và các muối được dùng của nó làm tăng độ bền cất giữ của etanercept so với các chế phẩm không có các chất làm ổn định, bởi việc làm giảm các sản phẩm phụ của etanercept trong khi cất giữ trong một dung dịch.

Đặc biệt, theo một phương án của sáng chế, nhằm nghiên cứu chất làm ổn định tối ưu cho việc bào chế chế phẩm dạng lỏng ổn định của etanercept, các axit amin, các chất hoạt động bề mặt, và các polyme khác nhau được sử dụng để kiểm tra các hiệu quả làm ổn định của chúng. Kết quả là, lysin, histidin, metionin, hoặc sự kết hợp của chúng đã chứng tỏ các tác dụng rõ rệt trong việc làm ổn định etanercept bởi việc ngăn ngừa sự biến chất của nó trong khi cất giữ trong một dung dịch ở nhiệt độ cao.

Hơn thế, chế phẩm theo sáng chế đã được chỉ ra là có các hiệu quả làm ổn định etanercept tương đương hoặc cao hơn so với chế phẩm chứa L-arginin là một chế phẩm ổn định đã biết của etanercept (Patent Mỹ số 7,648,702). Cụ thể, metionin đã được chỉ ra là có tác dụng làm ổn định etanercept tốt hơn rất nhiều so với L-arginin.

Đặc biệt, các sản phẩm phụ của etanercept được tạo ra trong khi cất giữ được kiểm tra bởi phép sắc ký loại trừ kích thước (SE-HPLC: Size Exclusion-HPLC). Kết quả là, so với tổng lượng các tạp chất của chế phẩm etanercept được bào chế bằng cách sử dụng L-arginin làm chất làm ổn định theo Patent Mỹ số 7,648,702, chế phẩm được bào chế nhờ sử dụng lysin làm chất làm ổn định có hàm lượng các tạp chất tương đương, và chế phẩm được bào chế nhờ sử dụng histidin hoặc metionin làm chất làm ổn định có hàm lượng các tạp chất thấp hơn

(xem Bảng 2). Phép phân tích sắc ký tương tác kỵ nước (HI-HPLC: Hydrophobic Interaction-HPLC) cũng cho các kết quả tương tự. Những kết quả này chứng tỏ rằng histidin, lysin, và metionin ngăn ngừa sự biến chất của etanercept để ức chế sự tạo ra các sản phẩm phụ của nó (xem Bảng 3).

Do đó, chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể duy trì một cách ổn định các hiệu quả dược tính của etanercept trong một khoảng thời gian dài bởi việc làm giảm một cách hiệu quả sự hình thành của các sản phẩm phụ của etanercept.

Khi được sử dụng trong Bản mô tả, thuật ngữ "etanercept (protein dung hợp p75 sTNFR:Fc tái tổ hợp)" dùng để chỉ protetin là một dạng homodimer gồm hai protein dung hợp Fc được liên kết bởi các cầu nối disulfua, mỗi protein dung hợp Fc gồm mô-thụ thể 75 kilodalton (p75) TNF (yếu tố gây hoại tử khối u) hòa tan của người được nối ghép với phần Fc của IgG1 của người.

Đặc biệt, etanercept là một dạng homodimer gồm hai protein dung hợp Fc được liên kết bởi 3 các cầu nối disulfua, mỗi protein dung hợp Fc gồm phần gắn kết phối tử ngoại bào của thụ thể p75 TNF hòa tan của người được liên kết với phần Fc của IgG1 của người. Phần Fc của etanercept chứa vùng CH2, vùng CH3 và vùng bản lề, nhưng không gồm vùng CH1 của IgG1. Etanercept này có thể có trọng lượng phân tử khoảng 150 kilodalton (kDa). Etanercept này có thể được bán dưới tên thương mại ENBREL® (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA.), và có số CAS 185243-69-0.

Etanercept có thể được tạo ra bởi kỹ thuật tái tổ hợp ADN, nhưng không chỉ giới hạn ở kỹ thuật này.

Etanercept theo sáng chế là một chất điều biến quá trình viêm sinh học có chức năng như một chất ức chế cạnh tranh của TNF- α , gắn kết với thụ thể TNF-ở bề mặt tế bào, để ức chế các đáp ứng miễn dịch thông qua trung gian TNF- α , và được sử dụng để điều trị bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, và bệnh viêm cột sống dính khớp, và điều trị bệnh viêm mạch trong các thử nghiệm lâm sàng, bệnh Alzheimer, và bệnh Crohn.

Trong chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế, etanercept có mặt với lượng hữu hiệu trị liệu. Tốt hơn là, etanercept có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/ml.

Khi được sử dụng trong Bản mô tả, thuật ngữ "chế phẩm dạng lỏng đã làm ổn định" hoặc "chế phẩm dạng lỏng ổn định" dùng để chỉ chế phẩm duy trì được tính toàn vẹn và tính đồng nhất vật lý và hóa học của hoạt chất trị liệu, là etanercept, trong khi cất giữ trong một dung dịch. Các phép đo phân tích về độ ổn định của etanercept có thể được thực hiện bởi thử nghiệm độ ổn định protein đã được áp dụng rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này. Độ ổn định có thể được đo ở một nhiệt độ được định trước trong một khoảng thời gian được định trước. Để thử nghiệm nhanh, chế phẩm có thể được cất giữ ở một nhiệt độ cao hoặc "được tăng cao", ví dụ, 40°C trong 2 tuần tới 1 tháng hoặc lâu hơn, và độ ổn định phụ thuộc thời gian của nó được đo tại thời điểm này.

