



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

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

(11)



1-0029585

(51)⁷ A61K 39/395; C07K 16/22

(13) B

(21) 1-2013-00484

(22) 11/07/2011

(86) PCT/US2011/043511 11/07/2011

(87) WO/2012/009254 19/01/2012

(30) 61/364,112 14/07/2010 US

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/04/2013 301A

(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)

777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA

(72) Walsh, Scott (US); POTOCKY, Terra (US); DIX, Daniel, B. (US); SIVENDRAN, Renuka (LK).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) DƯỢC PHẨM ĐƯỢC LÀM ỔN ĐỊNH CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG YẾU TỐ
SINH TRƯỞNG THẦN KINH

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể người liên kết đặc hiệu với hNGF. Dược phẩm này có thể chứa, ngoài kháng thể kháng hNGF, ít nhất một chất hoạt động bề mặt không ion, ít nhất một đường, và axetat. Dược phẩm theo sáng chế có mức ổn định của kháng thể gần như không đổi sau khi bảo quản trong vài tháng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực được phẩm chứa kháng thể được dùng trong điều trị. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến lĩnh vực được phẩm chứa kháng thể người liên kết đặc hiệu với yếu tố sinh trưởng thần kinh người (nerve growth factor - NGF).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các đại phân tử dùng để điều trị (ví dụ, các kháng thể) phải được bào chế theo cách mà không chỉ làm cho các phân tử này thích hợp để dùng cho bệnh nhân, mà còn giữ được tính ổn định của chúng trong bảo quản. Ví dụ, các kháng thể trị liệu trong dung dịch lỏng được chứng minh là bị phân hủy, kết tụ và/hoặc biến đổi hóa học không mong muốn trừ khi dung dịch được bào chế một cách hợp lý. Độ ổn định của kháng thể trong chế phẩm lỏng không chỉ phụ thuộc vào loại tá dược được sử dụng trong chế phẩm, mà còn phụ thuộc vào lượng và tỷ lệ của tá dược so với các thành phần khác. Ngoài ra, các yếu tố khác ngoài độ ổn định cũng phải được xem xét khi bào chế chế phẩm dạng lỏng chứa kháng thể. Ví dụ về các yếu tố bổ sung này bao gồm độ nhớt của dung dịch và nồng độ của kháng thể có thể được cung cấp bởi chế phẩm nhất định. Do đó, khi bào chế kháng thể điều trị, phải rất cẩn thận để tạo ra chế phẩm giữ được ổn định, đồng thời chứa nồng độ kháng thể thích hợp, và có độ nhớt thích hợp cũng như các đặc tính khác giúp bệnh nhân dùng chế phẩm một cách thuận lợi.

Các kháng thể kháng hNGF là một ví dụ về đại phân tử liên quan, dùng để điều trị mà cần chế phẩm thích hợp. Các kháng thể kháng NGF hữu ích về mặt lâm sàng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh như viêm khớp xương, đau thần kinh tọa, và các tình trạng bệnh lý khác như chứng đau do viêm, chứng đau do bệnh thần kinh, và chứng đau do bệnh ung thư.

Mặc dù các kháng thể kháng NGF đã được biết đến, nhưng trong lĩnh vực kỹ thuật này vẫn có nhu cầu về được phẩm mới chứa kháng thể kháng hNGF đủ ổn định và cũng thích hợp để dùng cho bệnh nhân.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đáp ứng nhu cầu nêu trên bằng cách cung cấp dược phẩm chứa kháng thể người liên kết đặc hiệu với hNGF. Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các tá dược ngoài kháng thể kháng hNGF. Ví dụ, theo các phương án nhất định, chế phẩm có thể chứa (i) kháng thể người liên kết đặc hiệu với hNGF; (ii) chất hoạt động bề mặt không ion; và (iii) ít nhất một hydratcacbon. Chất hoạt động bề mặt không ion có thể được chọn từ nhóm bao gồm polysorbat 20, polysorbat 80, polyoxyetylen sorbitan monooleat, và polyetylen glycol. Theo một phương án, chất hoạt động bề mặt không ion là polysorbat 20. Hydratcacbon có thể là đường như, *ví dụ*, sucroza, glucoza, manitol, sorbitol, lactoza hoặc trehaloza. Theo một phương án, đường là sucroza.

Theo một phương án, dược phẩm chứa (i) khoảng từ 0,1 đến 100 mg/mL kháng thể người liên kết đặc hiệu với hNGF; (ii) khoảng từ 0,01 đến 1,0 % polysorbat 20; và (iii) khoảng từ 1 đến 20% sucroza.

Theo một phương án, dược phẩm chứa (i) khoảng từ 0,2 đến 75 mg/mL kháng thể người liên kết đặc hiệu với hNGF; (ii) khoảng từ 0,02 đến 0,5 % polysorbat 20; và (iii) khoảng từ 5 đến 10% sucroza.

Theo một phương án, dược phẩm chứa (i) khoảng từ 0,6 đến 60 mg/mL kháng thể người liên kết đặc hiệu với hNGF; (ii) khoảng từ 0,05% polysorbat 20; và (iii) khoảng từ 8% sucroza.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm còn chứa khoảng từ 1,0 mM đến khoảng từ 50 mM axetat.

Theo một phương án, dược phẩm chứa (i) khoảng từ 1 đến 100 mg/mL kháng thể người liên kết đặc hiệu với hNGF; (ii) khoảng từ 0,01 đến 1,0 % polysorbat 20; và (iii) khoảng từ 1 đến 20% sucroza. Theo các phương án nhất định, dược phẩm còn chứa khoảng từ 1,0 mM đến khoảng từ 50 mM axetat.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (i) khoảng từ 5 đến 75 mg/mL kháng thể người liên kết đặc hiệu với hNGF; (ii) khoảng từ 0,02 đến 0,5% polysorbat 20; (iii) khoảng từ 5 đến 10% sucroza; và (iv) khoảng từ 5 đến 20 mM axetat.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (i) khoảng từ 6-60 mg/mL kháng thể người liên kết đặc hiệu với hNGF; (ii) khoảng từ 0,05% polysorbat 20; (iii) khoảng từ 8% sucroza; và (iv) khoảng từ 10 mM axetat.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm cũng có thể chứa ít nhất một axit amin, *ví dụ*, histidin hoặc arginin. Theo các phương án nhất định, nồng độ của histidin hoặc arginin có thể nằm trong khoảng từ 25 mM đến 100 mM.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, chế phẩm được bào chế trong dung dịch đệm có khả năng duy trì độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,6, ví dụ, đệm axetat.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, dược phẩm có độ nhớt nhỏ hơn khoảng 15 cPoazơ, hoặc nhỏ hơn khoảng 12 cPoazơ, hoặc nhỏ hơn khoảng 9 cPoazơ.

Kháng thể có mặt trong dược phẩm theo sáng chế có thể là kháng thể bất kỳ, hoặc protein dung hợp hoặc bất kỳ, liên kết đặc hiệu với hNGF. Ví dụ về kháng thể có thể có mặt trong chế phẩm theo sáng chế là kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (heavy chain variable region - HCVR) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (light chain variable region - LCVR), trong đó HCVR chứa vùng xác định tính bổ trợ của chuỗi nặng (heavy chain complementarity determining region - HCDR) 1 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, HCDR2 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8, và HCDR3 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 10; và trong đó LCVR chứa vùng xác định tính bổ trợ của chuỗi nhẹ (light chain complementarity determining region - LCDR) 1 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 14, a LCDR2 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:16, và LCDR3 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:18.

Theo các phương án nhất định, kháng thể có mặt trong dược phẩm theo sáng chế là kháng thể chứa HCVR có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:20 và LCVR có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:22.

Theo các phương án nhất định, kháng thể có mặt trong dược phẩm theo sáng chế là kháng thể chứa HCVR có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:4 và LCVR có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:12.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm có thể được dùng trong tĩnh mạch hoặc dưới da cho bệnh nhân cần điều trị. Do đó, theo các phương án nhất định, dược phẩm, như được mô tả ở đây, có thể được sử dụng để điều trị, phòng ngừa, hoặc làm thuyên giảm ít nhất một triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn đi kèm với hoạt tính của NGF hoặc sự hoạt hóa NGF. Ví dụ, nhưng không giới hạn phạm vi, về các bệnh và rối loạn có thể được điều trị và/hoặc phòng ngừa bằng cách dùng dược phẩm theo sáng chế bao gồm, chứng đau do tình trạng bệnh lý bất kỳ đi kèm với chứng đau do thần kinh gây ra, đau bệnh thần kinh gây ra, hoặc chứng đau thụ cảm đau. Theo các phương án nhất định của chứng đau do bệnh thần kinh gây ra, được gọi là đau dây thần kinh sinh ba, đau dây thần kinh sau khi mắc bệnh mụn giộp, đau chi ảo, rối loạn gây đau ở cơ và khớp, rối loạn hệ thần kinh thực vật và các tình trạng đau do thần kinh được điều trị. Theo các phương án

khác, chứng đau do bệnh ung thư, cụ thể là, chứng đau do bệnh ung thư xương, viêm khớp xương hoặc chứng đau do viêm khớp dạng thấp, đau lưng dưới, đau do rạch sau khi mổ, đau do gãy xương, đau do gãy xương trong bệnh loãng xương, loãng xương, đau khớp do bệnh gút, bệnh thần kinh do đái tháo đường, chứng đau đi kèm với đau thần kinh tọa, các chứng đau đi kèm với khủng hoảng huyết hồng cầu lưới liềm, đau nửa đầu, và các chứng đau do bệnh thần kinh và/hoặc các chứng đau thụ cảm đau được điều trị bằng chế phẩm được mô tả ở đây.

Các dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế có thể được chứa trong vật chứa bất kỳ thích hợp hữu dụng để bảo quản dược phẩm. Các ví dụ về các vật chứa thích hợp này bao gồm, *ví dụ*, các ống, bơm tiêm hoặc hộp thủy tinh hoặc nhựa. Vật chứa có thể trong suốt hoặc mờ đục (*ví dụ*, tạo màu hồ phách). Theo các phương án nhất định, ống tiêm nhỏ hoặc bơm tiêm được phủ silicon, như silic dioxit. Theo các phương án nhất định, phần không gian đầu trong các ống được nạp đầy khí trơ để thay thế oxy bất kỳ có mặt mà có thể có tác dụng bất lợi đến sự ổn định của kháng thể. Khí trơ này có thể được chọn từ nitơ hoặc argon.

