



(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)



1-0024435

(51)⁷ A61K 39/395; C07K 16/24

(13) B

(21) 1-2014-02946

(22) 01/03/2013

(86) PCT/US2013/028516 01/03/2013

(87) WO2013/134052 12/09/2013

(30) 61/607,671 07/03/2012 US

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/12/2014 321A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) CORVARI, Vincent, John (US); WILLIAMS, Barbara, Ann (US); DONOVAN, Patrick, Daniel (US); MARKHAM, Aaron, Paul (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG IL-17

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17. Dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17 này có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến hoặc bệnh đa u tủy.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực dược phẩm. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17. Dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17 này được cho là hữu dụng trong điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp (Rheumatoid Arthritis-RA), bệnh vẩy nến (Psoriasis-Ps), bệnh viêm cột sống dính khớp (Ankylosing Spondylitis-AS), bệnh viêm khớp vẩy nến (Psoriatic Arthritis-PA) hoặc bệnh đa u tủy (Multiple Myeloma-MM).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17 cần thiết để điều trị cho bệnh nhân bị bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến hoặc bệnh đa u tủy. Nồng độ xác định của kháng thể kháng IL-17 cần thiết cho dược phẩm, sao cho kháng thể có thể được phân phối theo đường dưới da cho bệnh nhân. Dược phẩm với nồng độ kháng thể kháng IL-17 xác định này cần phải duy trì được độ ổn định về vật lý và hóa học của kháng thể kháng IL-17, trong khi tránh được độ bám dính có thể làm gia tăng một cách không thể chấp nhận được về thời gian và lực phân phối cần thiết đối với bơm kim tiêm hoặc dụng cụ tiêm tự động.

Kháng thể kháng IL-17 được bộc lộ trong WO 07/70750, kháng thể này trung hòa hoạt tính sinh học kết hợp với IL-17 ở người (trình tự nêu trong SEQ ID NO:1). Ngoài ra, tài liệu WO 07/70750 bộc lộ dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng kháng IL-17. Đối với dược phẩm xác định chứa mAb 126, kháng thể kháng IL-17 bộc lộ trong WO 07/70750, kháng thể này được chủ đơn phát hiện như một phần của sáng chế ở chỗ, ba vấn đề về tính ổn định tồn tại ở mức nồng độ trong dung dịch cao hơn hoặc tương đương 50mg/ml: tách pha lỏng-lỏng; hình thành gel hoặc sự thay đổi pha rắn; và tính không ổn định hóa học. Do đó, dược phẩm với nồng độ kháng thể kháng IL-17 xác định cần phải tránh được các vấn đề quan sát được nêu trên. Nhu cầu cần phải có các dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17 thay thế khác. Ngoài ra, nhu cầu phải cần có các dược phẩm dạng dung dịch chứa kháng thể kháng IL-17 thay thế khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 80mg/ml đến 150mg/ml, dung dịch đệm xitrat ở nồng độ khoảng 20mM, natri clorua ở nồng độ khoảng 200mM, polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,02% (trọng lượng/thể tích) đến 0,03% (trọng lượng/thể tích) và độ pH khoảng 5,7, trong đó kháng thể kháng IL-17 bao gồm kháng thể có chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), trong đó chuỗi nhẹ nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và chuỗi nặng nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17 ở nồng độ khoảng 80mg/ml, dung dịch đệm xitrat ở nồng độ khoảng 20mM, natri clorua ở nồng độ khoảng 200mM, polysorbat-80 ở nồng độ khoảng 0,03% và độ pH khoảng 5,7, trong đó kháng thể kháng IL-17 bao gồm kháng thể chứa hai chuỗi nhẹ (LC) và hai chuỗi nặng (HC), trong đó mỗi một chuỗi nhẹ là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và mỗi một chuỗi nặng là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5.

Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến hoặc bệnh đa u tủy bao gồm bước dùng cho bệnh nhân cần điều trị một lượng hữu hiệu của dược phẩm theo sáng chế. Cụ thể hơn, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh vẩy nến bao gồm bước dùng cho bệnh nhân cần điều trị một lượng hữu hiệu của dược phẩm theo sáng chế. Tương tự, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp bao gồm bước dùng cho bệnh nhân cần điều trị một lượng hữu hiệu của dược phẩm theo sáng chế. Tương tự, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh viêm khớp vẩy nến bao gồm bước dùng cho bệnh nhân cần điều trị một lượng hữu hiệu của dược phẩm theo sáng chế. Tương tự, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh viêm cột sống dính khớp bao gồm bước dùng cho bệnh nhân cần điều trị một lượng hữu hiệu của dược phẩm theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến dược phẩm theo sáng chế để sử dụng trong liệu pháp điều trị. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến dược phẩm theo sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến hoặc bệnh đa u tủy. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến dược phẩm theo sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh vẩy nến. Tương tự, sáng chế đề cập đến dược phẩm theo sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp. Tương

đến được phẩm theo sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp. Tương tự, sáng chế đề cập đến được phẩm theo sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh viêm khớp vảy nến. Tương tự, sáng chế đề cập đến được phẩm theo sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh viêm cột sống dính khớp.

Ngoài ra, sáng chế mô tả việc sử dụng được phẩm theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vảy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh viêm khớp vảy nến hoặc bệnh đa u tủy. Cụ thể hơn, sáng chế mô tả việc sử dụng được phẩm theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh vảy nến. Tương tự, sáng chế mô tả việc sử dụng được phẩm theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp. Tương tự, sáng chế mô tả việc sử dụng được phẩm theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh viêm khớp vảy nến. Tương tự, sáng chế mô tả việc sử dụng được phẩm theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh viêm cột sống dính khớp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các được phẩm xác định được ưu tiên hơn. Các lựa chọn liệt kê dưới đây mô tả các loại được phẩm ưu tiên này:

1) kháng thể kháng IL-17 bao gồm kháng thể có LCVR và HCVR, trong đó LCVR nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và HCVR nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3; bao gồm kháng thể có chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), trong đó chuỗi nhẹ nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và chuỗi nặng nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5; hoặc bao gồm kháng thể chứa hai chuỗi nhẹ (LC) và hai chuỗi nặng (HC), trong đó mỗi một chuỗi nhẹ là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và mỗi một chuỗi nặng là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5;

2) kháng thể kháng IL-17 bao gồm kháng thể có chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), trong đó chuỗi nhẹ nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và chuỗi nặng nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5;

3) kháng thể kháng IL-17 bao gồm kháng thể chứa hai chuỗi nhẹ (LC) và hai chuỗi nặng (HC), trong đó mỗi một chuỗi nhẹ là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và mỗi một chuỗi nặng là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5;

4) kháng thể kháng IL-17 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 80mg/ml đến 150mg/ml;

5) kháng thể kháng IL-17 ở nồng độ khoảng 80mg/ml;

6) polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,02% (trọng lượng/thể tích) đến 0,03% (trọng lượng/thể tích);

7) polysorbat-80 ở nồng độ khoảng 0,03% (trọng lượng/thể tích).