Khi được sử dụng trong Bản mô tả, thuật ngữ "chất làm ổn định" dùng để chỉ một chất hóa học đặc thù có tương tác với phân tử sinh học và/hoặc tá dược chung trong chế phẩm để cải thiện độ ổn định của nó. Nói chung, chất làm ổn định bảo vệ cho các protein không bị các ứng suất gây ra bởi bề mặt chung không khí/dung dịch và ứng suất gây ra bởi dung dịch/bề mặt do sự biến chất protein. Theo sáng chế này, chất làm ổn định là một là một thành phần làm giảm sự hình thành của các sản phẩm phụ của etanercept trong khi cất giữ trong một dung dịch để duy trì hoạt tính của nó trong một khoảng thời gian dài, và tốt hơn là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm metionin, lysin, histidin và các muối được dụng của nó.

Để làm các axit amin, cả dạng L lẫn dạng D đều được bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Không chỉ các axit amin như metionin, lysin, và histidin, mà cả các chất tương tự, các solvat, các hydrat và các chất đồng tách thể, và các muối được dụng của nó đều nằm trong phạm vi của sáng chế miễn là chúng có tác dụng gần như tương đương.

Khi được sử dụng trong Bản mô tả, thuật ngữ "muối được dụng" dùng để chỉ các hợp chất được điều chế dưới dạng các muối của các axit amin, như metionin, lysin, và histidin, nằm trong khoảng lưu giữ các chức năng của chúng như các chất làm ổn định theo sáng chế. Đặc biệt, nó có thể tạo ra một muối bằng cách cộng axit, và ví dụ, nó có thể tạo ra muối với một axit vô cơ (ví dụ, axit clohydric, axit hydrobromic, axit phosphoric, axit nitric, axit sulphuric, v.v.), các

axit carboxylic hữu cơ (ví dụ, axit axetic, axit halo axetic như axit trifloaxetic, axit propionic, axit maleic, axit succinic, axit malic, axit xitric, axit tartric, axit salixylic), các đường axit (axit glucuronic, axit galacturonic, axit gluconic, axit ascorbic), các polysacarit có tính axit (ví dụ, axit hyaluronic, chondroitin sulfat, arginin axit), các axit sulfonic hữu cơ bao gồm đường este của axit sulfonic như chondroitin sulfat (ví dụ, axit metan sulfonic, axit p-toluen sulfonic).

Khi được sử dụng trong Bản mô tả, thuật ngữ "các chất tương tự" dùng để chỉ các hợp chất có các chức năng tương tự như các axit amin, như metionin, lysin, và histidin, được sử dụng làm các chất làm ổn định theo sáng chế. Theo sáng chế này, các axit amin như metionin, lysin, và histidin sẽ bao gồm các chất tương tự của chúng. Theo sáng chế này, các ví dụ về các chất tương tự có thể bao gồm các chất tương tự metionin, tức là, selenometionin, axit hydroxy methyl butanoic, ethionin, và triflometionin, nhưng không chỉ giới hạn trong số này.

Khi được sử dụng trong Bản mô tả, thuật ngữ "các sản phẩm phụ" dùng để chỉ các sản phẩm không được mong muốn làm suy giảm tỷ lệ của hoạt chất trị liệu, là etanercept, trong chế phẩm. Các sản phẩm phụ tiêu biểu bao gồm "các sản phẩm có trọng lượng phân tử thấp" được tạo ra do sự biến chất của etanercept bởi sự khử amin hoặc sự thủy phân, của các "sản phẩm có trọng lượng phân tử cao" như các oligome và các kết tập, hoặc hỗn hợp của chúng.

Khi được sử dụng trong Bản mô tả, thuật ngữ "sản phẩm có trọng lượng phân tử cao" bao gồm các mảnh etanercept mà sau đó kết tụ do sự biến chất (ví dụ, được tạo ra bởi sự thoái biến polypeptit do sự khử amin hoặc sự thủy phân) hoặc hỗn hợp của chúng. Thông thường, các sản phẩm có trọng lượng phân tử cao là các phức chất có trọng lượng phân tử cao hơn so với monome trị liệu là etanercept, và có thể có trọng lượng phân tử trên khoảng 150 kDa.

Khi được sử dụng trong Bản mô tả, thuật ngữ "các sản phẩm có trọng lượng phân tử thấp" bao gồm, ví dụ, các polypeptit trị liệu được tạo ra bởi sự khử amin hoặc sự thủy phân, tức là, các mảnh etanercept. Thông thường, các sản phẩm có trọng lượng phân tử thấp là các phức chất có trọng lượng phân tử thấp hơn so với monome trị liệu là etanercept, và có thể có trọng lượng phân tử dưới khoảng 150 kDa.

Chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế chứa một hoặc nhiều chất làm ổn định được chọn từ nhóm bao gồm metionin, lysin, histidin, và các muối được dụng của nó. Đặc biệt, chế phẩm dạng lỏng bao gồm metionin, lysin, hoặc histidin làm chất làm ổn định, hoặc hai chất làm ổn định như metionin và lysin, metionin và histidin, hoặc lysin và histidin, hoặc ba chất làm ổn định như metionin, lysin, và histidin. Trong chế phẩm bao gồm sự kết hợp của các axit amin nêu trên, các muối được dụng của metionin, lysin, histidin một cách tương ứng có thể được tiếp vào, hoặc metionin, lysin, và histidin có thể ở các dạng được cải biến của các muối được dụng một cách tương ứng. Tốt hơn, nếu chế phẩm dạng lỏng chứa chất làm ổn định là metionin, lysin, histidin, metionin và lysin, metionin và histidin, hoặc lysin và histidin, và tốt hơn nữa là metionin.

Metionin là một axit amin không thay thế, và có công thức hóa học $C_5H_{11}NO_2S$ và trọng lượng phân tử là 149,21. Metionin là một axit amin không phân cực, và chứa nhóm thioete ($-S-CH_3$) ở mạch bên của nó. Nó có trị số pK_1 bằng 2,28, trị số pK_2 bằng 9,21, và trị số điểm đẳng điện (PI) bằng 5,74. Metionin ngăn chặn sự oxy hóa của các kháng thể trong các chế phẩm dạng lỏng để làm ổn định các kháng thể bởi việc cạnh tranh với các gốc metionin trong các kháng thể để phản ứng với các gốc hydroxyl tự do (Lam et al., J. Pharm. Sci., 86(11): 1250-1255, 1997; Wang, Int. J. Pharm., 185: 129-188, 1999).

Lysin là một axit amin không thay thế, và có công thức hóa học $C_6H_{14}N_2O_2$ và trọng lượng phân tử là 146,19. Lysin là một axit amin cơ bản, và có trị số pK_1 bằng 2,18, trị số pK_2 bằng 8,95, trị số pK_3 bằng 10,53 và trị số PI bằng 9,74.

Histidin là một axit amin không thay thế có nhóm chức imidazol có điện tích dương ở mạch bên của nó, và có công thức hóa học $C_6H_9N_3O_2$ và trọng lượng phân tử là 155,15. Histidin là một axit amin cơ bản, và có trị số pK_1 bằng 1,82, trị số pK_2 bằng 9,17, trị số pK_3 bằng 6,0 và trị số PI bằng 7,59.

Trái lại, L-arginin có trong chế phẩm thương mại đã biết của etanercept là một axit amin không thay thế, và có công thức hóa học $C_6H_{14}N_4O_2$ và trọng lượng phân tử là 174,2. Arginin là một axit amin cơ bản, và có trị số pK_1 bằng 2,17, trị số pK_2 bằng 9,04, trị số pK_3 bằng 12,48 và trị số PI bằng 10,76. Cụ thể là, metionin, lysin, và histidin được sử dụng làm chất làm ổn định theo sáng chế là

hoàn toàn khác với arginin là một chất làm ổn định đã biết cho etanercept về cấu trúc, công thức hoá học, các đặc tính vật lý, và xu hướng ion hoá. Sáng chế đề xuất lần đầu tiên việc các axit amin như metionin, lysin, và histidin là các chất làm ổn định thích hợp cho etanercept.

Hàm lượng của chất làm ổn định trong chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 100mM, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5 đến 50mM.

Chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể còn bao gồm chất liệu bất kỳ thường có mặt trong các chế phẩm dược chất là protein hoặc các dược chất kháng thể để làm tăng độ ổn định của etanercept tùy thuộc vào một hoặc nhiều chất làm ổn định được chọn từ nhóm bao gồm metionin, lysin, histidin, và các muối được dụng của nó trừ khi chúng làm thoái biến chức năng theo sáng chế. Ví dụ, L-arginin đã biết là một chất làm ổn định cho etanercept có thể được bổ sung vào chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế.

Chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể còn bao gồm chất đệm ngoài chất làm ổn định. Khi được sử dụng trong Bản mô tả, thuật ngữ "chất đệm" dùng để chỉ thành phần cải thiện tính đẳng trương và độ bền hóa học của của chế phẩm, và có chức năng duy trì độ pH thích hợp về mặt sinh lý học. Chất đệm ngăn không cho chế phẩm dạng lỏng bị thay đổi độ pH một cách nhanh chóng để duy trì độ pH của dung dịch để làm ổn định cho etanercept. Các ví dụ được ưu tiên về chất đệm bao gồm xitrat, phosphat, succinat, tartrat, fumarat, gluconat, oxalat, lactat, axetat, histidin, và Tris, nhưng không chỉ giới hạn trong số này. Theo một phương án cụ thể, chất đệm là dung dịch đệm phosphat. Chất đệm có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng kết hợp của hai hoặc nhiều chất.

Theo các phương án khác nhau theo sáng chế, chế phẩm sẽ phải có độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7,5 hoặc độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,8. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,6. Các khoảng nằm giữa các khoảng độ pH nêu trên, ví dụ, khoảng độ pH từ 5,2 đến 6,4 (ví dụ, độ pH = 6,2) cũng được dự liệu cấu thành một phương án theo sáng chế. Ví dụ, các khoảng giá trị sử dụng tổ hợp của bất kỳ trong số các trị số nêu trên là các giới hạn trên và/hoặc giới hạn dưới là được dự liệu để bao gồm trong

phạm vi của sáng chế. Nếu cần, độ pH có thể được điều chỉnh bởi kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, độ pH có thể được điều chỉnh tới khoảng mong muốn bất kỳ bằng cách bổ sung HCl hoặc bằng cách bổ sung histidin, nếu cần.