Theo các khía cạnh nhất định của sáng chế, dược phẩm giữ được sự ổn định tương đối sau vài ngày, vài tháng hoặc vài năm bảo quản ở nhiệt độ nhất định. Ví dụ, theo phương án ví dụ nhất định của sáng chế, % cao của kháng thể (*ví dụ*, 90%, 95%, 96% hoặc lớn hơn) được giữ ở dạng tự nhiên sau ít nhất 3, 6, 9 tháng bảo quản hoặc lâu hơn. % của dạng tự nhiên của kháng thể có thể được xác định, *ví dụ*, bằng SE-HPLC, hoặc bằng phương pháp khác bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nhiệt độ bảo quản mà ở đó độ ổn định của kháng thể được giữ có thể là, *ví dụ*, -80°C, -40°C, -30°C, -20°C, 0°C, 5°C, 25°C, 37°C, 45°C, hoặc cao hơn.

Các phương án của của sáng chế sẽ trở lên rõ ràng hơn từ phần mô tả chi tiết dưới đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi sáng chế được mô tả, cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở phương pháp và điều kiện thử nghiệm cụ thể được mô tả, vì phương pháp và điều kiện này có thể thay đổi. Cần hiểu rằng các thuật ngữ chuyên ngành được sử dụng ở đây chỉ cho mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không được dự định là giới hạn, vì phạm vi của sáng chế sẽ được giới hạn bằng các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có nghĩa giống như nghĩa được hiểu bởi người có kỹ năng bình thường trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khoảng" được sử dụng khi đề cập đến giá trị bằng số được trích dẫn cụ thể, có nghĩa rằng giá trị này có thể dao động so với giá trị được trích dẫn không quá 1%. Ví dụ, như được sử dụng ở đây, từ "khoảng 100" bao gồm 99 và 101 và tất cả giá trị nằm giữa hai số này (ví dụ, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, v.v.).

Mặc dù phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, nhưng phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên được mô tả ở đây. Tất cả các ấn phẩm được đề cập ở đây được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn đến toàn bộ phần mô tả của chúng.

Được phẩm

Như được sử dụng ở đây, từ "chế phẩm" chỉ hỗn hợp của ít nhất một thành phần có hoạt tính (ví dụ, phân tử nhỏ, đại phân tử, hợp chất, v.v.. có khả năng tạo ra tác dụng sinh học ở người hoặc động vật không phải là người), và ít nhất một thành phần có không hoạt tính mà, khi được kết hợp với thành phần có hoạt tính và/hoặc một hoặc nhiều thành phần có không hoạt tính bổ sung, thích hợp dùng để điều trị cho người hoặc động vật không phải là người. Thuật ngữ "chế phẩm" như được sử dụng ở đây, có nghĩa là "được phẩm" trừ khi có quy định cụ thể khác. Sáng chế đề xuất chế phẩm chứa ít nhất một polypeptit trị liệu. Theo các phương án nhất định của sáng chế, polypeptit trị liệu là kháng thể liên kết đặc hiệu với hNGF hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Cụ thể hơn, sáng chế bao gồm chế phẩm chứa: (i) kháng thể người liên kết đặc hiệu với hNGF; (ii) chất hoạt động bề mặt không ion; và (iii) ít nhất một hydratecacbon. Ví dụ cụ thể về các thành phần và các chế phẩm được bao gồm trong sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, "chất hoạt động bề mặt" có thể là chất hoạt động bề mặt không ion được chọn từ nhóm bao gồm polysorbat 20, polysorbat 80, polyoxyetylen sorbitan monooleat, và polyetylen glycol.

Chế phẩm theo sáng chế có thể, theo các phương án nhất định, là chế phẩm dạng dịch. Như được sử dụng ở đây, từ "chế phẩm dạng dịch" chỉ hỗn hợp của ít nhất hai thành phần mà tồn tại chủ yếu ở trạng thái lỏng ở nhiệt độ khoảng từ 5°C đến 45°C. Các chế phẩm dạng dịch bao gồm, trong số các chế phẩm khác, chế phẩm lỏng. Các chế phẩm

dạng dịch có thể có độ nhớt thấp, trung bình hoặc cao, tùy thuộc vào thành phần cụ thể của chúng.

Các kháng thể liên kết đặc hiệu với nNGF

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa kháng thể người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với hNGF. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "hNGF" chỉ yếu tố sinh trưởng thần kinh người có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, mà được mã hóa bởi trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1.

Thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng ở đây, thường được dự định để chỉ phân tử globulin miễn dịch chứa bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (heavy - H) và hai chuỗi nhẹ (light - L) liên kết với nhau bằng liên kết disulfua, cũng như các multime của chúng (ví dụ, IgM); tuy nhiên, phân tử globulin miễn dịch chứa chỉ các chuỗi nặng (nghĩa là, thiếu các chuỗi nhẹ) cũng được bao gồm trong định nghĩa của thuật ngữ "kháng thể." Mỗi chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (ở đây viết tắt là HCVR hoặc V_H) và vùng cố định của chuỗi nặng. Vùng cố định của chuỗi nặng chứa ba vùng, C_{H1} , C_{H2} và C_{H3} . Mỗi chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (ở đây viết tắt là LCVR hoặc V_L) và vùng cố định của chuỗi nhẹ. Vùng cố định của chuỗi nhẹ chứa một miền (CL1). Vùng V_H và V_L có thể còn được chia tiếp thành các vùng siêu biến, được gọi bằng thuật ngữ vùng xác định tính bổ trợ (complementary determining region - CDR), xen giữa bằng các vùng được bảo toàn ở mức độ lớn hơn, được gọi bằng thuật ngữ vùng khung làm việc (framework region - FR). Mỗi V_H và V_L được cấu thành từ ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Trừ khi có quy định cụ thể khác, thuật ngữ "kháng thể" như được sử dụng ở đây, nên được hiểu là bao gồm các phân tử kháng thể hoàn chỉnh cũng như mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể, và các thuật ngữ tương tự, như được sử dụng ở đây, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ xuất hiện trong tự nhiên, có thể thu được bằng cách sử dụng enzym, tổng hợp và được xử lý kỹ thuật gen mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên tạo ra phức chất. Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, hoặc "mảnh kháng thể", như được sử dụng ở đây, chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể giữ lại được khả năng liên kết đặc hiệu với hNGF.

"Kháng thể đã phân lập", như được sử dụng ở đây, được dự định để chỉ kháng thể gần như không chứa kháng thể khác có tính đặc hiệu với kháng nguyên khác (ví dụ,

kháng thể đã phân lập liên kết đặc hiệu hNGF gần như không chứa kháng thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên không phải là hNGF).

Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" hoặc các thuật ngữ tương tự, có nghĩa rằng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tạo thành phức chất với kháng nguyên mà ổn định tương đối trong các điều kiện sinh lý. Liên kết đặc hiệu có thể đặc trưng bởi hằng số phân ly ít nhất vào khoảng 1×10^{-6} M hoặc lớn hơn. Các phương pháp để xác định xem liệu hai phân tử có liên kết đặc hiệu với nhau không đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm, ví dụ, thẩm tích cân bằng, cộng hưởng plasmon bề mặt, và các phương pháp tương tự. Tuy nhiên, kháng thể đã phân lập liên kết đặc hiệu hNGF có thể có tính phản ứng chéo với các kháng nguyên khác, như các phân tử NGF từ các loài khác. Trong nội dung của sáng chế, các kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu đôi) liên kết với hNGF cũng như một hoặc nhiều kháng nguyên bổ sung được coi là "liên kết đặc hiệu" với hNGF. Ngoài ra, kháng thể đã phân lập có thể gần như không chứa các nguyên liệu tế bào và/hoặc các hóa chất khác.

Ví dụ về các kháng thể kháng hNGF có thể bao gồm trong chế phẩm theo sáng chế được nêu trong US 20090041717, phần mô tả của tài liệu này được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của nó.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng hNGF, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa HCDR1 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, HCDR2 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8, và HCDR3 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng hNGF, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa LCDR1 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 14, LCDR2 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16, và LCDR3 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 18.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng hNGF, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa các miền HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3, tương ứng, được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6 – 8 – 10/giấyEQ ID NO: 14 – 16 – 18.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng hNGF, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, và 20. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng hNGF, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm

SEQ ID NO:12 và 22. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng hNGF, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa cặp trình tự axit amin của HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:4/12; và 20/22.

Ví dụ, nhưng không phải giới hạn phạm vi, về kháng thể được sử dụng trong Các ví dụ ở đây được đề cập là "mAb1". Kháng thể này cũng được đề cập trong US 20090041717 và như được mô tả ở đây, chứa cặp trình tự axit amin của HCVR/LCVR có SEQ ID NO: 20/22, và các miền HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3 được thể hiện bằng SEQ ID NO:6 – 8 – 10/giâyEQ ID NO:14 – 16 – 18.

Lượng kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có mặt trong chế phẩm theo sáng chế có thể thay đổi phụ thuộc vào các đặc tính cụ thể được mong muốn của chế phẩm, cũng như hoàn cảnh cụ thể và mục đích mà chế phẩm được dự định sử dụng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm có thể chứa khoảng 0,01 mg/mL đến 500 mg/mL kháng thể; khoảng 1 mg/mL đến 500 mg/mL kháng thể; khoảng 5 mg/mL đến 400 mg/mL kháng thể; khoảng 5 mg/mL đến 200 mg/mL kháng thể; khoảng 25 mg/mL đến 180 mg/mL kháng thể; khoảng 25 mg/mL đến 150 mg/mL kháng thể; hoặc khoảng 50 mg/mL đến 180 mg/mL kháng thể. Theo các phương án nhất định, chế phẩm có thể chứa khoảng 0,1 mg/mL đến 100 mg/mL kháng thể; khoảng 0,2 mg/mL đến 75 mg/mL kháng thể; khoảng 0,6 mg/mL đến 60 mg/mL kháng thể. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa khoảng 0,1 mg/mL; khoảng 0,2 mg/mL; khoảng 0,6 mg/mL; khoảng 1 mg/mL; khoảng 2 mg/mL; khoảng 5 mg/mL; khoảng 10 mg/mL; khoảng 15 mg/mL; khoảng 20 mg/mL; khoảng 25 mg/mL; khoảng 30 mg/mL; khoảng 35 mg/mL; khoảng 40 mg/mL; khoảng 45 mg/mL; khoảng 50 mg/mL; khoảng 55 mg/mL; khoảng 60 mg/mL; khoảng 65 mg/mL; khoảng 70 mg/mL; khoảng 75 mg/mL; khoảng 80 mg/mL; khoảng 85 mg/mL; khoảng 86 mg/mL; khoảng 87 mg/mL; khoảng 88 mg/mL; khoảng 89 mg/mL; khoảng 90 mg/mL; khoảng 95 mg/mL; khoảng 100 mg/mL; khoảng 105 mg/mL; khoảng 110 mg/mL; khoảng 115 mg/mL; khoảng 120 mg/mL; khoảng 125 mg/mL; khoảng 130 mg/mL; khoảng 131 mg/mL; khoảng 132 mg/mL; khoảng 133 mg/mL; khoảng 134 mg/mL; khoảng 135 mg/mL; khoảng 140 mg/mL; khoảng 145 mg/mL; khoảng 150 mg/mL; khoảng 155 mg/mL; khoảng 160 mg/mL; khoảng 165 mg/mL; khoảng 170 mg/mL; khoảng 175 mg/mL; khoảng 180 mg/mL; khoảng 185 mg/mL; khoảng 190 mg/mL; khoảng 195 mg/mL; hoặc khoảng 200 mg/mL của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với hNGF.