Các dược phẩm dạng dung dịch xác định được ưu tiên hơn. Các lựa chọn liệt kê dưới đây mô tả về các loại dược phẩm dạng dung dịch ưu tiên này:

1) kháng thể kháng IL-17 bao gồm kháng thể có LCVR và HCVR, trong đó LCVR nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và HCVR nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3; bao gồm kháng thể có chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), trong đó chuỗi nhẹ nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và chuỗi nặng nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5; hoặc bao gồm kháng thể chứa hai chuỗi nhẹ (LC) và hai chuỗi nặng (HC), trong đó mỗi một chuỗi nhẹ là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và mỗi một chuỗi nặng là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5;

2) kháng thể kháng IL-17 bao gồm kháng thể có chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), trong đó chuỗi nhẹ nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và chuỗi nặng nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5;

3) kháng thể kháng IL-17 bao gồm kháng thể chứa hai chuỗi nhẹ (LC) và hai chuỗi nặng (HC), trong đó mỗi một chuỗi nhẹ là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và mỗi một chuỗi nặng là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5;

4) kháng thể kháng IL-17 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 80mg/ml đến 150mg/ml;

5) kháng thể kháng IL-17 ở nồng độ khoảng 80mg/ml;

6) polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,02% (trọng lượng/thể tích) đến 0,03% (trọng lượng/thể tích);

7) polysorbat-80 ở nồng độ khoảng 0,03% (trọng lượng/thể tích).

Theo một phương án, sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa nồng độ kháng thể kháng IL-17 nằm trong khoảng từ 80mg/ml đến 150mg/ml. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa nồng độ kháng thể kháng IL-17 nằm trong khoảng từ 68mg/ml đến 92mg/ml. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa nồng độ kháng thể kháng IL-17 khoảng 80mg/ml. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa nồng độ kháng thể kháng IL-17 khoảng 120mg/ml. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa nồng độ kháng thể kháng IL-17 khoảng 150mg/ml.

Theo một phương án, sáng chế còn đề cập đến được phẩm được đệm bằng dung dịch đệm xitrat nằm trong khoảng từ 15mM đến 25mM. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm được đệm bằng dung dịch đệm xitrat nằm trong khoảng từ 15mM đến 25mM. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm được đệm bằng dung dịch đệm xitrat ở nồng độ khoảng 15mM, 20mM, 25mM hoặc 30mM. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến được phẩm được đệm bằng dung dịch đệm xitrat ở nồng độ khoảng 20mM.

Theo một phương án, sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa nồng độ NaCl nằm trong khoảng từ 200mM đến 300mM. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa nồng độ NaCl nằm trong khoảng từ 175mM đến 225mM. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa nồng độ NaCl khoảng 200mM, 250mM hoặc 300mM. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa nồng độ NaCl khoảng 200mM.

Theo một phương án, sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa nồng độ polysorbat-80 hoặc polysorbat-20 nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,04%. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa nồng độ polysorbat-80 hoặc polysorbat-20 nằm trong khoảng từ 0,02% đến 0,04%. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa nồng độ polysorbat-80 hoặc polysorbat-20 khoảng 0,01%, 0,02%, 0,03% hoặc 0,04%. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa nồng độ polysorbat-80 hoặc polysorbat-20 khoảng 0,03%.

Theo một phương án, sáng chế còn đề cập đến được phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ 5,4 đến 6,0. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ 5,4 đến 6,0. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến được

phẩm có độ pH khoảng 5,4, 5,7 hoặc khoảng 6,0. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến được phẩm có độ pH khoảng 5,7.

Dược phẩm theo sáng chế bao gồm dung dịch đệm xitrat. Dung dịch đệm xitrat có thể được tạo ra bằng axit xitric, trinitratđihydrat và axit xitric monohydrat; hoặc axit xitric monohydrat, natriphosphatđiaxit và axit xitric. Tương tự, dung dịch đệm xitrat có thể được tạo ra bao gồm natrixitrat monobazơ, muối axit xitrictrinitrat hoặc natrixitrathydrat ba lần. Tốt hơn, dung dịch đệm xitrat được tạo ra bằng natrixitratđihydrat và axit xitric.

Kháng thể mAb 126 là kháng thể kháng IL-17 gồm có hai chuỗi nhẹ (LC) và hai chuỗi nặng (HC), trong đó mỗi một chuỗi nhẹ là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và mỗi một chuỗi nặng là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5 và trong đó, các chuỗi nặng được liên kết ngang bằng các liên kết disulfit.

Cấu trúc chung của “kháng thể” đã được biết rất rõ trong lĩnh vực. Đối với kháng thể thuộc typ IgG, có 4 chuỗi axit amin (2 chuỗi “nặng” và 2 chuỗi “nhẹ”) được liên kết ngang thông qua liên kết disulfit trong chuỗi và liên chuỗi. Khi được biểu hiện trong một số hệ sinh học, các kháng thể có trình tự Fc ở người chưa cải biến được glycosyl hóa ở vùng Fc. Kháng thể cũng có thể được glycosyl hóa tại các vị trí khác. Người có kỹ năng trong lĩnh vực sẽ hiểu rõ rằng, các kháng thể để sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế có thể chứa glycosyl hóa như vậy. Cấu trúc siêu đơn vị và cấu hình ba chiều của kháng thể là đã biết trong lĩnh vực. Mỗi một chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng tận cùng N(“HCVR”) và vùng hằng định chuỗi nặng (“HCCR”). Vùng hằng định chuỗi nặng bao gồm 3 miền (CH1, CH2 và CH3) đối với IgG, IgD và IgA; và 4 miền (CH1, CH2, CH3 và CH4) đối với IgM và IgE. Mỗi một chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (”LCVR”) và vùng hằng định chuỗi nhẹ (”LCCR”). Vùng biến đổi của mỗi một cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng tạo ra vị trí liên kết kháng thể.

Kháng thể kháng IL-17 để sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra nhờ sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực, ví dụ công nghệ tái tổ hợp, công nghệ hiển thị thể thực khuẩn, công nghệ tổng hợp hoặc sự kết hợp của các công nghệ này hoặc các công nghệ khác đã biết trong lĩnh vực. Phương pháp tạo ra và tinh chế kháng thể và các đoạn liên kết kháng nguyên đã được biết trong lĩnh vực và ví dụ, có

thể tìm thấy trong tài liệu của tác giả Harlow và Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, các chương 5-8 và 15, ISBN 0-87969-314-2.

Kháng thể kháng IL-17 để sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế là một kháng thể cao cấp đã được thiết kế để có các vùng sườn, vùng bản lề và vùng hằng định có nguồn gốc từ người giống hệt hoặc cơ bản giống (cơ bản là của người) với các vùng sườn và vùng hằng định thu được từ các trình tự gen người. Các vùng sườn, vùng bản lề và vùng hằng định đầy đủ của người là các trình tự dòng gốc của người cũng như các trình tự có các đột biến soma xuất hiện tự nhiên và/hoặc các trình tự có các đột biến được thiết kế. Kháng thể để sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm vùng sườn, vùng bản lề hoặc vùng hằng định thu được từ vùng sườn, vùng bản lề hoặc vùng hằng định đầy đủ của người có chứa một hoặc nhiều axit amin thay thế, loại bỏ hoặc bổ sung ở đó. Ngoài ra, kháng thể để sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế về cơ bản không gây ra miễn dịch ở người.