Theo một phương án khác, chất đệm có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 50mM, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5 đến 25mM. Các khoảng nằm giữa các nồng độ nêu trên cũng được dự liệu là một phần của sáng chế. Ví dụ, các khoảng nồng độ sử dụng tổ hợp của bất kỳ trong số các nồng độ nêu trên là các giới hạn trên và/hoặc giới hạn dưới là được dự liệu để bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Theo một phương án cụ thể, chất đệm sẽ có mặt với lượng đủ để duy trì độ pH thỏa đáng về mặt sinh lý học.

Chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể còn bao gồm chất đẳng trương ngoài chất làm ổn định. Khi được sử dụng trong Bản mô tả, thuật ngữ "chất đẳng trương" dùng để chỉ thành phần có chức năng duy trì một phần tính đẳng trương của chế phẩm và mức protein, và một phần duy trì mức, tỷ lệ, hoặc hàm lượng phần trăm của polypeptit có hoạt tính trị liệu có mặt trong chế phẩm. Chất đẳng trương có áp suất thẩm thấu giống như của huyết tương, và vì vậy có thể xâm nhập qua đường tĩnh mạch vào đối tượng mà không làm thay đổi áp suất thẩm thấu của huyết tương của đối tượng. Thực vậy, theo một phương án của sáng chế, chất đẳng trương có mặt với lượng đủ để làm cho chế phẩm thích hợp để xâm nhập qua đường tĩnh mạch. Thường là, chất đẳng trương còn có tác dụng như một chất đệm. Như vậy, chất đẳng trương có thể cho phép protein vượt qua các ứng suất khác nhau như đóng đông và cắt.

Chất đẳng trương có tác dụng duy trì áp suất thẩm thấu thích hợp trong cơ thể, khi etanercept trong dung dịch được cấp vào cơ thể. Các ví dụ về chất đẳng trương có thể bao gồm các chất thường được sử dụng như natri clorua, kali clorua, axit boric, natri borat, manitol, glyxerin, propylen glycol, polyetylen glycol, maltoza, sucroza, erytritol, arabitol, xylitol, sorbitol, và glucoza, nhưng không chỉ giới hạn trong số này. Theo một phương án cụ thể, chất đẳng trương là NaCl. Các chất đẳng trương này có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng kết hợp của hai hoặc nhiều trong số chúng.

Theo một phương án khác nữa, chất đẳng trương (ví dụ, NaCl) có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 500mM, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50 đến 250mM. Các khoảng nằm giữa các nồng độ nêu trên cũng được dự liệu là một phần của sáng chế. Ví dụ, các khoảng nồng độ sử dụng tổ hợp của bất kỳ trong số các nồng độ nêu trên là các giới hạn trên và/hoặc giới hạn dưới là được dự liệu để bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Chất đẳng trương cần được có mặt với lượng đủ để duy trì sự thẩm thấu của chế phẩm.

Chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể còn bao gồm tá dược được dụng, và các ví dụ về tá dược này có thể bao gồm đường và các rượu polyhydric, các chất hoạt động bề mặt, các polyme hoặc tương tự. Các ví dụ về đường và các rượu polyhydric có thể bao gồm sucroza, trehaloza, lactoza, maltoza, galactoza, manitol, sorbitol, glyxerol, các ví dụ về các chất hoạt động bề mặt có thể bao gồm các chất hoạt động bề mặt không ion như polysorbat 20, polysorbat 80, và poloxamer, và Các ví dụ về các polyme có thể bao gồm dextran, polyetylen glycol, carboxyl metylxenluloza, axit hyaluronic, và xyclodextrin.

Chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể còn bao gồm chất bảo quản. Chất bảo quản chỉ một chất hóa học được bổ sung vào các chế phẩm được chất kháng khuẩn. Các ví dụ về chất bảo quản có thể bao gồm benzalkoni clorua, benzetonium, chlorhexidin, phenol, m-crezol, rượu benzyl, metylparaben, propylparaben, clorobutanol, o-crezol, p-crezol, cloro-cresol, phenylmercuric nitrat, thimerosal, và axit benzoic, nhưng không chỉ giới hạn trong số này. Các chất bảo quản này có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng kết hợp của hai hoặc nhiều trong số chúng.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, metionin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM. Đặc biệt hơn, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, metionin hoặc các muối được dụng của

nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 500mM, ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,6.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, histidin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM. Đặc biệt hơn, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, histidin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 500mM, ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,6.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, lysin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM. Đặc biệt hơn, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, lysin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 500mM, ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,6.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, histidin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, lysin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM. Đặc biệt hơn, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, histidin hoặc các muối được dụng

của nó với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 50mM, lysin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 500mM, ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,6.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, histidin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, metionin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM. Đặc biệt hơn, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, histidin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 50mM, metionin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 500mM, ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,6.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, metionin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, lysin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 250mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 1000mM. Đặc biệt hơn, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm dạng lỏng ổn định chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/mL, metionin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 50mM, lysin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 50mM, chất đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 500mM, ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,6.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh mà etanercept có hiệu quả trị liệu cho nó. Etanercept là chất điều biến quá trình viêm sinh học để ức chế các đáp ứng miễn dịch thông qua trung gian TNF- α , và chế

phẩm theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh viêm mạch, bệnh Alzheimer, hoặc bệnh Crohn, nhưng không chỉ giới hạn trong số này. Chế phẩm theo sáng chế có thể được cấp qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa, tức là dưới da, trong cơ, trong màng bụng, trong ổ bụng, qua da, và/hoặc trong tĩnh mạch, nhưng không chỉ giới hạn trong số này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp nâng cao độ ổn định của etanercept bằng cách sử dụng chế phẩm dạng lỏng chứa một hoặc nhiều chất làm ổn định được chọn từ nhóm bao gồm metionin, lysin, histidin, và các muối được dùng của nó.