Tá dược và độ pH

Chế phẩm theo sáng chế chứa một hoặc nhiều tá dược. Thuật ngữ "tá dược" như được sử dụng ở đây, chỉ chất bất kỳ không dùng để điều trị được bổ sung vào chế phẩm để tạo ra độ đặc, độ nhớt mong muốn hoặc cho tác dụng làm ổn định.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm theo sáng chế chứa chất đệm thích hợp để giữ độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,6. Ví dụ về chất đệm thích hợp để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm, *ví dụ*, đệm axetat. Theo một phương án, đệm axetat được pha chế ở nồng độ 10mM.

Lượng axetat có mặt trong chế phẩm theo sáng chế có thể thay đổi từ khoảng 1 mM đến 50 mM; khoảng từ 2 mM đến 20 mM; khoảng từ 3 mM đến 12 mM; hoặc khoảng 10 mM.

Chế phẩm theo sáng chế có thể cũng chứa một hoặc nhiều hydratcacbon, *ví dụ*, một hoặc nhiều đường. Đường có thể là đường khử hoặc đường không khử. "Đường khử" bao gồm, *ví dụ*, các đường có nhóm keton hoặc aldehyt và chứa nhóm hemiaxetal để phản ứng, cho phép đường tác động dưới dạng chất khử. Ví dụ cụ thể về các đường khử bao gồm fructoza, glucoza, glyxeraldehyt, lactoza, arabinoza, manozo, xyloza, riboza, rhamnoza, galactoza và maltoza. Các đường không khử có thể chứa cacbon anome là axetal và hầu như không phản ứng với axit amin hoặc polypeptit để khởi động phản ứng Maillard. Ví dụ cụ thể về đường không khử bao gồm sucroza, trehaloza, sorboza, sucraloza, sorbitol, melezitoza và rafinoza. Các axit đường bao gồm, ví dụ, axit sacaric, gluconat và các polyhydroxy đường khác và muối của nó.

Lượng đường có mặt trong chế phẩm theo sáng chế có thể thay đổi phụ thuộc vào hoàn cảnh cụ thể và mục đích mà chế phẩm được dự định sử dụng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm có thể chứa khoảng từ 0,1% đến 20% đường; khoảng từ 0,5% đến 20% đường; khoảng từ 1% đến 20% đường; khoảng từ 2% đến 15% đường; khoảng từ 3% đến 10% đường; khoảng từ 4% đến 10% đường; hoặc khoảng từ 5% đến 10% đường. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa khoảng 0,5%; khoảng 1,0%; khoảng 1,5%; khoảng 2,0%; khoảng 2,5%; khoảng 3,0%; khoảng 3,5%; khoảng 4,0%; khoảng 4,5%; khoảng 5,0%; khoảng 5,5%; khoảng 6,0%; 6,5%; khoảng 7,0%; khoảng 7,5%; khoảng 8,0%; khoảng 8,5%; khoảng 9,0%; khoảng 9,5%; khoảng 10,0%; khoảng 10,5%; khoảng 11,0%; khoảng 11,5%; khoảng 12,0%; khoảng 12,5%; khoảng 13,0%; khoảng 13,5%; khoảng 14,0%; khoảng 14,5%; khoảng 15,0%; khoảng 15,5%; khoảng 16,0%; 16,5%; khoảng 17,0%; khoảng 17,5%; khoảng 18,0%; khoảng 18,5%; khoảng 19,0%; khoảng 19,5%; hoặc khoảng 20,0% đường (*ví dụ*, sucroza).

Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất hoạt động bề mặt" chỉ hợp chất làm giảm sức căng bề mặt của dịch mà nó được hòa tan và/hoặc làm giảm sức căng của bề mặt chung giữa dầu và nước. Các chất hoạt động bề mặt có thể điện ly (ion) hoặc không điện ly (không ion). Ví dụ về chất hoạt động bề mặt không ion có thể được bao gồm trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm, *ví dụ*, alkyl poly(etylen oxit), alkyl polyglucosit (*ví dụ*, octyl glucosit và dexyl maltosit), các rượu béo như rượu xetylic và rượu oleylic, cocamit MEA, cocamit DEA, và cocamit TEA. Chất hoạt động bề mặt không ion cụ thể có thể được bao gồm trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm, *ví dụ*, các polysorbat như polysorbat 20, polysorbat 28, polysorbat 40, polysorbat 60, polysorbat 65, polysorbat 80, polysorbat 81, và polysorbat 85; các poloxame như poloxame 188, poloxame 407; polyetylen-polypropylen glycol; hoặc polyetylen glycol (PEG). Polysorbat 20 cũng được biết là TWEEN 20, sorbitan monolaurat và polyoxyetylsorbitan monolaurat.

Lượng chất hoạt động bề mặt có mặt trong chế phẩm theo sáng chế có thể thay đổi phụ thuộc vào các đặc tính cụ thể được mong muốn của chế phẩm, cũng như hoàn cảnh cụ thể và mục đích mà chế phẩm được dự định sử dụng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm có thể chứa khoảng từ 0,01% đến 10% chất hoạt động bề mặt; khoảng từ 0,05% đến 5% chất hoạt động bề mặt; hoặc khoảng từ 0,1% đến 1% chất hoạt động bề mặt. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa khoảng từ 0,01%; khoảng 0,02%; khoảng 0,03%; khoảng 0,04%; khoảng 0,05%; khoảng 0,06%; khoảng 0,07%; khoảng 0,08%; khoảng 0,09%; khoảng 0,10%; khoảng 0,11%; khoảng 0,12%; khoảng 0,13%; khoảng 0,14%; khoảng 0,15%; khoảng 0,16%; khoảng 0,17%; khoảng 0,18%; khoảng 0,19%; khoảng 0,20%; khoảng 0,21%; khoảng 0,22%; khoảng 0,23%; khoảng 0,24%; khoảng 0,25%; khoảng 0,26%; khoảng 0,27%; khoảng 0,28%; khoảng 0,29%; hoặc khoảng 0,30% chất hoạt động bề mặt (*ví dụ*, polysorbat 20).

Chế phẩm theo sáng chế có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế có thể có độ pH khoảng 4,2; khoảng 4,4; khoảng 4,6; khoảng 4,8; khoảng 5,0; khoảng 5,2; khoảng 5,4; khoảng 5,6; khoảng 5,8; hoặc khoảng 6,0.

Ví dụ về chế phẩm

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm chứa: (i) kháng thể người liên kết đặc hiệu với hNGF (*ví dụ*, mAb1); (ii) axetat; và (iii) đường (*ví dụ*, sucroza). Ví dụ cụ thể nhưng không giới hạn phạm vi, về các phương án được bao gồm trong khía cạnh này của sáng chế được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1

Ví dụ về chế phẩm chứa mAb1, axetat và sucroza																
mAb1 (mg/ml)	5	50	100	150	5	50	100	150	5	50	100	150	5	50	100	150
axetat (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
sucroza (%)	2	2	2	2	4	4	4	4	6	6	6	6	8	8	8	8

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm chứa: (i) kháng thể người liên kết đặc hiệu với hNGF (ví dụ, mAb1); (ii) axetat; (iii) đường (ví dụ, sucroza); và (iv) chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20). Ví dụ cụ thể, nhưng không giới hạn phạm vi, về các phương án được bao gồm trong khía cạnh này của sáng chế được nêu trong Bảng 2A và 2B.

Bảng 2A

Ví dụ về chế phẩm chứa mAb1, axetat, sucroza và polysorbat 20													
mAb1 (mg/ml)	5	50	100	150	5	50	100	150	5	50	100	150	150
axetat (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
sucroza (%)	2	2	2	2	4	4	4	4	8	8	8	8	8
polysorbat 20 (%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

Bảng 2B

Ví dụ về chế phẩm chứa mAb1, axetat, sucroza và polysorbat 20													
mAb1 (mg/ml)	5	50	100	150	5	50	100	150	5	50	100	150	150
axetat (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
sucroza (%)	2	2	2	2	4	4	4	4	8	8	8	8	8
polysorbat 20 (%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm chứa: (i) kháng thể người liên kết đặc hiệu với hNGF (ví dụ, mAb1); (ii) axetat; (iii) đường (ví dụ, sucroza); (iv) chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20); (v) axit amin thứ nhất (ví dụ, histidin) và (v) axit amin thứ hai (ví dụ, arginin). Ví dụ cụ thể, nhưng không giới hạn phạm vi, về các phương án được bao gồm trong khía cạnh này của sáng chế được nêu trong Bảng 3A, 3B, 3C, 3D, 3E và 3F.

Bảng 3A

Ví dụ về chế phẩm chứa mAb1, axetat, histidin, sucroza, polysorbat 20 và arginin													
mAb1 (mg/ml)	5	50	100	150	5	50	100	150	5	50	100	150	150
axetat (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
histidin (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
sucroza (%)	2	2	2	2	4	4	4	4	8	8	8	8	8
polysorbat 20 (%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
arginin (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Bảng 3B

Ví dụ về chế phẩm chứa mAb1, axetat, histidin, sucroza, polysorbat 20 và arginin													
mAb1 (mg/ml)	5	50	100	150	5	50	100	150	5	50	100	150	150
Axetat (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
histidin (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
sucroza (%)	2	2	2	2	4	4	4	4	8	8	8	8	8
polysorbat 20 (%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

arginin (mM)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
--------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Bảng 3C

Ví dụ về chế phẩm chứa mAb1, axetat, histidin, sucroza, polysorbat 20 và arginin												
mAb1 (mg/ml)	5	50	100	150	5	50	100	150	5	50	100	150
axetat (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
histidin (mM)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
sucroza (%)	2	2	2	2	4	4	4	4	8	8	8	8
polysorbat 20 (%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
arginin (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Bảng 3D

Ví dụ về chế phẩm chứa mAb1, axetat, histidin, sucroza, polysorbat 20 và arginin												
mAb1 (mg/ml)	5	50	100	150	5	50	100	150	5	50	100	150
axetat (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
histidin (mM)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
sucroza (%)	2	2	2	2	4	4	4	4	8	8	8	8
polysorbat 20 (%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
arginin (mM)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

Bảng 3E

Ví dụ về chế phẩm chứa mAb1, axetat, histidin, sucroza, polysorbat 20 và arginin												
mAb1 (mg/ml)	5	50	100	150	5	50	100	150	5	50	100	150
axetat (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
histidin (mM)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
sucroza (%)	2	2	2	2	5	5	5	5	10	10	10	10
polysorbat 20 (%)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
arginin (mM)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Bảng 3F

Ví dụ về chế phẩm chứa mAb1, axetat, histidin, sucroza, polysorbat 20 và arginin												
mAb1 (mg/ml)	5	50	100	150	5	50	100	150	5	50	100	150
axetat (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
histidin (mM)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
sucroza (%)	2	2	2	2	5	5	5	5	10	10	10	10
polysorbat 20 (%)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
arginin (mM)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

Theo các khía cạnh nhất định của sáng chế, chế phẩm chứa kháng thể có thể chứa kháng thể kháng hNGF ở nồng độ khoảng 20 mg/mL trong khoảng 10mM axetat, cộng khoảng 1,0% polyetylen glycol 3350 (PEG 3350), và khoảng 20% sucroza ở độ pH bằng khoảng 5,0. Theo một phương án, chế phẩm chứa kháng thể được dùng trong tĩnh mạch. Theo một phương án, chế phẩm chứa kháng thể được dùng dưới da.