Độ ổn định của kháng thể trong dung dịch phụ thuộc vào độ ổn định hóa học và độ ổn định vật lý của kháng thể trong dược phẩm mà kháng thể được hòa tan trong đó. Quá trình oxy hóa, tách nhóm amit và thủy phân là ví dụ về vấn đề độ ổn định hóa học mà kháng thể có thể gặp phải trong dược phẩm. Sự kết tập và hình thành gel là ví dụ về vấn đề độ ổn định vật lý mà kháng thể có thể gặp phải trong dược phẩm. Vấn đề độ ổn định vật lý khác đối với kháng thể trong dược phẩm dung dịch có thể là sự tách pha lỏng-lỏng (LLPS); LLPS trong dung dịch kháng thể điển hình trước tiên xuất hiện ở dạng màu trắng đục, sau đó là quá trình tách thành các pha nhẹ và pha nặng. Điểm vẫn đục là nhiệt độ mà tại nhiệt độ đó, LLPS được quan sát thấy trước tiên trong điều kiện xác định; điểm vẫn đục xác định nhiệt độ mà tại nhiệt độ đó, dung dịch trở thành màu trắng đục do bởi sự hình thành vi pha mà sau cùng sẽ tách thành các pha nặng và pha nhẹ thường kết hợp với sự tách pha.

Dược phẩm là dược phẩm ổn định trong đó mức độ thoái biến, cải biến, kết tập, mất hoạt tính sinh học và tương tự, của protein/kháng thể trong đó được kiểm soát theo cách chấp nhận được và không gia tăng theo cách không thể chấp nhận được theo thời gian. Độ ổn định có thể được đánh giá bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, bao gồm việc đánh giá về tán xạ ánh sáng, sự giảm sáng rõ ràng (hệ số hấp thụ hoặc mật độ quang), kích thước (ví dụ, bằng phương pháp sắc ký loại trừ kích thước (SEC)),

hoạt tính và/hoặc đặc tính sinh học *in vitro* hoặc *in vivo* xác định bằng phương pháp quét nhiệt vi sai (DSC) đối với mẫu. Các phương pháp đánh giá độ ổn định khác đã biết trong lĩnh vực và cũng có thể được sử dụng theo sáng chế. Khi được xác định bằng phương pháp SEC, % đơn thể của dược phẩm kháng IL-17 cần phải cao hơn 90% sau khi bảo quản ở nhiệt độ 5°C trong thời gian 3 tháng, 6 tháng, 9 tháng, 12 tháng, 18 tháng hoặc tốt hơn là 2 năm. Khi được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi cation (CEX), tổng tỷ lệ % biến số axit không được vượt quá 30% đối với dược phẩm kháng IL-17 sau khi bảo quản ở nhiệt độ 5°C trong thời gian 3 tháng, 6 tháng, 9 tháng, 12 tháng, 18 tháng hoặc tốt hơn là 2 năm. Để xác định độ tinh khiết bằng phương pháp CE-SDS khử, dược phẩm kháng IL-17 cần phải có độ tinh khiết cao hơn 85% sau khi bảo quản ở nhiệt độ 5°C trong thời gian 3 tháng, 6 tháng, 9 tháng, 12 tháng, 18 tháng hoặc tốt hơn là 2 năm. Tốt hơn, dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17 phải đáp ứng một trong các tiêu chuẩn nêu trên về độ ổn định ở nhiệt độ 5°C đối với dung dịch được bảo quản trong thời gian 2 năm. Tốt hơn nữa, dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17 phải đáp ứng tất cả các tiêu chuẩn nêu trên về độ ổn định ở nhiệt độ 5°C đối với dung dịch được bảo quản trong thời gian 2 năm.

Dược phẩm theo sáng chế có thể ở dạng phân liều lỏng chứa dung dịch, nhũ tương hoặc huyền phù. Tốt hơn, dược phẩm theo sáng chế là ở dạng phân liều lỏng chứa dung dịch.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng theo đường ngoài tiêu hóa. Sử dụng theo đường ngoài tiêu hóa thông thường được hiểu trong tài liệu y khoa là việc tiêm dạng phân liều vào trong cơ thể bằng bơm kim tiêm vô trùng hoặc dụng cụ cơ học khác nào đó như bơm truyền dịch. Đường ngoài tiêu hóa có thể bao gồm đường tĩnh mạch, trong cơ, dưới da và đường trong phúc mạc. Sử dụng theo đường dưới da là đường dùng được ưu tiên.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị cho đối tượng bị bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến hoặc bệnh đa u tủy. Lượng hữu hiệu của dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17 theo sáng chế là lượng để phân phối một lượng kháng thể kháng IL-17 gây ra tác dụng điều trị và/hoặc phòng ngừa mong muốn mà không gây ra tác dụng phụ không thể chấp nhận được khi được sử dụng cho đối tượng có các mức IL-17 tăng cao.

Ví dụ thực hiện sáng chế**Ví dụ 1**

Phối chế được phẩm chứa mAb 126

Bảng 1: Phối chế sản phẩm thuốc mAb 126

Thành phần	Nồng độ(mg/ml)
mAb 126	80
NatriXitratĐihydrat	5,106
Axit xitric khan	0,507
Natri clorua	11,69
Polysorbat 80	0,30
Nước cất tiêm	Lượng đủ cho 1ml
Axit clohydric	hiệu chỉnh độ pH
Natri Hydroxit	hiệu chỉnh độ pH

Bảng 2: Thành phần tá dược đệm

Thành phần	mg/ml
NatriXitratĐihydrat	5,106
Axit xitric khan	0,507
Natri clorua	11,69
Polysorbat 80	0,414

Quy trình sản xuất được phẩm dung dịch chứa kháng thể kháng IL-17 đối với mAb 126 (Bảng 1) bao gồm bước thứ nhất kết hợp thành phần tá dược đệm (Bảng 2), sau đó kết hợp vào chế phẩm sản phẩm thuốc cuối cùng.