Chế phẩm dạng lỏng có thể làm tăng độ bền cất giữ của etanercept bởi việc làm giảm các sản phẩm phụ của etanercept tạo ra do sự biến chất trong khi cất giữ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng cách viện dẫn tới các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và sáng chế không được dự liệu để bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1

Thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm etanercept trong nước tùy thuộc vào việc bổ sung chất làm ổn định

Để nghiên cứu chất làm ổn định tối ưu cho việc bào chế chế phẩm trong nước ổn định của etanercept, chất làm ổn định là histidin được bổ sung vào dung dịch phosphat 5mM mà etanercept đã được bổ sung vào đó với nồng độ 50mg/mL, và natri clorua được bổ sung vào đó để làm chất đẳng trương để bào chế Chế phẩm 1.

Ngoài ra, etanercept được bổ sung vào dung dịch phosphat 10mM với nồng độ 50mg/mL, và natri clorua được bổ sung vào đó để làm chất đẳng trương. Sau đó, mỗi trong số lysin, arginin, metionin, glyxin, polysorbat 20, polysorbat 80, poloxamer 188, propylen glycol, protamin sulfat, sucroza, và guanidin HCl được

bổ sung vào để bào chế các Chế phẩm từ 2 tới 12.

Sau cùng, natri clorua dùng làm chất đẳng trương được bổ sung vào dung dịch phosphat 10mM mà etanercept được bổ sung vào đó với nồng độ 50mg/mL để bào chế chế phẩm không có chất làm ổn định. Thành phần chất làm ổn định của các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây. Mỗi 0,5mL chế phẩm đã bào chế được để trong các bơm tiêm bằng thủy tinh loại 1,0mL, đậy kín, và cất giữ ở 50°C.

Bảng 1

	Thành phần chất làm ổn định
Chế phẩm 1	Histidin 10mM
Chế phẩm 2	Lysin 25mM
Chế phẩm 3	Arginin 25mM
Chế phẩm 4	Metionin 25mM
Chế phẩm 5	Glyxin 1%
Chế phẩm 6	Tween 20 0,1%
Chế phẩm 7	Tween 80 0,1%
Chế phẩm 8	F68 0,1%
Chế phẩm 9	Propylen glycol 0,1%
Chế phẩm 10	Protamin sulfat 0,03%
Chế phẩm 11	Sucroza 2%
Chế phẩm 12	Guanidin HCl 0,2%
Chế phẩm không có chất làm ổn định	-

Ở ngày thứ bảy sau khi cất giữ ở 50°C, các Chế phẩm từ 1 tới 12 và Chế phẩm không có chất làm ổn định trong Bảng 1 được phân tích bằng SE-HPLC để kiểm tra các loại của các sản phẩm có trọng lượng phân tử thấp và các sản phẩm có trọng lượng phân tử cao như các oligome và các kết tập được tạo ra do sự biến chất của etanercept, và tổng lượng của các sản phẩm này được thể hiện là tổng lượng tạp chất. Ngoài ra, sự thay đổi cấu trúc của etanercept được kiểm tra bằng HI-HPLC. trong HI-HPLC, các chất liên quan tới etanercept tách thành 4 pic, bao gồm Pic trước, Pic 1, Pic 2, và Pic 3. Pic trước và Pic 1 thể hiện cho các sản phẩm có trọng lượng phân tử thấp, Pic 2 là etanercept, và Pic 3 là các đime có hoạt tính hay sự kết tụ thấp. Do vậy, tổng lượng Pic trước, Pic 1, và Pic 3 được thể hiện là tổng lượng tạp chất. Các kết quả lần lượt được thể hiện trong các Bảng 2 và 3.

Bảng 2

	Tổng lượng tạp chất theo SE-HPLC (%)	
	Ngày 0	Ngày 7
Chế phẩm 1	4,6	22,2
Chế phẩm 2	4,7	24,8
Chế phẩm 3	4,6	24,2
Chế phẩm 4	4,6	20,8
Chế phẩm 5	4,6	28,5
Chế phẩm 6	4,7	29,4
Chế phẩm 7	4,6	29,0
Chế phẩm 8	4,6	28,8
Chế phẩm 9	4,7	27,8
Chế phẩm 10	4,6	29,4
Chế phẩm 11	4,8	28,4
Chế phẩm 12	4,7	27,5
Chế phẩm không có chất làm ổn định	4,7	30,2

Bảng 3

	Tổng lượng tạp chất theo HI-HPLC (%)	
	Ngày 0	Ngày 7
Chế phẩm 1	14,7	33,7
Chế phẩm 2	14,6	34,9
Chế phẩm 3	15,0	34,3
Chế phẩm 4	15,2	30,3
Chế phẩm 5	14,8	36,6
Chế phẩm 6	15,2	35,5
Chế phẩm 7	15,2	36,2
Chế phẩm 8	15,4	35,5
Chế phẩm 9	15,2	35,1
Chế phẩm 10	15,0	36,9
Chế phẩm 11	14,9	35,1
Chế phẩm 12	15,1	34,8
Chế phẩm không có chất làm ổn định	14,4	41,9