Các ví dụ không giới hạn phạm vi khác về chế phẩm được nằm trong phạm vi của sáng chế được nêu ở đây, bao gồm Các ví dụ điều chế được nêu dưới đây.

Độ ổn định và độ nhớt của chế phẩm

Chế phẩm theo sáng chế thường có mức ổn định cao. Thuật ngữ "ổn định" như được sử dụng ở đây khi đề cập đến chế phẩm, có nghĩa là các kháng thể trong chế phẩm

giữ được cấu trúc và/hoặc chức năng và/hoặc hoạt tính sinh học ở mức chấp nhận được sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định. Chế phẩm có thể ổn định ngay cả khi kháng thể có mặt trong đó không giữ được 100% cấu trúc và/hoặc chức năng và/hoặc hoạt tính sinh học của nó sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định. Trong các trường hợp nhất định, cấu trúc và/hoặc chức năng và/hoặc hoạt tính sinh học của kháng thể giữ lại được khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98% hoặc khoảng 99% sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định có thể được coi là "ổn định".

Độ ổn định có thể được xác định, trong số nhiều cách khác, bằng cách xác định % kháng thể tự nhiên còn lại trong chế phẩm sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định ở một nhiệt độ nhất định. % kháng thể tự nhiên có thể được xác định bằng, trong số nhiều cách khác, sắc ký loại theo kích thước (*ví dụ*, sắc ký lỏng hiệu năng cao loại theo kích thước (size exclusion high performance liquid chromatography - SE-HPLC). Khi cụm từ "mức chấp nhận được của độ ổn định" được dùng có nghĩa là ít nhất 90% dạng tự nhiên của kháng thể có thể được phát hiện trong chế phẩm sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định ở một nhiệt độ nhất định. Theo các phương án nhất định, ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% dạng tự nhiên của kháng thể có thể được phát hiện trong chế phẩm sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian xác định ở một nhiệt độ nhất định. Khoảng thời gian xác định mà sau đó độ ổn định được xác định có thể ít nhất là 1 tháng, ít nhất là 2 tháng, ít nhất là 3 tháng, ít nhất là 4 tháng, ít nhất là 5 tháng, ít nhất là 6 tháng, ít nhất là 7 tháng, ít nhất là 8 tháng, ít nhất 9 là tháng, ít nhất là 10 tháng, ít nhất là 11 tháng, ít nhất là 12 tháng, ít nhất là 18 tháng, ít nhất là 24 tháng, hoặc lâu hơn. Nhiệt độ mà ở đó chế phẩm có thể được bảo quản khi đánh giá độ ổn định có thể nhiệt độ bất kỳ nằm trong khoảng từ -80°C đến 45°C, *ví dụ*, bảo quản ở khoảng -30°C, khoảng -20°C, khoảng 0°C, khoảng 5°C, khoảng 25°C, khoảng 37°C, hoặc khoảng 45°C. Ví dụ, chế phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau 3 tháng bảo quản ở 5°C, lượng kháng thể tự nhiên lớn hơn khoảng 90%, 95%, 96% hoặc 97% khi được phát hiện bằng SE-HPLC. Chế phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau 6 tháng bảo quản ở 5°C, lượng kháng thể tự nhiên lớn hơn khoảng 90%, 95%, 96% hoặc 97% khi được phát hiện bằng SE-HPLC. Chế phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau 9 tháng bảo quản ở 5°C, lượng kháng thể tự nhiên lớn hơn khoảng 90%, 95%, 96% hoặc 97% khi được phát hiện bằng SE-HPLC. Chế phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau 3 tháng bảo quản ở 25°C, lượng kháng thể tự nhiên lớn hơn khoảng

90%, 95%, 96% hoặc 97 khi được phát hiện bằng SE-HPLC. Chế phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau 6 tháng bảo quản ở 25°C, lượng kháng thể tự nhiên lớn hơn khoảng 90%, 95%, 96% hoặc 97 khi được phát hiện bằng SE-HPLC. Chế phẩm cũng có thể được coi là ổn định nếu sau 9 tháng bảo quản ở 25°C, lượng kháng thể tự nhiên lớn hơn khoảng 90%, 95%, 96% hoặc 97 khi được phát hiện bằng SE-HPLC.

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

Độ ổn định cũng có thể được đánh giá bằng cách xác định hoạt tính sinh học và/hoặc ái lực liên kết của kháng thể với đích của nó. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế có thể được coi là ổn định, nếu bảo quản ở *ví dụ*, 5°C, 25°C, 37°C, 45°C, v.v.. trong một khoảng thời gian xác định (*ví dụ*, từ 1 đến 12 hoặc 18 tháng), kháng thể kháng hNGF có mặt trong chế phẩm liên kết với hNGF với ái lực ít nhất bằng 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, hoặc lớn hơn ái lực liên kết của kháng thể trước khi bảo quản. Các phương pháp khác để đánh giá độ ổn định của kháng thể trong chế phẩm được thể hiện trong phần Các ví dụ được nêu dưới đây.

Ở dạng dịch, chế phẩm theo sáng chế có thể, theo các phương án nhất định, có độ nhớt ở mức thấp đến trung bình. "Độ nhớt" như được sử dụng ở đây có thể "độ nhớt động học" hoặc "độ nhớt tuyệt đối". "Độ nhớt động học" là giá trị đo dòng chống lại tác động của trọng lực. Khi hai dịch lỏng có thể tích bằng nhau được đặt vào nhớt kế ống mao dẫn giống nhau và cho phép chảy nhờ trọng lực, dịch nhớt hơn sẽ mất nhiều thời gian hơn để chảy qua ống mao dẫn. Ví dụ, nếu một dịch mất 200 giây để chảy và dịch khác mất 400 giây thì dịch thứ hai sẽ nhớt gấp hai lần dịch thứ nhất tính theo thang điểm độ nhớt động học. "Độ nhớt tuyệt đối", thỉnh thoảng được gọi là độ nhớt động lực học hoặc độ nhớt đơn thuần, là kết quả của độ nhớt động học và tỷ trọng của dịch (Độ nhớt tuyệt đối = Độ nhớt động học x tỷ trọng). Chiều của độ nhớt động học là L^2/T , trong đó L là chiều dài và T là thời gian. Thông thường, độ nhớt động học được biểu thị bằng centistoc (cSt). Đơn vị SI của động học độ nhớt là mm²/giây, bằng 1 cSt. Độ nhớt tuyệt đối được biểu thị bằng

đơn vị centipoazơ (cP). Đơn vị SI của độ nhớt tuyệt đối là (mPa-s), trong đó $1 \text{ cP} = 1 \text{ mPa-s}$.

Như được sử dụng ở đây, độ nhớt ở mức thấp, khi đề cập đến chế phẩm theo sáng chế ở dạng dịch, sẽ có độ nhớt tuyệt đối nhỏ hơn 20 cP. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế ở dạng dịch sẽ được coi là có "độ nhớt thấp" nếu, khi đo sử dụng kỹ thuật đo độ nhớt tiêu chuẩn, chế phẩm có độ nhớt tuyệt đối khoảng 19 cP, khoảng 18 cP, khoảng 17 cP, khoảng 16 cP, khoảng 15 cP, khoảng 14 cP, khoảng 13 cP, khoảng 12 cP, khoảng 11 cP, khoảng 10 cP, khoảng 9 cP, khoảng 8 cP, khoảng 7 cP, khoảng 6 cP, khoảng 5 cP, khoảng 4 cP, hoặc nhỏ hơn. Như được sử dụng ở đây, độ nhớt ở mức trung bình, khi đề cập đến chế phẩm theo sáng chế ở dạng dịch, sẽ có độ nhớt tuyệt đối nằm trong khoảng từ 30 cP đến 20 cP. Ví dụ, chế phẩm dạng dịch của sáng chế chế phẩm theo sáng chế ở dạng dịch sẽ được coi là có "độ nhớt trung bình" nếu, khi đo sử dụng kỹ thuật đo độ nhớt tiêu chuẩn, chế phẩm có độ nhớt tuyệt đối khoảng 30 cP, khoảng 29 cP, khoảng 28 cP, khoảng 27 cP, khoảng 26 cP, khoảng 25 cP, khoảng 24 cP, khoảng 23 cP, khoảng 22 cP, khoảng 21 cP hoặc khoảng 20 cP.

Như được minh họa trong Ví dụ 5 dưới đây, các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng các chế phẩm dạng dịch chứa kháng thể kháng hNGF ở nồng độ cao (ví dụ, lên tới ít nhất là từ 125 đến 150 mg/mL) có thể thu được bằng cách bào chế theo công thức kháng thể với 25 mM histidin và từ 25 mM đến 100 mM arginin. Ngoài ra, cũng phát hiện ra rằng độ nhớt của chế phẩm có thể được làm giảm xuống mức thấp hơn bằng cách làm giảm hàm lượng sucroza.

Vật chứa dùng để chứa chế phẩm và phương pháp dùng

Chế phẩm theo sáng chế có thể có mặt trong vật chứa bất kỳ thích hợp để bảo quản thuốc và các chế phẩm khác dùng để điều trị. Ví dụ, chế phẩm có thể có mặt trong vật chứa bằng nhựa hoặc thủy tinh, kín và vô trùng, có thể tích xác định như ống tiêm liều nhỏ, ống tiêm liều lớn, bơm tiêm, hộp hoặc chai. Các loại ống tiêm liều nhỏ khác nhau có thể được sử dụng để chứa chế phẩm theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các ống tiêm liều nhỏ trong suốt và mờ đục (ví dụ, màu hổ phách) bằng nhựa hoặc thủy tinh. Theo cách khác, loại bơm tiêm bất kỳ có thể được sử dụng để chứa và/hoặc dùng chế phẩm theo sáng chế. Chế phẩm trong vật chứa có thể được xử lý sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để loại bỏ oxy để cải thiện độ ổn định của kháng thể nếu cần. Oxy

trong không gian đầu của vật chứa (khoảng không chứa khí nằm trên chất lỏng trong vật chứa kín) có thể được thay thế bằng khí trơ, như nitơ hoặc argon.