Thành phần tá dược đệm (Bảng 2) được điều chế, lọc và bảo quản để kết hợp vào chế phẩm sản phẩm thuốc. Cân một lượng nước thích hợp ở nhiệt độ nằm trong khoảng 20 +/- 5°C để đưa vào một bình rộng kích thước thích hợp. Lượng natrixitrat thích hợp được bổ sung và kết hợp trong đó; sau đó, lượng axit xitric thích hợp được

bổ sung và kết hợp trong đó. Sau đó, lượng natri clorua thích hợp được bổ sung và kết hợp trong đó. Cân lượng polysorbat 80 chính xác để đưa vào trong bình chứa thủy tinh và lượng nước thích hợp ở nhiệt độ nằm trong khoảng $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ được bổ sung vào trong bình chứa thủy tinh để có được nồng độ nêu trong bảng 2 và dung dịch được trộn kết hợp. Toàn bộ hàm lượng của dung dịch polysorbat 80 được bổ sung vào các tá được khác. Bình chứa dung dịch polysorbat 80 được rửa bằng nước để đảm bảo toàn bộ hàm lượng được chuyển sang hết. Sau khi bổ sung dung dịch polysorbat 80, dung dịch được trộn kết hợp. Sau khi hoàn thành quá trình hòa tan và trộn kết hợp, độ pH của dung dịch được kiểm soát nằm trong khoảng $5,7 \pm 0,2$; việc điều chỉnh bằng dung dịch HCl hoặc NaOH được thực hiện khi cần thiết. Thành phần tá được đệm được đưa qua dụng cụ lọc (polyvinyliden florua [PVDF]) để làm giảm tải lượng sinh học.

Thành phần tá được đệm được bổ sung cùng với polysorbat 80 bổ sung để bảo đảm nồng độ thấp hơn ($0,2\text{mg/ml}$ polysorbat-80) về thành phần hoạt chất được (API) so với chế phẩm sản phẩm thuốc cuối cùng. Vì nồng độ của mAb 126 trong API sẽ thay đổi, lượng dung dịch đệm cần để pha loãng cũng sẽ thay đổi. Sự thay đổi này đòi hỏi nồng độ của polysorbat 80 cần được hiệu chỉnh theo công thức phối chế thành phần tá được đệm đối với mỗi một lô.

Các đồ chứa API mAb 126 bảo quản (mAb 126 được biểu hiện trong tế bào, được tinh chế và cô đặc; sau đó, API tạo ra được kết đông tới nồng độ từ 150mg/ml đến 160mg/ml mAb 126 trong 20mM dung dịch đệm xitrat, 200mM NaCl, polysorbat-80 $0,02\%$, ở độ pH khoảng $5,7$) được cân bằng về nhiệt độ nằm trong khoảng $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Sau đó, dung dịch API được kết hợp với lượng dung dịch tá được đệm thích hợp để đạt được 80% kích thước lô theo lý thuyết. Độ pH của dung dịch được kiểm soát nằm trong khoảng $5,7 \pm 0,2$. Sau khi hiệu chỉnh độ pH, dung dịch được kết hợp và mẫu được lấy cho thử nghiệm xử lý UV để xác định nồng độ mAb 126. Lượng dung dịch tá được đệm thích hợp được bổ sung để đạt tới trọng lượng lô đích cuối cùng. Sau khi kết hợp, độ pH của dung dịch được kiểm soát nằm trong khoảng $5,7 \pm 0,2$ và nồng độ mol của dung dịch được kiểm soát nằm trong khoảng $360\text{-}480\text{ mOsm/kg}$. Dung dịch sản phẩm thuốc mAb 126 được đưa qua dụng cụ lọc PVDF để làm giảm tải lượng sinh học và được bảo quản ở nhiệt độ 5°C .

Ví dụ 2

Sự tách pha

mAb 126 được phát hiện có xu hướng tách pha khi ở trong các dung dịch ở nhiệt độ dưới 0°C. Vấn đề tách pha lỏng-lỏng (LLPS) cần được giải quyết vì việc bảo quản sản phẩm thuốc mAb 126 sẽ thực hiện ở nhiệt độ 5°C. Việc bảo quản sản phẩm thuốc ở nhiệt độ 5°C đòi hỏi độ ổn định về độ lệch nhiệt độ trong tủ lạnh định kỳ thấp hơn 0°C. Việc gia tăng nồng độ NaCl được chứng minh là làm giảm nhiệt độ mà tại nhiệt độ đó, LLPS xuất hiện trong các chế phẩm mAb 126 và việc gia tăng nồng độ xitrat cũng được chứng minh là làm giảm nhiệt độ mà tại nhiệt độ đó, LLPS xuất hiện trong các chế phẩm mAb 126.

Các sự kiện LLPS được thử nghiệm dựa vào một kỹ thuật được triển khai đặc hiệu cho phạm vi nhiệt độ (sự tách pha xuất hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng giữa -12 và 0°C) mà mAb 126 phải đương đầu. Hai mililit (ml) mẫu ở nồng độ từ 10 đến 200mg/ml mAb 126 được đưa vào trong thiết bị làm đông khô LyoStar II (hệ thống FTS) với chu trình được thể hiện trong bảng 3. Áp suất được duy trì tại áp suất không khí đối với thử nghiệm. Các điều kiện của mẫu được thử nghiệm ít nhất ba lần và độ lệch chuẩn là xấp xỉ 0,5°C đối với các mẫu được xác định trong ba lần. Mẫu được theo dõi bằng mắt thường trong chu trình đông khô về các dấu hiệu tách pha, bao gồm điểm vẩn đục (sự xuất hiện màu trắng đục) và sự hình thành lớp giàu protein đậm đặc ở đáy lọ. Mẫu xuất hiện màu trắng đục tăng dần trong khi làm lạnh, nhưng hiệu ứng này có thể dễ dàng phân biệt được với điểm vẩn đục. Khi điểm vẩn đục xuất hiện, mẫu trở thành dung dịch trắng đục trong thời gian dưới một giây so với màu trắng đục xuất hiện tăng dần từ từ, trong đó đối tượng phía sau lọ vẫn có thể nhìn thấy được qua mẫu.

Bảng 3: Chu trình đông khô trong thử nghiệm tách pha lỏng-lỏng

Bước	1	2	3
Tốc độ làm lạnh (°C/phút)	5	1	5
Đích (°C)	5	-30	20
Thời gian duy trì (phút)	10	20	>20

Như thể hiện ở bảng 4, sự gia tăng nồng độ NaCl được chứng minh là làm giảm nhiệt độ điểm vẩn đục. Các yếu tố giới hạn sự gia tăng nồng độ NaCl trong dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17 đó là tính ưu trương và các hiệu ứng không tách pha khác; NaCl nồng độ 200mM tránh được các vấn đề này trong khi vẫn làm giảm nhiệt độ

điểm vẫn đục. Tương tự, LLPS trong mAb126 được chứng minh là có hai đỉnh ở tất cả các nồng độ NaCl, ngoại trừ nồng độ 300mM NaCl; LLPS rõ ràng nhất ở nồng độ 100mg/ml mAb 126 và các hiệu ứng tách pha giảm dần khi nồng độ dịch chuyển lên cao hơn hoặc thấp hơn 100mg/ml.