Như được thể hiện bằng các kết quả SE-HPLC trong Bảng 2, khi cất giữ ở 50°C trong 7 ngày, Chế phẩm 1 chứa histidin làm chất làm ổn định có tổng lượng tạp chất là 22,2%, Chế phẩm 2 chứa lysin làm chất làm ổn định có tổng lượng tạp chất là 24,8%, Chế phẩm 3 chứa arginin làm chất làm ổn định có tổng lượng tạp chất là 24,2%, Chế phẩm 4 chứa metionin làm chất làm ổn định có tổng lượng tạp chất là 20,8%. Tất cả chúng đều có tổng lượng tạp chất thấp hơn đáng kể khi so với Chế phẩm không có chất làm ổn định có tổng lượng tạp chất là 30,2%. Khi các chế phẩm này được so sánh với Chế phẩm 3 sử dụng L-arginin làm chất làm

ổn định (Patent Mỹ số 7,648,702), Chế phẩm 2 chứa lysin có tổng lượng tạp chất tương đương là 24,8%, và Chế phẩm 1 chứa histidin và Chế phẩm 4 chứa metionin lần lượt có tổng lượng tạp chất là 22,2% và 20,8%.

Các kết quả HI-HPLC trong Bảng 3 là tương tự với các kết quả SE-HPLC. Chế phẩm không có chất làm ổn định có tổng lượng tạp chất là 41,9%. Trái lại, việc mỗi Chế phẩm 1, 2, 3, và 4 lần lượt có tổng lượng tạp chất là 33,7%, 34,9%, 34,3%, và 30,3% chứng tỏ rằng histidin, lysin, L-arginin, và metionin được bổ sung trong mỗi chế phẩm đều có tác dụng ngăn ngừa sự biến chất của etanercept. Cụ thể, việc Chế phẩm 4 chứa metionin có tổng lượng tạp chất thấp nhất, chứng tỏ rằng metionin có hiệu quả nhất trong việc làm ổn định etanercept.

Do đó, sáng chế đã chứng tỏ rằng lysin, histidin, và metionin có các tác dụng làm ổn định etanercept bởi việc ngăn ngừa sự biến chất của nó, tương đương hoặc cao hơn so với L-arginin, và cụ thể, metionin là có hiệu quả làm ổn định etanercept hơn so với L-arginin.

Ví dụ 2

Thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm etanercept trong nước tùy thuộc vào nồng độ metionin

Để nghiên cứu nồng độ tối ưu của metionin để làm ổn định etanercept, 120mM natri clorua được bổ sung vào các dung dịch phosphat 10mM, và mỗi 25mM và 12,5mM metionin được bổ sung vào đó, tiếp đó, etanercept với nồng độ 50mg/mL cũng được bổ sung vào để bào chế các Chế phẩm 13 và 14, một cách tương ứng. Theo việc bào chế chế phẩm etanercept trong nước thương phẩm, 25mM L-arginin được bổ sung vào natri clorua 100mM và 1% sucroza trong dung dịch phosphat 10mM, và etanercept được bổ sung vào với nồng độ 50mg/mL để bào chế chế phẩm đối chứng. Mỗi 0,5mL chế phẩm được để trong các bơm tiêm bằng thủy tinh loại 1,0mL, đậy kín, và cất giữ ở 40°C, 25°C và 4°C. Thành phần của các chế phẩm trong nước đã bào chế được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

	Thành phần
Chế phẩm 13	Etanercept 50mg/mL, dung dịch phosphat 10mM, NaCl 120mM, metionin 25mM (độ pH=6,3)

Chế phẩm 14	Etanercept 50mg/mL, dung dịch phosphat 10mM, NaCl 120mM, metionin 12,5mM (độ pH=6,3)
Đối chứng	Etanercept 50mg/mL, dung dịch phosphat 25mM, NaCl 100mM, sucroza 1%, L-arginin 25mM (độ pH=6,3)

Sau khi Chế phẩm 13, Chế phẩm 14, và chế phẩm đối chứng được cất giữ ở 40°C trong 1 và 3 tuần, và ở 25°C và 4°C trong mỗi 4 và 8 tuần, tổng lượng tạp chất của chúng được đo được bằng SE-HPLC và HI-HPLC, như ở Ví 1. Các kết quả lần lượt được thể hiện trong các Bảng 5 và 6.