Chế phẩm theo sáng chế có thể có mặt trong bơm tiêm "vonfram thông thường" hoặc bơm tiêm "vonfram thấp". Như được hiểu bởi người có kỹ năng bình thường trong lĩnh vực kỹ thuật này, quy trình sản xuất bơm tiêm bằng thủy tinh thường liên quan đến việc sử dụng sợi vonfram nóng có chức năng đâm xuyên thủy tinh, theo cách đó tạo ra lỗ để chất lỏng chảy qua và đi ra khỏi bơm tiêm. Quy trình này tạo ra sự lắng cặn của một lượng rất nhỏ vonfram trên bề mặt bên trong của bơm tiêm. Bước rửa sau đó và các bước xử lý khác có thể được sử dụng để làm giảm lượng vonfram trong bơm tiêm. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vonfram thông thường" có nghĩa là bơm tiêm chứa lớn hơn 500 phần trên tỉ (ppb) vonfram. Thuật ngữ "vonfram thấp" có nghĩa là bơm tiêm chứa nhỏ hơn 500 ppb vonfram. Ví dụ, bơm tiêm vonfram thấp, theo sáng chế, có thể chứa nhỏ hơn khoảng 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 hoặc vài ppb vonfram.

Các pittông cao su được sử dụng trong các bơm tiêm, và các nút cao su được sử dụng làm kín miệng ống tiêm liều nhỏ, có thể được phủ ngoài để phòng ngừa thuốc trong bơm tiêm hoặc ống tiêm liều nhỏ nhiễm khuẩn và/hoặc để duy trì độ ổn định của chúng. Do đó, chế phẩm theo sáng chế, theo các phương án nhất định, có thể có mặt trong bơm tiêm chứa pittông được phủ, hoặc bên trong ống tiêm liều nhỏ được làm kín bằng một nút cao su được phủ. Ví dụ, pittông hoặc nút có thể được phủ lớp màng flocacbon. Các ví dụ về nút và/hoặc pittông thích hợp để sử dụng cho ống tiêm liều nhỏ và bơm tiêm chứa chế phẩm theo sáng chế được đề cập trong, *ví dụ*, bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số 4,997,423; 5,908,686; 6,286,699; 6,645,635; và 7,226,554, nội dung của các bằng độc quyền sáng chế này được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của chúng. Ví dụ cụ thể về pittông hoặc nút cao su được phủ có thể được sử dụng trong nội dung sáng chế là sản phẩm được bán trên thị trường với tên thương mại "FluroTec®," do West Pharmaceutical Services, Inc. (Lionville, PA) cung cấp.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, chế phẩm có thể có mặt trong bơm tiêm vonfram thấp chứa pittông phủ lớp màng flocacbon. Tuy nhiên, như được thể hiện trong phần Các ví dụ dưới đây, kháng thể kháng NGF theo sáng chế dường như ổn định trong tổ hợp bất kỳ giữa bơm tiêm và pittông được thử nghiệm.

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

Việc sử dụng thiết bị vi truyền để phân phối chế phẩm theo sáng chế cũng được bao gồm trong sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "thiết bị vi truyền" chỉ thiết bị phân phối dưới da được thiết kế để dùng từ từ một thể tích lớn (ví dụ, lên đến 2,5 mL hoặc nhiều hơn) chế phẩm để điều trị trong một khoảng thời gian kéo dài (ví dụ, khoảng 10, 15, 20, 25, 30 phút hoặc lâu hơn). Xem, ví dụ, U.S. 6,629,949; US 6,659,982; và Meehan *et al.*, *J. Controlled Release* 46:107-116 (1996). Thiết bị vi truyền đặc biệt hữu ích để phân phối các liều lớn protein trị liệu có mặt với nồng độ cao (ví dụ, khoảng 100, 125, 150, 175, 200 mg/mL hoặc lớn hơn) và/hoặc các dung dịch nhớt.

Sử dụng chế phẩm trong điều trị

Chế phẩm theo sáng chế hữu ích, trong số các tác dụng khác, để điều trị, phòng ngừa và/hoặc bất kỳ bệnh hoặc rối loạn đi kèm với hoạt tính của NGF. Các bệnh và rối loạn được lấy làm ví dụ, nhưng không phải là giới hạn phạm vi, có thể được điều trị và/hoặc phòng ngừa bằng cách dùng chế phẩm theo sáng chế bao gồm, chứng đau do tình trạng bệnh lý bất kỳ đi kèm với chứng đau do thần kinh gây ra, chứng đau do bệnh thần

kinh gây ra và chứng đau thụ cảm đau. Theo các phương án nhất định của chứng đau do bệnh thần kinh, được gọi là đau dây thần kinh sinh ba, đau dây thần kinh sau khi mắc bệnh mụn giộp, đau chi ảo, rối loạn gây đau ở cơ và khớp, rối loạn hệ thần kinh thực vật và các tình trạng đau do thần kinh được điều trị. Theo các phương án khác, chứng đau do bệnh ung thư, cụ thể là, chứng đau do bệnh ung thư xương, viêm khớp xương hoặc chứng đau do viêm khớp dạng thấp, đau lưng dưới, đau do rạch sau khi mổ, đau do gãy xương, đau do gãy xương trong bệnh loãng xương, loãng xương, đau khớp do bệnh gút, bệnh thần kinh do đái tháo đường, chứng đau đi kèm với đau thần kinh tọa, các chứng đau đi kèm với khủng hoảng huyết hồng cầu lưỡi liềm, đau nửa đầu, và các chứng đau do bệnh thần kinh và/hoặc các chứng đau thụ cảm đau được ưu tiên điều trị. Do đó, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị, phòng ngừa, và/hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn bất kỳ đi kèm với hoạt tính của NGF hoặc sự hoạt hóa NGF (bao gồm bệnh hoặc rối loạn và tình trạng bệnh bất kỳ được lấy làm ví dụ ở trên) bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế. Phương pháp điều trị theo sáng chế bao gồm việc dùng cho đối tượng bất kỳ dùng chế phẩm chứa kháng thể kháng hNGF như được mô tả ở đây. Đối tượng được dùng chế phẩm có thể là, *ví dụ*, người hoặc động vật bất kỳ không phải là người cần điều trị, phòng ngừa và/hoặc làm thuyên giảm, hoặc đối tượng có thu lợi từ việc ức chế hoặc làm giảm hoạt tính NGF và/hoặc hoạt tính được điều chỉnh bởi NGF. Ví dụ, đối tượng có thể là cá thể được chẩn đoán mắc, hoặc đối tượng được xem là có nguy cơ bị mắc bệnh và rối loạn bất kỳ nêu trên. Sáng chế còn bao gồm việc sử dụng chế phẩm bất kỳ được mô tả ở đây trong sản xuất thuốc để điều trị, phòng ngừa và/hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn bất kỳ đi kèm với hoạt tính của NGF hoặc sự hoạt hóa NGF (bao gồm bệnh hoặc rối loạn và tình trạng bệnh bất kỳ được lấy làm ví dụ ở trên).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được đưa ra để cung cấp cho người có kỹ năng bình thường trong lĩnh vực kỹ thuật này phân biệt và mô tả hoàn chỉnh cách thức tạo ra và sử dụng phương pháp và chế phẩm theo sáng chế, và không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế. Mặc dù các tác giả sáng chế đã nỗ lực xác định chính xác các con số được sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v..) nhưng vẫn có một số sai số và sai lệch thử nghiệm và nên được xem xét. Trừ khi có quy định khác, các phần là các phần trọng lượng, phân tử lượng là phân tử lượng trung bình và nhiệt độ tính bằng oC, và áp suất bằng hoặc gần bằng áp suất khí quyển.

Ví dụ 1. Độ ổn định của kháng thể NGF kháng người ở người hoàn toàn ("mAb1") khi bảo quản ở nhiệt độ thấp

Trong ví dụ này, các chế phẩm khác nhau được tạo ra chứa kháng thể NGF kháng người không có mặt các tá dược. Ví dụ về kháng thể được sử dụng trong ví dụ này và tất cả các ví dụ tiếp theo được nêu dưới đây là kháng thể chứa HCVR có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:20, và LCVR có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:22. Kháng thể này ở đây được gọi là "mAb1".

Dưới dạng thử nghiệm sơ bộ, độ ổn định của mAb1 trong dung dịch lỏng được xác định sau các khoảng thời gian bảo quản đông lạnh khác nhau ở -30°C và -80°C . Nồng độ của mAb1 được sử dụng trong Ví dụ này là 130 mg/mL. Ở các điểm thời gian khác nhau, độ ổn định của mAb1 được xác định bằng SE-HPLC và bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao trao đổi ion (cation exchange high performance liquid chromatography - CEX-HPLC). Độ ổn định được đánh giá dựa trên % mAb1 tự nhiên còn lại trong mẫu (bằng SE-HPLC; Bảng 4) và bằng % mAb1 có tính axit quan sát được trong mẫu (bằng CEX-HPLC; Bảng 5). Mức gia tăng % mAb1 có tính axit phù hợp với việc loại nhóm amit trong kháng thể và do đó, được coi là hiện tượng không mong muốn đối với chế phẩm theo sáng chế.

Bảng 4

% mAb tự nhiên còn lại (SE-HPLC)		
	Nhiệt độ bảo quản	
Thời gian (tháng)	-80°C	-30°C
0	96,6	96,6
1	96,6	95,2
3	96,6	94,6
6	96,6	94,2
9	96,5	93,1
12	96,7	93,3

Bảng 5

% mAb1 có tính axit (CEX-HPLC)		
	Nhiệt độ bảo quản	
Thời gian (tháng)	-80°C	-30°C
0	14,3	14,3
1	14,7	14,6
3	14,9	14,5
6	14,1	12,8
9	14,9	14,5
12	14,6	14,6

Các kết quả này cho thấy mAb1 có thể giữ ổn định ở nồng độ 130 mg/mL trong ít nhất 12 tháng khi bảo quản ở -80°C.