Bảng 4: Tách pha lỏng-lỏng: Các hiệu ứng tại nồng độ NaCl và mAb 126 (Điểm vẫn đục °C)

Nồng độ mAb 126 (mg/ml)	10	50	100	150	200
50mM NaCl	-4,1	2,1	5		
100mM NaCl		-1,2	2,7	1,1	
150mM NaCl		-7,5	-4	-5,7	-10,4
200mM NaCl		-8,5	-7	-10,2	-10,8
250mM NaCl			-6,8	-11,3	
300mM NaCl		-12,5	-9,9	-12,4	-8,8

Sự tác động của độ pH lên điểm vẫn đục của dung dịch mAb 126 được xác định. Điểm vẫn đục được phát hiện trở nên nhỏ nhất ở hai giá trị độ pH đó là pH 4 và pH6. Độ pH 6 cần được coi là tối ưu hơn so với độ pH 4 khi lựa chọn được phẩm chứa mAb 126, vì tính không ổn định hóa học của mAb 126 tại độ pH 4 ngăn cản sử dụng điểm vẫn đục thấp tại độ pH 4. Căn cứ vào sự hình thành gel tại độ pH nằm trong khoảng 6,3 – 6,4 thể hiện trong ví dụ 3 đối với dược phẩm chứa mAb 126, độ pH nằm trong khoảng 5,7 +/- 0,3 được ưu tiên hơn so với độ pH nằm trong khoảng 6 +/- 0,3 để cho phép khoảng giá trị độ pH duy trì ổn định trong thời hạn sử dụng của dược phẩm.

Sự tác động của dung dịch đệm sử dụng thông thường khác đối với sự tách pha lỏng-lỏng được khảo sát để nắm chắc hệ dung dịch đệm tối ưu nào dùng cho mAb 126 (Bảng 5); dung dịch đệm xitrat được phát hiện là hữu hiệu nhất khi giảm nhiệt độ xuống tới nhiệt độ mà LLPS xuất hiện tại nhiệt độ đó. Các nghiên cứu này được tiến hành với nồng độ 150mM NaCl. Dung dịch đệm axetat có thể so sánh được với dung dịch đệm xitrat ở độ pH 5 về sự tác động lên điểm vẫn đục; tuy nhiên, tính không ổn định hóa học tại độ pH 5 khiến cho điều kiện độ pH này kém thuận lợi hơn.

Nồng độ của xitrat được chứng minh là tác động mạnh lên LLPS (Bảng 6). Trong khi xitrat làm giảm điểm vẫn đục tới 50mM; dung dịch đệm xitrat cũng được

thông báo là gây đau hơn khi tiêm. Do đó, nồng độ xitrat cao hơn 30mM chắc chắn là không thể chấp nhận được theo quan điểm của bệnh nhân.

Bảng 5: Tác động của dung dịch đệm lên nhiệt độ điểm vẫn đục với nồng độ 150mg/ml mAb 126

Dung dịch đệm	mM	pH	Điểm vẫn đục (°C)
Axetat	10	5	-4,1
Xitrat	10	5	-4,4
Histidin	10	6	-2,2
Xitrat	10	6	-8,1

Bảng 6: Tách pha lỏng-lỏng: Sự tác động của nồng độ xitrat với nồng độ 150mg/ml mAb 126

Nồng độ xitrat	Điểm vẫn đục (°C)
5mM	-6,3
10mM	-8,2
20mM	-10,2
30mM	-13,6
40mM	-14,6

Ví dụ 3

Sự hình thành gel

Sản phẩm thuốc sinh học được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng 5°C +/- 3°C để giảm thiểu tới mức thấp nhất sự thoái biến về hóa học và vật lý trong thời hạn sử dụng sản phẩm. Các sự kiện như sự thay đổi pha rắn hoặc sự hình thành gel do nhiệt động học tốt hơn không thể chấp nhận được, ngay cả có thể đảo ngược, vì các thay đổi này có thể tác động tiêu cực lên độ ổn định và gây trở ngại cho việc quan sát mẫu bằng mắt thường cần thiết trước khi sử dụng.

Sự thay đổi pha rắn được quan sát ở các mẫu nồng độ cao của mAb 126 ở điều kiện độ pH nằm trong khoảng <pH 5 và >pH 7 ở nhiệt độ 5°C. Biến cố nhiệt động học này được chứng minh là có thể đảo ngược được bằng cách cân bằng các lọ ở nhiệt độ

trong phòng. Sau đó, mẫu được thử nghiệm ở các điều kiện độ pH khác nhau và được theo dõi về các thay đổi nhiệt động học để tìm ra các ranh giới pha một cách chính xác hơn. Các thử nghiệm này được tiến hành bằng cách thẩm tách mẫu trong dung dịch đệm xitrat ở độ pH 7, nhiệt độ 5°C để gây ra sự thay đổi pha. Sau đó, chất rắn được thẩm tách ở cùng nhiệt độ trong các điều kiện mong muốn để xác định rõ xem liệu các mẫu có đảo ngược trở thành trạng thái dung dịch hay không. Phương pháp thử nghiệm cân bằng được ưu tiên trong bảo quản mẫu lâu dài với việc kiểm tra cách quăng từng đợt, bởi vì khi một chế phẩm cụ thể có thể không ổn định về mặt nhiệt động học, động học về sự thay đổi pha rắn có thể cần hàng tháng trời mới xuất hiện trong một số trường hợp.

Các nghiên cứu được tiến hành với nồng độ 100mg/ml hoặc 150mg/ml mAb 126 ở nồng độ 200mM dung dịch đệm NaCl, dung dịch đệm xitrat 10mM với lượng gia tăng độ pH bằng 0,1 để tìm ra vị trí ranh giới cho sự hình thành pha rắn. Sự chuyển tiếp giữa các pha được phát hiện nằm trong khoảng giữa độ pH 6,3 và 6,4 ở nhiệt độ 5°C. Do bởi ranh giới pha, nên độ pH đích của chế phẩm mAb 126 thấp hơn so với khoảng pH giữa 6 và 5,7 để đảm bảo khoảng bảo quản ổn định.

Hai thử nghiệm với nồng độ 80mg/ml mAb 126 ở nhiệt độ 5°C được thực hiện trong dung dịch đệm xitrat 20mM, NaCl 200mM và 0,03% polysorbat-80; không có sự hình thành gel tại hoặc thấp hơn độ pH 6,1, trong khi sự hình thành gel xuất hiện ở độ pH cao hơn pH 6,1. Các thử nghiệm này cho thấy rằng, chế phẩm với nồng độ 80mg/ml mAb 126 có khoảng đơn vị độ pH rộng nằm trong khoảng pH 5,7+/- 0,3 pH để tránh sự hình thành gel.

Ví dụ 4

Tính không ổn định hóa học

Để được phẩm có được độ ổn định, cần phải giải quyết cả hai nguồn không ổn định về vật lý và hóa học trong dược phẩm. Tính không ổn định hóa học có thể dẫn đến sự thoái biến kháng thể.