Bảng 5

	Tổng lượng tạp chất theo SE-HPLC (%)								
	40°C			25°C			4°C		
	0 tuần	1 tuần	3 tuần	0 tuần	4 tuần	8 tuần	0 tuần	4 tuần	8 tuần
Chế phẩm 13	5,5	11,5	20,5	5,5	14,8	18,8	5,5	8,8	10,2
Chế phẩm 14	5,5	12,5	22,0	5,5	16,0	19,9	5,5	8,9	10,5
Đối chứng	5,5	13,4	23,3	5,5	16,2	20,4	5,5	8,8	10,3

Bảng 6

	Tổng lượng tạp chất theo HI-HPLC (%)								
	40°C			25°C			4°C		
	0 tuần	1 tuần	3 tuần	0 tuần	4 tuần	8 tuần	0 tuần	4 tuần	8 tuần
Chế phẩm 13	10,0	15,9	21,6	10,0	15,3	18,5	10,0	11,0	11,9
Chế phẩm 14	9,9	17,0	23,3	9,9	16,7	19,8	9,9	11,3	11,6
Đối chứng	10,2	18,0	25,5	10,2	17,4	20,6	10,2	10,0	11,9

Như được thể hiện bằng các kết quả trong các Bảng 5 và 6, Chế phẩm 13 và Chế phẩm 14 chứa chất làm ổn định là metionin thể hiện sự tạo tạp chất thấp trong tất cả các điều kiện cất giữ 40°C, 25°C và 4°C, khi so với nhóm chế phẩm đối chứng được bào chế theo phương pháp bào chế chế phẩm etanercept trong nước thương phẩm. Đặc biệt, các kết quả SE-HPLC và HI-HPLC cho thấy rằng Chế phẩm 13 chứa 25mM metionin và Chế phẩm 14 chứa 12,5mM metionin thể hiện sự tạo tạp chất thấp hơn ở 40°C và 3 tuần, và ở 25°C và 8 tuần, và sự tạo tạp chất tương đương ở 4°C và 8 tuần, khi được so sánh với chế phẩm đối chứng. Những kết quả này chứng tỏ rằng chế phẩm chứa metionin theo sáng chế là một

chế phẩm ổn định hơn để duy trì hoạt tính etanercept trong một khoảng thời gian dài so với chế phẩm thương phẩm.

Kết luận là, sáng chế đã chứng tỏ rằng chế phẩm etanercept trong nước chứa metionin ngăn ngừa sự biến chất của etanercept để duy trì hoạt tính của nó trong một khoảng thời gian dài, và metionin là rất có hiệu quả để làm chất làm ổn định trong chế phẩm etanercept trong nước.

Ví dụ 3

Thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm etanercept trong nước chứa histidin và lysin, hoặc histidin và metionin

Histidin 5mM và lysin 25mM làm chất làm ổn định được bổ sung vào dung dịch phosphat 10mM mà etanercept đã được bổ sung vào đó với nồng độ 50mg/mL, và natri clorua được bổ sung vào đó để làm chất đẳng trương để bào chế Chế phẩm 15.

Ngoài ra, Histidin 5mM và metionin 25mM làm chất làm ổn định được bổ sung vào dung dịch phosphat 10mM mà etanercept đã được bổ sung vào đó với nồng độ 50mg/mL, và natri clorua được bổ sung vào đó để làm chất đẳng trương để bào chế Chế phẩm 16.

Sau cùng, natri clorua làm chất đẳng trương được bổ sung vào dung dịch phosphat 10mM và etanercept được bổ sung vào đó với nồng độ 50mg/mL để bào chế chế phẩm không có chất làm ổn định.

Mỗi 0,5mL chế phẩm đã bào chế được để trong các bơm tiêm bằng thủy tinh loại 1,0mL, đậy kín, và cất giữ ở 50°C.

Thành phần chất làm ổn định của các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

	Thành phần chất làm ổn định
Chế phẩm 15	Histidin 5mM + Lysin 25mM
Chế phẩm 16	Histidin 5mM + Metionin 25mM
Chế phẩm không có chất làm ổn định	-

Ở ngày thứ bảy sau khi cất giữ ở 50°C, các Chế phẩm 15, 16 và Chế phẩm

không có chất làm ổn định trong Bảng 7 được phân tích bằng SE-HPLC như ở Ví dụ 1 để xác định tổng lượng tạp chất của chúng. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8

	Tổng lượng tạp chất theo SE-HPLC (%)	
	0 ngày	7 ngày
Chế phẩm 15	4,7	21,5
Chế phẩm 16	4,7	20,9
Chế phẩm không có chất làm ổn định	4,7	30,2

Như được thể hiện bằng các kết quả SE-HPLC trong Bảng 8, khi cất giữ ở 50°C trong 7 ngày, Chế phẩm 16 chứa histidin làm chất làm ổn định có tổng lượng tạp chất là 21,5%, và có tổng lượng tạp chất thấp hơn đáng kể, khi được so sánh với Chế phẩm không có chất làm ổn định có tổng lượng tạp chất là 30,2%. Và Chế phẩm 16 s có tổng lượng tạp chất thấp hơn đáng kể, khi được so sánh với Chế phẩm 1 chứa 10mM histidin có tổng lượng tạp chất là 22,2%, và Chế phẩm 2 chứa lysin 25mM có tổng lượng tạp chất là 24,8%.

Tức là, sáng chế đã chứng tỏ rằng chế phẩm chứa histidin và lysin có các tác dụng mỹ mãn đáng kể để ngăn ngừa sự biến chất của etanercept bởi việc làm giảm tổng lượng tạp chất khi cất giữ, khi được so sánh với Chế phẩm không có chất làm ổn định và mỗi chế phẩm chứa histidin, lysin, và metionin một cách tương ứng.

Ngoài ra, như được thể hiện bằng các kết quả SE-HPLC trong Bảng 8, khi cất giữ ở 50°C trong 7 ngày, Chế phẩm 16 chứa histidin làm chất làm ổn định có tổng lượng tạp chất là 20,9%, thấp hơn đáng kể, khi được so sánh với Chế phẩm không có chất làm ổn định có tổng lượng tạp chất là 30,2%. Cụ thể, Chế phẩm 16 có tổng lượng tạp chất thấp hơn so với Chế phẩm 15 chứa histidin và lysin làm chất làm ổn định.