Ví dụ 2. Độ ổn định của chế phẩm mAb1 chứa lượng tá dược nhỏ

Sáu chế phẩm khác nhau chứa mAb1 được bào chế ở nồng độ 40 mg/mL với lượng nhỏ tá dược (như được thể hiện trong Bảng 6, cũng xem Ví dụ 2) và được bảo quản ở -20°C hoặc -30°C trong các khoảng thời gian khác nhau. Tất cả các chế phẩm đều chứa axetat 10 mM, độ pH=5,0. Bảng 7 (-30°C) và Bảng 8 (-20°C) cho thấy % mAb1 tự nhiên còn lại trong các chế phẩm khác nhau chứa tá dược với lượng nhỏ, như được xác định bằng SE-HPLC.

Bảng 6

Các chế phẩm chứa mAb1 và lượng nhỏ tá dược		
Chế phẩm	Tá dược	mAb1 (mg/mL)
1	0,5% polyetylen glycol 3350	40
2	1,0% polyetylen glycol 3350	40
3	1% sucroza	40
4	2% sucroza	40
5	4% sucroza	40
6	không	40

Như nêu trên, các chế phẩm được thử nghiệm về độ ổn định bằng SE-HPLC khi bảo quản ở các khoảng thời gian khác nhau ở -30°C và -20°C. Các kết quả, được biểu thị bằng % mAb1 tự nhiên còn lại, được thể hiện trong Bảng 7 (bảo quản ở -30°C) và 8 (bảo quản ở -20°C).

Bảng 7

% mAb1 tự nhiên còn lại (SE-HPLC) nếu bảo quản ở -30°C						
Thời gian (tháng)	Chế phẩm số (xem Bảng 6)					
	1	2	3	4	5	6
0	98,3	98,1	98,0	97,9	98,1	98,0
1	98,0	98,1	98,0	98,0	98,0	97,0
3	97,8	97,9	98,0	98,0	97,9	96,0
6	98,2	98,4	98,5	98,4	98,4	95,9
9	98,2	98,3	98,5	98,5	98,8	95,1
12	98,2	98,4	98,4	98,4	98,5	95,7
18	97,7	98,2	98,1	98,1	98,4	94,5
24	97,9	98,1	98,3	98,5	98,5	94,5

Bảng 8

% mAb1 tự nhiên còn lại (SE-HPLC) nếu bảo quản ở -20°C						
Chế phẩm số (xem Bảng 6)						
Thời gian (tháng)	1	2	3	4	5	6
0	98,3	98,1	98,0	97,9	98,1	98,0
1	97,8	98,1	98,2	98,1	98,2	95,8
3	97,8	97,9	98,1	98,2	98,0	93,0
6	97,7	98,3	98,3	98,4	98,5	92,6
9	97,8	98,1	98,3	98,3	98,3	90,7
12	97,7	98,2	98,3	98,3	98,5	92,9
18	96,4	97,7	97,9	98,1	98,3	86,7
24	96,9	97,9	98,1	98,2	98,3	88,6

Như được thể hiện trong Ví dụ này, độ ổn định của mAb1 được giữ ở mức đáng kể ở chế phẩm 1, 2, 3, 4, và 5 khi bảo quản vài tháng ở -20°C và -30°C. Các kết quả này cho thấy độ ổn định của mAb1 ở -30°C có thể được tăng cường bằng cách bổ sung ít nhất là 1,0% sucroza, hoặc ít nhất là 0,5% polyetylen glycol 3350. Các kết quả này còn cho thấy độ ổn định của mAb1 ở -20°C có thể được tăng cường bằng cách bổ sung ít nhất là 1,0% sucroza, hoặc ít nhất là 1,0 polyetylen glycol 3350.

Ví dụ 3. Chế phẩm chứa mAb1 được làm ổn định

Chế phẩm được làm ổn định chứa mAb1 ở các nồng độ khác nhau được bào chế để sử dụng trong Ví dụ 4 và 5 dưới đây. Chế phẩm này, được ký hiệu là "Chế phẩm A", được thể hiện trong Bảng 9.

Bảng 9

Chế phẩm "A" chứa mAb1 được làm ổn định	
Thành phần	Chế phẩm A
mAb1	6 – 100 mg/mL
Axetat	10 mM
Polysorbat 20	0,05%
Sucroza	8%
Độ pH	5,0

Ví dụ 4. Độ ổn định của chế phẩm A khi bảo quản ở 5°C

Chế phẩm A (xem Ví dụ 3) chứa 6, 20 hoặc 100 mg/mL mAb1 được thử nghiệm về độ ổn định khi bảo quản vài tháng ở 5°C trong các ống tiêm liều nhỏ làm bằng thủy tinh trong suốt. Độ ổn định được đánh giá bằng các thông số sau: (a) đặc tính bên ngoài khi quan sát bằng mắt thường; (b) độ đục (OD 405 nm); (c) pH; (d) % mAb1 tổng thu hồi được khi xác định bằng RP-HPLC; (e) % mAb1 tự nhiên thu hồi được (như được xác định bằng SE-HPLC); (f) % mAb1 đỉnh chính thu hồi được (như được xác định bằng

CEX-HPLC); và (g) % mAb1 có tính axit thu hồi được (như được xác định bằng CEX-HPLC). Các kết quả về độ ổn định của Chế phẩm A chứa 6, 20 và 100 mg/mL mAb1 được tóm tắt trong Bảng 10, 11 và 12, tương ứng.

Bảng 10

Độ ổn định của Chế phẩm A chứa 6 mg/mL mAb1 khi bảo quản ở 5°C trong ống tiêm liều nhỏ làm bằng thủy tinh (0-12 tháng)							
Thông số	Thời gian bảo quản ở 5°C (tháng)						
	0	1	2	3	6	9	12
Đặc tính bề ngoài khi quan sát bằng mắt thường	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng
Độ đục (OD 405 nm)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Độ pH	5,1	5,1	5,1	5,0	5,0	5,1	5,1
% mAb1 tổng thu hồi được	100	96	101	99	102	107	107
% mAb1 tự nhiên thu hồi được (SE-HPLC)	98,8	98,6	98,7	98,9	98,5	98,8	98,7
% mAb1 đỉnh chính thu hồi được (CEX-HPLC)	44,8	46,3	46,4	45,4	41,2	46,2	45,0
% mAb1 thuộc phân tử có tính axit thu hồi được (CEX-HPLC)	16,6	16,5	17,4	17,7	15,2	15,9	16,5

Bảng 11

Độ ổn định của Chế phẩm A chứa 20 mg/mL mAb1 khi bảo quản ở 5°C ống tiêm liều nhỏ làm bằng thủy tinh (0-18 tháng)								
Thông số	Thời gian bảo quản ở 5°C (tháng)							
	0	1	2	3	6	9	12	18
Đặc tính bề ngoài khi quan sát bằng mắt thường	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng
Độ đục (OD 405 nm)	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Độ pH	5,1	5,2	5,0	5,1	5,0	5,1	5,2	5,1
% mAb1 tổng thu hồi được	100	96	99	100	100	104	101	102
% mAb1 tự nhiên thu hồi được (SE-HPLC)	99,0	98,4	98,5	98,4	98,6	98,2	98,6	98,2
% mAb1 đỉnh chính thu hồi được (CEX-HPLC)	44,0	44,0	44,1	43,8	44,3	43,8	44,9	43,6
% mAb1 thuộc phân tử có tính axit thu hồi được (CEX-HPLC)	15,8	15,5	15,8	15,5	15,5	15,2	15,9	15,3

Bảng 12

Độ ổn định của Chế phẩm A chứa 100 mg/mL mAb1 khi bảo quản ở 5°C ống tiêm liều nhỏ làm bằng thủy tinh (0-18 tháng)								
Thông số	Thời gian bảo quản ở 5°C (tháng)							
	0	1	2	3	6	9	12	18
Đặc tính bề ngoài khi quan sát bằng mắt thường	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng	Đáp ứng
Độ đục (OD 405 nm)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Độ pH	5,0	5,1	5,0	5,1	5,0	5,1	5,0	5,2
% mAb1 tổng thu hồi được	100	98	106	104	103	103	101	104
% mAb1 tự nhiên thu hồi được (SE-HPLC)	98,2	97,9	97,5	97,8	98,2	97,4	98,1	97,6
% mAb1 đỉnh chính thu hồi được (CEX-HPLC)	41,3	40,9	39,2	39,0	39,5	39,7	42,0	40,4
% mAb1 thuộc phân tử có tính axit thu hồi được (CEX-HPLC)	14,8	14,9	13,7	14,0	14,0	13,4	13,8	14,0

Các kết quả của Ví dụ này cho thấy Chế phẩm A chứa 6 mg/mL mAb1 giữ được ổn định trong ít nhất 12 tháng bảo quản, ở 5°C trong các ống tiêm liều nhỏ bằng thủy tinh

trong suốt, với khoảng 98,7% mAb1 tự nhiên hoặc nhiều hơn còn lại trong mẫu khi bảo quản 12 tháng trong các điều kiện này. Các kết quả của Ví dụ này còn cho thấy rằng Chế phẩm A chứa 20 mg/mL mAb1 giữ được ổn định trong ít nhất 18 tháng bảo quản, ở 5°C trong các ống tiêm liều nhỏ bằng thủy tinh trong suốt, với khoảng 98,2% mAb1 tự nhiên còn lại trong mẫu nếu 18 tháng bảo quản trong các điều kiện này. Ngoài ra, Chế phẩm A chứa 100 mg/mL mAb1 giữ được ổn định trong ít nhất 18 tháng bảo quản, ở 5°C trong các ống tiêm liều nhỏ bằng thủy tinh trong suốt, với khoảng 97,6% mAb1 tự nhiên còn lại trong mẫu nếu 18 tháng bảo quản trong các điều kiện này. Ngoài ra, % các phân tử có tính axit không thay đổi đáng kể so với thời điểm ban đầu ($t=0$) khi bảo quản 12 hoặc 18 tháng trong các điều kiện được thử nghiệm, do đó khẳng định tính ổn định của chế phẩm.

Ví dụ 5. Ảnh hưởng của nồng độ arginin, histidin và sucroza đến độ nhớt và độ ổn định của chế phẩm chứa mAb1

Một vài chế phẩm được bào chế chứa 100 mg/mL, 125 mg/mL và 150 mg/mL mAb1 và histidin, arginin và sucroza với các lượng khác nhau. Độ nhớt và độ mol được đo cho từng chế phẩm ở 25°C. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 13.