Để đánh giá sự tác động của độ pH lên độ ổn định hóa học của mAb 126 ở nồng độ 100 và 150mg/ml, các mẫu mAb 126 được phân tích về sự gia tăng tổng % biến số axit bằng phương pháp sắc ký. Phạm vi độ pH từ 4 đến 7 được khảo sát với lượng gia tăng một nửa đơn vị pH. Dung dịch đệm dùng trong nghiên cứu bao gồm dung dịch

đệm xitrat 10mM, NaCl 150mM và polysorbat 80 0,02%. 2 ml dung dịch được bảo quản trong lọ thủy tinh thể tích 3ml có nút chặn huyết thanh. Mẫu trong các môi trường pH này được bảo quản ở các nhiệt độ 5°C, 25°C và 40°C nhằm để tạo mẫu một cách chính xác hơn về sự tác động của nhiệt độ lên các dạng thoái biến khác nhau. Các mẫu được phân tích nhờ sử dụng phương pháp HPLC trao đổi cation (CEX) sử dụng thiết bị phát hiện UV và cột Dionex ProPac WCX-10 (4x250mm) sử dụng Bis Tris Propan 10mM ở độ pH 6 (Pha di động A) và Bis Tris Propan 10mM, NaCl 50mM ở độ pH 9,6 (Pha di động B).

Bằng phương pháp CEX, sự gia tăng về tổng % biến số axit (%AV) là chỉ số đáng tin cậy hơn về sự thoái biến của mAb 126. Các lọ chứa mAb 126 bảo quản ở nhiệt độ 25°C được chứng minh bằng phương pháp CEX là ổn định nhất ở độ pH nằm trong khoảng pH 5-6 và ít ổn định nhất trong các điều kiện độ pH kiềm hơn. Khi mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 40°C, độ pH nằm trong khoảng giữa 5 và 5,5 là ổn định nhất, với độ pH 6 chỉ ổn định hơn chút ít so với các môi trường độ pH cao hơn. Các kết quả này chứng minh rằng, độ pH của dược phẩm dạng dung dịch mAb 126 cần phải nằm trong khoảng giữa pH 5 và pH 6.

Ví dụ 5

Nghiên cứu về thiết kế thử nghiệm (DOE)

Nghiên cứu về DOE sử dụng phương pháp đa biến để kiểm tra về độ ổn định vật lý và hóa học của chế phẩm dạng dung dịch mAb 126. Chế phẩm dạng dung dịch mAb 126 được điều chế theo Bảng 7. Mỗi một biến số được khảo sát ở 5 mức để đánh giá về bất kỳ độ cong nào có thể tồn tại trong các tham số đáp ứng đầu ra hoặc tương tác giữa các biến số đầu vào. Điều kiện tâm điểm của thử nghiệm đó là xitrat 20mM, NaCl 200mM, độ pH 5,7, polysorbat 80 0,02%. Ba tâm điểm được phân tán trong suốt toàn bộ thiết kế. Chuẩn bị một cách độc lập 3 tâm điểm sẽ mang lại sự đánh giá chắc chắn về dữ liệu phân tích không yêu cầu tất cả mọi điều kiện cần phải được chuẩn bị và phân tích trong hai lần hoặc ba lần. Mẫu được bảo quản ở 4 điều kiện nhiệt độ (5, 25, 30 và 40°C). Phạm vi nhiệt độ này cho phép đánh giá về năng lượng hoạt hóa trong các kết quả. Ngoài ra, việc bảo quản ở nhiệt độ cao hơn cho phép dự đoán sớm hơn về các trạng thái dược phẩm tối ưu.

Nhiều kỹ thuật phân tích được lựa chọn để theo dõi độ ổn định hóa học và vật lý bao gồm kỹ thuật sắc ký loại trừ kích thước (SEC), sắc ký trao đổi cation (CEX) HPLC, phân tích hạt dựa vào HIAC, phân tích hạt dựa vào hình ảnh kỹ thuật số bằng phương thức ghi hình ảnh vi dòng (MFI, Protein Simple/Brightwell Model DPA 4200 với phạm vi kích thước nằm trong khoảng 2-100um), đáng vẽ bên ngoài, kỹ thuật Lab-on-a-Chip trong thiết bị phân tích sinh học khử và không khử (LoC), độ pH, độ nhớt và hệ số hấp thụ UV (để đánh giá hàm lượng protein).

Sử dụng dữ liệu từ tất cả các điều kiện nhiệt độ của giai đoạn 3 tháng đầu tiên, năng lượng hoạt hóa (E_a) được tính toán sử dụng mô hình động học Arrhenius (Bậc 0 hoặc Bậc nhất). Năng lượng được phát hiện nhờ sử dụng phép phân tích hồi quy phi tuyến tính của tất cả các chu trình. Sau đó, mô hình được sử dụng để ngoại suy các xu hướng tới 24 tháng ở nhiệt độ bảo quản thương mại thích hợp (5°C). Mô hình Arrhenius bậc 0 được sử dụng cho SEC (monome, chất polyme liên quan/tạp chất), CEX (biến số axit), LoC khử/không khử và hàm lượng UV. Thích hợp nhất cho xu hướng biến số cơ sở CEX đó là mô hình bậc nhất.

Bảng 7. Mô hình thử nghiệm

Chu trình	Độ pH	[PS80]	[NaCl]	[mAb 126]	[Dung dịch đậm]	Kiểu dung dịch đậm
1	5,7	0,02	200	120	20	Xitrat
2	6	0,01	150	105	25	Xitrat
3	6	0,03	150	105	15	Xitrat
4	5,7	0	200	120	20	Xitrat
5	5,4	0,03	150	135	15	Xitrat
6	6	0,01	250	105	15	Xitrat
7	5,7	0,02	200	90	20	Xitrat
8	5,7	0,02	100	120	20	Xitrat
9	6,3	0,02	200	120	20	Xitrat
10	5,1	0,02	200	120	20	Xitrat
11	6	0,03	250	105	25	Xitrat
12	5,4	0,01	150	105	15	Xitrat
13	5,4	0,03	250	135	25	Xitrat

Chu trình	Độ pH	[PS80]	[NaCl]	[mAb 126]	[Dung dịch đệm]	Kiểu dung dịch đệm
14	6	0,03	150	135	25	Xitrat
15	5,7	0,02	200	120	20	Xitrat
16	5,7	0,02	200	120	10	Xitrat
17	5,4	0,01	250	135	15	Xitrat
18	5,4	0,01	150	135	25	Xitrat
19	6	0,03	250	135	15	Xitrat
20	5,7	0,04	200	120	20	Xitrat
21	5,4	0,03	250	105	15	Xitrat
22	6	0,01	150	135	15	Xitrat
23	5,4	0,03	150	105	25	Xitrat
24	5,7	0,02	300	120	20	Xitrat
25	5,7	0,02	200	150	20	Xitrat
26	6	0,01	250	135	25	Xitrat
27	5,4	0,01	250	105	25	Xitrat
28	5,7	0,02	200	120	30	Xitrat
29	5,7	0,02	200	120	20	Xitrat

Sắc ký loại trừ kích thước

Hai biến số có tác động mạnh nhất lên tỷ lệ % đơn phân dựa vào kết quả SEC đó là độ pH và nồng độ mAb 126. Sự tác động của nồng độ mAb 126 là tuyến tính với sự gia tăng nồng độ protein dẫn tới độ tinh khiết đơn phân giảm.