Tức là, sáng chế đã chứng tỏ rằng chế phẩm chứa histidin và metionin có tác dụng đáng kể tới việc ngăn ngừa sự biến chất của etanercept bởi việc làm giảm tổng lượng tạp chất khi cất giữ, so với Chế phẩm không có chất làm ổn định.

Ví dụ 4

Thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm etanercept trong nước chứa metionin và lysin

Metionin 12,5mM và lysin 12,5mM làm chất làm ổn định được bổ sung vào dung dịch phosphat 10mM mà etanercept được bổ sung vào đó với nồng độ 50mg/mL, và natri clorua được bổ sung vào đó để làm chất đẳng trương để bào chế chế phẩm 17.

Ngoài ra, natri clorua làm chất đẳng trương được bổ sung vào dung dịch phosphat 10mM và etanercept được bổ sung vào đó với nồng độ 50mg/mL để bào chế chế phẩm không có chất làm ổn định.

Mỗi 0,5mL chế phẩm đã bào chế được để trong các bơm tiêm bằng thủy tinh loại 1,0mL, đậy kín, và cất giữ ở 50°C. Các thành phần chất làm ổn định của các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 9 dưới đây.

Bảng 9

	Thành phần chất làm ổn định
Chế phẩm 17	Metionin 12,5mM +Lysin 12,5mM
Chế phẩm không có chất làm ổn định	-

Ở ngày thứ bảy sau khi cất giữ ở 50°C, Chế phẩm 17, và Chế phẩm không có chất làm ổn định trong Bảng 9 được phân tích bằng SE-HPLC như ở Ví dụ 1 để xác định tổng lượng tạp chất của chúng. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 10.

Bảng 10

	Tổng lượng tạp chất theo SE-HPLC (%)	
	0 ngày	7 ngày
Chế phẩm 17	5,2	27,0
Chế phẩm không có chất làm ổn định	5,2	32,8

Như được thể hiện bằng các kết quả SE-HPLC trong Bảng 10, khi cất giữ ở 50°C trong 7 ngày, Chế phẩm 17 chứa metionin và lysin làm chất làm ổn định có tổng lượng tạp chất là 27%, thấp hơn đáng kể, khi được so sánh với Chế phẩm không có chất làm ổn định có tổng lượng tạp chất là 32,8%.

Tức là, sáng chế đã chứng tỏ rằng chế phẩm chứa metionin và lysin có tác

dụng đáng kể tới việc ngăn ngừa sự biến chất của etanercept bởi việc làm giảm tổng lượng tạp chất khi cất giữ, so với chế phẩm không có chất làm ổn định.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm dạng lỏng của etanercept, chứa etanercept; và một hoặc nhiều chất làm ổn định được chọn từ nhóm bao gồm metionin, lysin, histidin, và các muối được dụng của nó có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 250 mM; trong đó chế phẩm này có độ bền cất giữ của etanercept cao hơn so với chế phẩm không có chất làm ổn định, bởi việc làm giảm các sản phẩm phụ của etanercept được tạo ra do sự biến chất trong khi cất giữ.
2. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 1, trong đó chất làm ổn định là metionin hoặc các muối được dụng của nó.
3. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 1, trong đó etanercept có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1 mg/mL đến 100 mg/mL.
4. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều nguyên liệu được chọn từ nhóm bao gồm chất đệm, chất đẳng trương, tá dược, và chất bảo quản.
5. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 4, trong đó chất đệm được chọn từ nhóm bao gồm xitrat, phosphat, succinat, tartrat, fumarat, gluconat, oxalat, lactat, axetat, histidin, và Tris.
6. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 4, trong đó chất đệm có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 100 mM.
7. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 4, trong đó chất đẳng trương được chọn từ nhóm bao gồm natri clorua, kali clorua, axit boric, natri borat, manitol, glyxerin, propylen glycol, polyetylen, glycol, maltoza, sucroza, erytritol, arabitol, xylitol, sorbitol, và glucoza.

8. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 4, trong đó chất đẳng trương có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1mM đến 1000mM.

9. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 1, chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 mg/mL đến 100 mg/mL, metionin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 250 mM, dung dịch đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 100 mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 mM đến 1000 mM.

10. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 1, chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 mg/mL đến 100 mg/mL, histidin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 250 mM, dung dịch đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 100 mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 mM đến 1000 mM.

11. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 1, chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 mg/mL đến 100 mg/mL, lysin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 250 mM, dung dịch đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 100 mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 mM đến 1000 mM.

12. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 1, chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 mg/mL đến 100 mg/mL, histidin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 250 mM, lysin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 250 mM, dung dịch đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 100 mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 mM đến 1000 mM.

13. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 1, chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 mg/mL đến 100 mg/mL, histidin hoặc các muối được dụng của nó

với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 250 mM, metionin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 250 mM, dung dịch đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến 100 mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1 mM đến 1000 mM.

14. Chế phẩm dạng lỏng theo điểm 1, chứa etanercept với lượng nằm trong khoảng từ 1 mg/mL đến 100 mg/mL, metionin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 250mM, lysin hoặc các muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 250mM, dung dịch đệm phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 100mM, và natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 1mM đến 1000mM.