Bảng 13

Ảnh hưởng của nồng độ arginin, histidin và sucroza đến độ nhớt của chế phẩm chứa mAb1 (Tất cả các chế phẩm chứa 10 mM axetat, độ pH=5,0, và 0,2% polysorbat 20)					
mAb1 (mg/mL)	[Histidin] (mM)	[Arginin] (mM)	[Sucroza] (%)	Độ nhớt (cPoazo)	Độ mol (mOsm)
100	0	0	10	~13,5	440
100	0	25	10	~9	510
100	25	0	10	~9	510
100	0	25	5	~7	270
100	0	50	10	~7	560
125	0	0	5	~20	~250
125	0	25	5	~11	290
125	25	0	5	~12	280
125	0	50	5	~9	340
125	25	25	5	~9	330
125	0	0	2	~16	150
150	0	0	5	~41	300
150	25	25	5	~19	360
150	25	25	2	~15	310
150	0	75	5	~14	450
150	0	100	5	~11	510

Các kết quả được nêu trong Bảng 13 cho thấy rằng việc bổ sung histidin hoặc arginin ở nồng độ 25 mM vào mAb1 (ở nồng độ 100 mg/mL), làm giảm đáng kể độ nhớt của chế phẩm khi so sánh với chế phẩm chứa kháng thể nhưng không chứa histidin và arginin. Ngoài ra, việc bổ sung arginin ở 25 mM vào mAb1 (ở nồng độ 100 mg/mL), đồng thời giảm nồng độ sucroza từ 10% xuống 5%, làm độ nhớt giảm thêm. Khi nồng độ

kháng thể mAb1 tăng lên 125 mg/mL, cả histidin lẫn arginin ở nồng độ 25 mM đều làm giảm đáng kể độ nhớt khi được sử dụng một mình hoặc cùng nhau. Ngoài ra, việc làm giảm nồng độ sucroza từ 5% đến 2% kèm theo bổ sung histidin và arginin sẽ làm giảm độ nhớt của chế phẩm xuống mức thấp hơn. Khi nồng độ của mAb1 tăng lên 150 mg/mL, hỗn hợp gồm histidin và arginin, nồng độ mỗi thành phần bằng 25 mM, sẽ làm giảm đáng kể độ nhớt. Việc làm giảm nồng độ sucroza từ 5% xuống 2% sẽ làm độ nhớt giảm thêm.

Dựa trên, ít nhất là một phần, vào phần mô tả trên, Chế phẩm “B” dưới đây như được nêu trong Bảng 14 được bào chế.

Bảng 14

Thành phần	Chế phẩm B
mAb1	20 – 100 mg/mL
Axetat	10 mM
Polysorbat 20	0,05%
Sucroza	8%
Arginin	25 mM
Độ pH	5,0

Ví dụ 6. Độ ổn định của chế phẩm A chứa 100 mg/mL mAb1 khi được sản xuất trong ống tiêm liều nhỏ và bơm tiêm

Chế phẩm A (xem Bảng 9) chứa 100 mg/mL mAb1 được sản xuất trong ống tiêm liều nhỏ dung tích 2 mL và trong hai bơm tiêm khác nhau: vonfram thường và vonfram thấp. Các chế phẩm được bảo quản ở 5, 25 và 37°C trong các khoảng thời gian khác nhau. Độ ổn định của mAb1 sau khi bảo quản được xác định bằng SE-HPLC và CEX-HPLC. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 15. (Mức gia tăng % các phân tử có tính axit phù hợp với việc loại nhóm amit trong kháng thể và do đó, được coi là hiện tượng không mong muốn đối với chế phẩm theo sáng chế). Như được thể hiện trong bảng này, Chế phẩm A chứa 100 mg/mL mAb1, được bảo quản ở 5°C trong ống tiêm liều nhỏ hoặc bơm tiêm làm bằng thủy tinh, tương đối ổn định trong ít nhất 18 tháng, và ít ổn định hơn chút ở 25° hoặc 37° trong các thời gian lâu hơn được thử nghiệm.

Bảng 15

Độ ổn định của chế phẩm A chứa 100 mg/mL mAb1 trong ống tiêm liều nhỏ và bơm tiêm							
		Ống tiêm liều nhỏ dung tích 2 mL		Bơm tiêm vonfram thường		Bơm tiêm vonfram thấp	
Nhiệt độ	Thời gian	% mAb1 tự nhiên (SE-HPLC)	% mAb1 có tính axit (CEX-HPLC)	% mAb1 tự nhiên (SE-HPLC)	% mAb1 có tính axit (CEX-HPLC)	% mAb1 tự nhiên (SE-HPLC)	% mAb1 có tính axit (CEX-HPLC)
-	Bắt đầu	98,2	14,4	98,2	14,1	98,2	14,3

37°C	7 ngày	97,6	13,9	97,6	14,0	97,8	13,9
37°C	14 ngày	97,2	14,7	97,3	14,6	97,3	14,7
37°C	28 ngày	96,7	15,7	96,6	15,5	96,5	15,5
25°C	1 tháng	97,7	13,1	97,5	13,5	97,9	13,3
25°C	3 tháng	97,3	14,9	97,2	14,9	97,1	14,8
25°C	6 tháng	96,9	17,4	97,1	16,9	96,7	17,4
5°C	1 tháng	97,9	14,8	98,1	13,7	98,0	14,0
5°C	3 tháng	97,8	13,7	97,6	13,9	97,7	13,5
5°C	6 tháng	98,2	14,0	98,1	13,5	98,0	13,7
5°C	9 tháng	97,4	13,4	97,6	13,1	97,6	13,2
5°C	12 tháng	98,1	13,8	98,1	13,5	98,2	13,1
5°C	18 tháng	97,6	14,0	97,6	14,1	97,7	14,0

Ví dụ 7. Độ ổn định của Chế phẩm B chứa 100 mg/mL mAb1 khi được sản xuất trong ống tiêm liều nhỏ và bơm tiêm

Chế phẩm B (xem Bảng 14) chứa 100 mg/mL mAb1 được sản xuất trong ống tiêm liều nhỏ dung tích 2 mL và trong hai bơm tiêm khác nhau: vonfram thường và vonfram thấp. Các chế phẩm được bảo quản ở. Độ ổn định của mAb1 sau khi bảo quản như được xác định bằng SE-HPLC và CEX-HPLC. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 16. (như nêu trên, mức gia tăng % mAb1 có tính axit phù hợp với việc loại nhóm amit trong kháng thể và do đó, được coi là hiện tượng không mong muốn đối với chế phẩm theo sáng chế). Như được thể hiện trong bảng này, Chế phẩm B chứa 100 mg/mL mAb1, được bảo quản ở 5°C ống tiêm liều nhỏ hoặc bơm tiêm làm bằng thủy tinh, giữ được tương đối ổn định trong ít nhất 12 tháng, và tương đối ổn định trong ít nhất 18 tháng, và ít ổn định hơn chút ở 25° hoặc 37° ở tất cả các thời điểm được thử nghiệm.

Bảng 16

Độ ổn định của chế phẩm B chứa 100 mg/mL mAb1 trong ống tiêm liều nhỏ và bơm tiêm							
		Ống tiêm liều nhỏ dung tích 2 mL		Bơm tiêm vonfram thường		Bơm tiêm vonfram thấp	
Nhiệt độ	Thời gian	% mAb1 tự nhiên (SE-HPLC)	% mAb1 có tính axit (CEX-HPLC)	% mAb1 tự nhiên (SE-HPLC)	% mAb1 có tính axit (CEX-HPLC)	% mAb1 tự nhiên (SE-HPLC)	% mAb1 có tính axit (CEX-HPLC)
-	Bắt đầu	98,2	14,2	98,1	14,4	98,2	14,3
37°C	7 ngày	97,4	14,3	97,4	14,3	97,6	14,1
37°C	14 ngày	97,0	14,9	96,9	14,8	96,9	14,8
37°C	28 ngày	96,4	16,3	96,4	16,2	96,4	15,9
25°C	1 tháng	97,7	13,6	97,8	13,7	97,7	13,6
25°C	3 tháng	96,7	14,7	96,9	14,7	96,8	14,8
25°C	6 tháng	96,6	15,4	96,6	15,5	96,6	15,6
5°C	1 tháng	98,1	13,6	98,0	13,7	98,1	13,5
5°C	2 tháng	97,8	14,3	97,9	14,3	97,9	14,2
5°C	3 tháng	97,7	14,3	97,3	14,4	97,4	14,2
5°C	6 tháng	97,4	14,4	97,5	14,5	97,6	14,5
5°C	9 tháng	97,8	14,2	97,8	14,1	97,7	14,1
5°C	12 tháng	98,0	15,1	98,1	14,7	98,2	14,7
5°C	18 tháng	97,7	14,3	97,7	39,8	97,7	14,1

Ví dụ 8: Độ ổn định của chế phẩm chứa mAb1 trong các bơm tiêm đã điền đầy

Một loạt thử nghiệm được tiến hành để đánh giá độ ổn định của các chế phẩm khác nhau chứa mAb1 trong các bơm tiêm đã điền đầy. Đối với các thử nghiệm này, thiết bị logic khác nhau và kim nhọn, bơm tiêm vonfram thường và bơm tiêm vonfram thấp được sử dụng kết hợp với các loại pittông khác nhau (được phủ và không được phủ) và các nắp chụp đầu khác nhau. Chế phẩm được thử nghiệm về độ ổn định khi bảo quản trong các bơm tiêm đã điền đầy ở 37°C, 25°C và 5°C trong các khoảng thời gian khác nhau (từ 7 ngày đến 6 tháng, phụ thuộc vào các điều kiện được thử nghiệm).

Các chế phẩm chứa mAb1 dưới đây được thử nghiệm về độ ổn định trong các bơm tiêm đã điền đầy ở trong Ví dụ này: (1) Chế phẩm A (xem Bảng 9) chứa 100 mg/mL mAb1 bơm tiêm đã điền đầy và nhọn, số 1 được mô tả trong Bảng 17; (2) Chế phẩm A chứa 100 mg/mL mAb1 bơm tiêm đã điền đầy và nhọn, số 2 được mô tả trong Bảng 18; (3) Chế phẩm A chứa 20 mg/mL mAb1 bơm tiêm đã điền đầy và nhọn, số 1 được mô tả trong Bảng 19; (4) Chế phẩm A chứa 20 mg/mL mAb1 bơm tiêm đã điền đầy và nhọn, số 2 được mô tả trong Bảng 20; (5) Chế phẩm A chứa 100 mg/mL mAb1 bơm tiêm đã điền đầy và nhọn, số 3 được mô tả trong Bảng 21; và (6) Chế phẩm A chứa 6 mg/mL mAb1 bơm tiêm đã điền đầy và nhọn, số 3 được mô tả trong Bảng 22.

Bơm tiêm số 1 là bơm tiêm có hàm lượng vonfram thấp BD dài 1 mL cỡ 29 x ½ inso Physiolis; Bơm tiêm số 2 là bơm tiêm Schott dài 1 mL cỡ SN CF 29 x ½ inso; và Bơm tiêm số 3 là bơm tiêm Daikyo Seiko CZ® (Crystal Zenith) dài 1 mL cỡ STD 30 x ½ inso.