Ba biến số đầu vào (pH, nồng độ NaCl và nồng độ dung dịch đệm) thể hiện độ cong về sự tác động của các biến số này lên tỷ lệ % đơn phân. Về nồng độ NaCl và xitrat, các giá trị sát với tâm điểm là ổn định nhất. Các điều kiện pH thấp ổn định hơn một chút so với tâm điểm, nhưng các kết quả của quá trình thoái biến khiến cho việc làm giảm độ pH đích ít hấp dẫn hơn.

Tương tác giữa sự tác động của độ pH và nồng độ protein xuất hiện với các tác động của nồng độ protein giảm xuống ở điều kiện độ pH thấp hơn 5,7. Dự đoán 2 năm về độ tinh khiết đơn phân tại điều kiện tâm điểm của nghiên cứu thấp hơn 96,7% một

chút. Nồng độ polysorbat 80 có ít tác động lên độ ổn định nằm trong khoảng từ 0,02-0,04%.

Sắc ký trao đổi cation

Phân tích CEX tập trung vào sự phát triển các loại axit theo thời gian. Phương pháp mô hình hóa thống kê của CEX %AV (Ea là 23,7kcal/g-mol) cho thấy rằng, có thể kỳ vọng sự cải biến hóa học chút ít sau thời gian bảo quản 24 tháng ở nhiệt độ 5°C. Sự phát sinh biến số axit được giảm thiểu đến mức thấp nhất gần tâm điểm của độ pH, nhưng gia tăng theo nồng độ xitrat cao hơn. Các xu thế nồng độ mAb 126 và Polysorbat 80 cho thấy rằng, tâm điểm sát gần với vị trí ít tối ưu nhất; tuy nhiên, dựa vào biên độ của tỷ lệ trực y, sự chênh lệch về độ ổn định tâm điểm với các điều kiện khác cơ bản là không đáng kể.

Chip LoC trên thiết bị phân tích sinh học khử

Tỷ lệ % tinh khiết trong kỹ thuật LoC khử là sự kết hợp của tỷ lệ % tương đối của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Hai biến số đầu vào có tác động mạnh nhất lên dự đoán 24 tháng đó là độ pH và nồng độ NaCl. Tỷ lệ % độ tinh khiết đạt mức tối đa gần tâm điểm của nồng độ 200mM NaCl. Tỷ lệ % độ tinh khiết tăng lên theo sự gia tăng về độ pH. Thậm chí ở các điều kiện chế phẩm cực hạn được thử nghiệm trong nghiên cứu DOE, phân tử vẫn >98% tinh khiết, cho thấy rằng, kháng thể ổn định khi được xác định bằng LoC khử trong phạm vi phân tích đa biến. Ea là 21,8kcal/g-mol.

Các dự đoán kết hợp

Tất cả các điều kiện về không gian thiết kế nghiên cứu trong suốt thử nghiệm này có các dự báo thời hạn sử dụng 2 năm đều dự đoán <5% thoái biến. Tuy nhiên, các yếu tố vật lý khác loại trừ các điều kiện pH cao hơn pH 6,3; do đó, điều kiện đích của chế phẩm không nên tiến sát ranh giới độ pH này. Ngoài ra, điều quan trọng là lựa chọn ra đích nằm ở cực đại toàn cục tối ưu của các biến số đầu vào được khảo sát. Dựa vào các nghiên cứu sản xuất chỉ ra rằng, >0,01% polysorbat 80 cần thiết để bơm, nên đích polysorbat 80 là 0,03%. Dựa vào các kết quả nghiên cứu, điều kiện sản xuất tối ưu là xitrat 20mM, NaCl 200mM, pH 5,7 cùng với 0,03% polysorbat 80.

Ví dụ 6

Độ ổn định ở nồng độ 80mg/ml mAb 126

Độ ổn định ở nồng độ 80mg/ml mAb 126 trong xitrat 20mM, NaCl 200mM, pH 5,7 với 0,03% polysorbat 80 được thử nghiệm trong 24 tháng. Để bảo quản ở nhiệt độ 5°C, độ ổn định của dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17 được xác định tại thời điểm 0, 1, 3, 6, 9, 12, 18 và 24 tháng. Nhiệt độ 5°C sẽ là nhiệt độ bảo quản kỳ vọng đối với dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17. Các nghiên cứu về độ ổn định gia tăng ở nhiệt độ 25°C được thực hiện tại thời điểm 1, 3 và 6 tháng.

Nhiều kỹ thuật phân tích được lựa chọn để theo dõi độ ổn định hóa học và vật lý bao gồm sắc ký loại trừ kích thước HPLC, phương pháp sắc ký trao đổi cation HPLC, đáng vẽ bên ngoài, độ pH và hấp thụ UV. Phương pháp CE-SDS được thực hiện sử dụng bộ kit xác định độ tinh khiết/tính không đồng nhất của IgG Beckman Coulter với thiết bị điện dimao quản (CE) tăng cường Beckman Coulter ProteomeLab PA800. Đối với phương pháp CE-SDS khử, mẫu được phân tích trong mao quản silica nung chảy trần trong điều kiện biến tính, khử bằng cách rây phân tử qua nền gel polyme có thể thay thế được sau mỗi một lần phun mẫu. Đối với phương pháp CE-SDS không khử, mẫu được pha loãng tới nồng độ xấp xỉ 5mg/ml trong nước và sau đó được pha loãng trong dung dịch pha loãng mẫu (IAM 20mM trong Tris 100mM, 1% SDS, pH 9,0) tới nồng độ xấp xỉ 1mg/ml. Sau đó, mẫu được phân tích trong mao quản silica nung chảy trần trong điều kiện biến tính, không khử bằng cách rây phân tử qua nền gel polyme có thể thay thế được tại điện thế hằng định. Trong cả hai phương pháp, việc phát hiện UV được tiến hành thực hiện ở bước sóng 214nm. Kết quả được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8: Dữ liệu về độ ổn định đối với mAb 126 ở nồng độ 80mg/ml

Đặc điểm phân tích	Điều kiện bảo quản	Tháng				
		0	1	3	6	9
Hiệu lực (Thử nghiệm sinh học), %	5°C	87	--	--	--	108
	25°C/Độ ẩm tương đối 60%		106	--	109	--
Lượng(UV), mg/ml	5°C	75,4	--	76,2	75,5	75,4
	25°C/Độ ẩm tương đối 60%		75,3	76,0	76,5	--
Độ tinh khiết đơn phân (SEC), %	5°C	98,3	--	98,1	98,3	97,9
	25°C/Độ ẩm tương đối 60%		98,3	97,6	97,6	--

Chất liên quan/Tạp chất: Tổng lượng (SEC), %	5°C	1,7	--	1,9	1,7	2,1
	25°C/Độ ẩm tương đối 60%		1,7	2,4	2,4	--
Độ tinh khiết mAb 126 (CE-SDS, khử), %	5°C	97,8	--	97,4	97,3	97,2
	25°C/Độ ẩm tương đối 60%		97,4	96,9	96,3	--
Tính không đồng nhất điện tích (CEX) [Đỉnh chính], %	5°C	53,9	--	53,0	54,1	55,1
	25°C/Độ ẩm tương đối 60%		56,7	59,7	60,0	--
Tính không đồng nhất điện tích (CEX) [Các biến số axit], %	5°C	13,4	--	15,4	15,3	16
	25°C/Độ ẩm tương đối 60%		15,8	21,4	27,4	--
Tính không đồng nhất điện tích (CEX) [Các biến số kiềm], %	5°C	32,8	--	31,6	30,7	28,9
	25°C/Độ ẩm tương đối 60%		27,5	18,8	13,0	--
Độ pH	5°C	5,7	-	5,7	5,7	5,7
	25°C/Độ ẩm tương đối 60%		5,7	5,7	5,7	--
Dáng vẻ bên ngoài	5°C	NT	Đạt ¹	--	--	Đạt
	25°C/Độ ẩm tương đối 60%		NT	--	--	--
Chất dạng hạt (lớn hơn hoặc tương đương với 10 micrô-mét), hạt trong mỗi đồ chứa	5°C	289	--	131	184	63
	25°C/Độ ẩm tương đối 60%		194	177	369	--
Chất dạng hạt (lớn hơn hoặc tương đương với 25 micrô-mét), hạt trong mỗi đồ chứa	5°C	9	--	8	31	3
	25°C/Độ ẩm tương đối 60%		4	60	20	--

¹ Dấu hiệu dáng vẻ bên ngoài không được tiến hành thực hiện tại thời điểm giải phóng lô hoặc tại thời điểm 1 tháng. Kết quả thể hiện thu được sau khi bảo quản ở nhiệt độ 5°C trong thời gian gần 2,5 tháng.

Danh sách trình tự

SEQ ID NO: 1 (IL-17 người)

MTPGKTSLSV	LLLLLSLEAI	VKAGITIPRN	PGCPNSEDKN	FPRTVMVNLN
IHNRTNTNP	KRSSDYNNRS	TSPWNLHRNE	DPERYPSVIW	EAKCRHLGCI
NADGNVDYHM	NSVPIQQEIL	VLRREPPHCP	NSFRLEKILV	SVGCTCVTPI
VHHVA				

SEQ ID NO: 2 (LCVR)

DIVMTQTPLS	LSVTPGQPAS	ISCRSSRSLV	HSRGNTYLHW	YLQKPGQSPQ
LLIYKVSNR	IGVPDRFSGS	GSGETDFTLKI	SRVEAEDVGV	YYCSQSTHLP
FTFGQGKLE	IK			

SEQ ID NO: 3 (HCVR)

QVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKASGYSFT	DYHIHWVRQA	PGQGLEWMGV
INPMYGTDDY	NQRFKGRVTI	TADESTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARYD
YFTGTGVYWG	QGTLLTVSS			

SEQ ID NO: 4 (Chuỗi nhẹ)

DIVMTQTPLS	LSVTPGQPAS	ISCRSSRSLV	HSRGNTYLHW	YLQKPGQSPQ
LLIYKVSNR	IGVPDRFSGS	GSGETDFTLKI	SRVEAEDVGV	YYCSQSTHLP
FTFGQGKLE	IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL	KSGTASVVCL	LNNFYPREAK
VQWKVDNALQ	SGNSQESVTE	QDSKDYSTSL	SSTLTLSKAD	YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV	TKSFNRGEC			

SEQ ID NO: 5 (Chuỗi nặng)

QVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKASGYSFT	DYHIHWVRQA	PGQGLEWMGV
INPMYGTDDY	NQRFKGRVTI	TADESTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARYD
YFTGTGVYWG	QGTLLTVSSA	STKGPSVFPL	APCSRSTSES	TAALGCLVKD
YFPEPVTWSW	NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG	LYSLSSVTV	PSSSLGKTKY
TCNVDHKPSN	TKVDKRVESK	YGPPCPPCPA	PEFLGGPSVF	LFPPKPKDTL
MISRTPEVTC	VVVDVSQEDP	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTYR
VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPSS	IEKTISKAKG	QPREPQVYTL
PPSQEEMTKN	QVSLTCLVKG	FYPSTIAVEW	ESNGQPENNY	KTTTPVLDSD
GSFFLYSRLT	VDKSRWQEGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSLG

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 80mg/ml đến 150mg/ml, dung dịch đệm xitrat ở nồng độ khoảng 20mM, natri clorua ở nồng độ khoảng 200mM, polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,02% (trọng lượng/thể tích) đến 0,03% (trọng lượng/thể tích) và độ pH khoảng 5,7, trong đó kháng thể kháng IL-17 chứa kháng thể có chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), trong đó chuỗi nhẹ nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và chuỗi nặng nêu trên là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5.
2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng IL-17 bao gồm kháng thể chứa hai chuỗi nhẹ (LC) và hai chuỗi nặng (HC), trong đó mỗi một chuỗi nhẹ là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và mỗi một chuỗi nặng là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5.
3. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó nồng độ của kháng thể kháng IL-17 là 80mg/ml.
4. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nồng độ của polysorbat-80 là 0,03% (trọng lượng/thể tích).
5. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó dược phẩm này là dược phẩm dạng dung dịch chứa kháng thể kháng IL-17.
6. Dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17 ở nồng độ 80mg/ml, dung dịch đệm xitrat ở nồng độ 20 mM, natri clorua ở nồng độ 200 mM, polysorbat-80 ở nồng độ 0,03% và độ pH=5,7, trong đó kháng thể kháng IL-17 bao gồm kháng thể chứa hai chuỗi nhẹ (LC) và hai chuỗi nặng (HC), trong đó mỗi một chuỗi nhẹ là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và mỗi một chuỗi nặng là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5.
7. Dược phẩm dạng dung dịch chứa kháng thể kháng IL-17 ở nồng độ 80mg/ml, dung dịch đệm xitrat ở nồng độ 20mM, natri clorua ở nồng độ 200mM, polysorbat-80 ở nồng độ 0,03% và độ pH=5,7, trong đó kháng thể kháng IL-17 bao gồm kháng thể chứa hai chuỗi nhẹ (LC) và hai chuỗi nặng (HC), trong đó mỗi một chuỗi nhẹ là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và mỗi một chuỗi nặng là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company

<120> Dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-17

<130> X19157

<150> 61/607671

<151> 2012-03-07

<160> 5

<170> Patent In version 3.5

<210> 1

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly
 20 25 30

Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn
 35 40 45

Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser
 50 55 60

Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu
 65 70 75 80

Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His
 85 90 95

Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser
 100 105 110

Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His
 115 120 125

Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys
 130 135 140

Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
145 150 155

<210> 2
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp
<400> 2

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Arg Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ile Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 3
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Arg Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ile Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 5
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
210 215 220

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

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

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

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

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290		295		300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys				
305		310		315 320
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser				
		325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro				
		340	345	350
Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val				
		355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly				
		370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp				
385		390	395	400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp				
		405	410	415
Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His				
		420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly				
		435	440	445