Độ ổn định được đánh giá bằng các thông số sau: (a) quan sát bằng mắt; (b) độ đục (OD_{405nm}); (c) % thu hồi bằng RP-HPLC; (d) % mAb1 tự nhiên bằng SE-HPLC; (e) % mAb1 đỉnh chính bằng CEX-HPLC; và (f) % mAb1 có tính axit bằng CEX-HPLC.

Các kết quả từ thử nghiệm đại diện để đánh giá độ ổn định của Chế phẩm A, chứa 100 mg/mL mAb1 trong bơm tiêm số 1 được thể hiện trong Bảng 17 dưới đây.

Bảng 17

Độ ổn định của chế phẩm A chứa 100 mg/mL mAb1 trong bơm tiêm đã điền đầy và nhon, số 1							
Mô tả bơm tiêm số 1							
Bơm tiêm:		BD dài 1 mL cỡ 29 x 1/2" Physiolis, vonfram thấp					
Pittông:		Hypak FluroTec® 4023/50					
Nắp chụp đầu:		BD 260					
Silic hóa:		Phun					
Nhiệt độ	Thời gian	Quan sát bằng mắt	Độ đục (OD _{405 nm})	% thu hồi	% mAb1 tự nhiên (SE-HPLC)	% mAb1 đỉnh chính (CEX-HPLC)	% mAb1 có tính axit (CEX-HPLC)
--	Bắt đầu	Đáp ứng	0,00	100	98,2	40,2	14,2
37°C	7 ngày	Đáp ứng	0,00	101	97,8	37,6	13,9
37°C	14 ngày	Đáp ứng	0,00	100	97,3	37,0	14,7
37°C	28 ngày	Đáp ứng	0,00	96	96,5	34,9	15,5
25°C	1 tháng	Đáp ứng	0,00	97	97,9	36,9	13,3
25°C	2 tháng	Đáp ứng	0,00	103	97,0	38,6	14,9
25°C	3 tháng	Đáp ứng	0,00	100	97,1	35,5	14,8
25°C	6 tháng	Đáp ứng	0,00	104	96,7	36,8	17,4
5°C	1 tháng	Đáp ứng	0,00	96	98,0	39,0	13,8
5°C	2 tháng	Đáp ứng	0,00	103	97,8	39,3	13,6
5°C	3 tháng	Đáp ứng	0,00	100	97,7	39,2	13,5
5°C	6 tháng	Đáp ứng	0,00	100	98,0	39,2	13,7
5°C	9 tháng	Đáp ứng	0,00	100	97,6	39,1	13,2
5°C	12 tháng	Đáp ứng	0,00	102	98,2	40,9	13,1
5°C	18 tháng	Đáp ứng	0,00	100	97,7	39,6	14,0

Các kết quả từ thử nghiệm đại diện để đánh giá độ ổn định của Chế phẩm A, chứa 100 mg/mL mAb1 trong Bơm tiêm số 2 được thể hiện trong Bảng 18 dưới đây.

Bảng 18

Độ ổn định của chế phẩm A chứa 100 mg/mL mAb1 trong bơm tiêm đã điền đầy và nhon, số 2							
Mô tả bơm tiêm số 2							
Bơm tiêm:		Schott dài 1 mL cỡ SN CF 29 x 1/2"					
Pittông:		West FluroTec® 4023/50					
Nắp chụp đầu:		Stelmi 4800 w/RNS					
Silic hóa:		Phun					
Nhiệt độ	Thời gian	Quan sát bằng mắt	Độ đục (OD _{405 nm})	% thu hồi	% mAb1 tự nhiên (SE-HPLC)	% mAb1 đỉnh chính (CEX-HPLC)	% mAb1 có tính axit (CEX-HPLC)
--	Bắt đầu	Đáp ứng	0,00	100	98,3	40,3	14,2
37°C	7 ngày	Đáp ứng	0,00	102	97,5	37,8	14,0
37°C	14 ngày	Đáp ứng	0,00	102	97,3	37,4	14,7
37°C	28 ngày	Đáp ứng	0,00	97	96,6	34,6	15,4
25°C	1 tháng	Đáp ứng	0,00	98	97,8	36,8	13,4
25°C	2 tháng	Đáp ứng	0,00	103	97,1	38,8	14,9
25°C	3 tháng	Đáp ứng	0,00	101	97,1	35,6	14,8
25°C	6 tháng	Đáp ứng	0,00	103	96,8	37,4	17,5
5°C	1 tháng	Đáp ứng	0,00	97	97,8	39,8	13,8
5°C	2 tháng	Đáp ứng	0,00	103	97,8	39,4	13,9
5°C	3 tháng	Đáp ứng	0,00	101	97,6	39,8	13,8
5°C	6 tháng	Đáp ứng	0,00	101	98,1	40,0	13,9
5°C	9 tháng	Đáp ứng	0,00	102	97,6	39,7	13,4
5°C	12 tháng	Đáp ứng	0,00	100	98,2	41,1	13,0
5°C	18 tháng	Đáp ứng	0,00	102	97,7	39,4	13,9

Các kết quả từ thử nghiệm đại diện để đánh giá độ ổn định của Chế phẩm A, chứa 20 mg/mL mAb1 trong Bơm tiêm số 1 được thể hiện trong Bảng 19 dưới đây.

Bảng 19

Độ ổn định của chế phẩm A chứa 20 mg/mL mAb1 trong bơm tiêm đã điền đầy và nhon, số 1							
Mô tả bơm tiêm số 1							
Bơm tiêm:		BD dài 1 mL cỡ 29 x 1/2" Physiolis, vonfram thấp					
Pittông:		Hypak FluroTec® 4023/50					
Nắp chụp đầu:		BD 260					
Silic hóa:		Phun					
Nhiệt độ	Thời gian	Quan sát bằng mắt	Độ đục (OD _{405 nm})	% thu hồi	% mAb1 tự nhiên (SE-HPLC)	% mAb1 đỉnh chính (CEX-HPLC)	% mAb1 có tính axit (CEX-HPLC)
--	Bắt đầu	Đáp ứng	0,00	100	98,9	44,5	15,9
37°C	7 ngày	Đáp ứng	0,00	100	98,4	42,1	15,7
37°C	14 ngày	Đáp ứng	0,00	99	98,3	41,8	16,2
37°C	28 ngày	Đáp ứng	0,00	98	97,6	39,2	17,5
25°C	1 tháng	Đáp ứng	0,00	96	98,4	41,4	15,3
25°C	2 tháng	Đáp ứng	0,00	100	98,1	41,8	16,0
25°C	3 tháng	Đáp ứng	0,00	99	98,0	42,7	17,0
25°C	6 tháng	Đáp ứng	0,01	99	98,0	42,0	19,4
5°C	1 tháng	Đáp ứng	0,00	97	98,2	44,0	15,7
5°C	2 tháng	Đáp ứng	0,00	99	98,5	44,5	15,8
5°C	3 tháng	Đáp ứng	0,00	100	98,4	44,4	15,8
5°C	6 tháng	Đáp ứng	0,00	99	98,6	44,1	15,6
5°C	9 tháng	Đáp ứng	0,00	101	98,2	44,0	15,1
5°C	12 tháng	Đáp ứng	0,00	101	98,5	45,4	15,9
5°C	18 tháng	Đáp ứng	0,00	101	98,2	43,5	15,3

Các kết quả từ thử nghiệm đại diện để đánh giá độ ổn định của Chế phẩm A, chứa 20 mg/mL mAb1 trong Bơm tiêm số 2 được thể hiện trong Bảng 20 dưới đây.

Bảng 20

Độ ổn định của chế phẩm A chứa 20 mg/mL mAb1 trong bơm tiêm đã điền đầy và nhon, số 2							
Mô tả bơm tiêm số 2							
Bơm tiêm:		Schott 1 mL Long SN CF 29ga x 1/2"					
Pittông:		West FluroTec® 4023/50					
Nắp chụp đầu:		Stelmi 4800 w/RNS					
Silic hóa:		Phun					
Nhiệt độ	Thời gian	Quan sát bằng mắt	Độ đục (OD _{405 nm})	% thu hồi	% mAb1 tự nhiên (SE-HPLC)	% mAb1 đỉnh chính (CEX-HPLC)	% mAb1 có tính axit (CEX-HPLC)
--	Bắt đầu	Đáp ứng	0,00	100	98,9	44,5	15,9
37°C	7 ngày	Đáp ứng	0,00	101	98,4	42,1	15,6
37°C	14 ngày	Đáp ứng	0,00	100	98,2	41,8	16,2
37°C	28 ngày	Đáp ứng	0,00	98	97,6	39,3	17,4
25°C	1 tháng	Đáp ứng	0,00	97	98,3	41,5	15,2
25°C	2 tháng	Đáp ứng	0,00	99	98,2	41,9	16,0
25°C	3 tháng	Đáp ứng	0,00	100	98,0	42,7	16,9
25°C	6 tháng	Đáp ứng	0,00	99	97,9	42,1	19,5
5°C	1 tháng	Đáp ứng	0,00	96	98,4	44,7	15,6
5°C	2 tháng	Đáp ứng	0,00	99	98,5	44,3	15,9
5°C	3 tháng	Đáp ứng	0,00	99	98,4	44,7	15,7
5°C	6 tháng	Đáp ứng	0,00	100	98,7	44,2	15,5
5°C	9 tháng	Đáp ứng	0,00	102	98,4	43,8	15,1
5°C	12 tháng	Đáp ứng	0,00	102	98,6	45,2	15,9
5°C	18 tháng	Đáp ứng	0,00	102	98,3	43,2	15,2

Các kết quả từ thử nghiệm đại diện để đánh giá độ ổn định của Chế phẩm A, chứa 100 mg/mL mAb1 trong Bơm tiêm số 3 được thể hiện trong Bảng 21 dưới đây.

Bảng 21

Độ ổn định của chế phẩm A chứa 100 mg/mL mAb1 trong bơm tiêm đã điền đầy và nhon, số 3							
Mô tả bơm tiêm số 3							
Bơm tiêm:		Daikyo Seiko CZ 1 mL cỡ STD 30 x 1/2 "					
Pittông:		Daikyo D-21-6-1 FluroTec® được phủ					
Nắp chụp đầu:		7028					
Silic hóa:		N/A					
Nhiệt độ	Thời gian	Quan sát bằng mắt	Độ đục (OD _{405 nm})	% thu hồi	% mAb1 tự nhiên (SE-HPLC)	% mAb1 đỉnh chính (CEX-HPLC)	% mAb1 có tính axit (CEX-HPLC)
--	Bắt đầu	Đáp ứng	0,00	100	97,5	38,5	13,6
37°C	7 ngày	Đáp ứng	0,00	101	97,5	40,0	14,0
37°C	14 ngày	Đáp ứng	0,00	102	97,3	39,5	15,2
37°C	28 ngày	Đáp ứng	0,00	101	96,4	38,3	15,7
25°C	1 tháng	Đáp ứng	0,00	105	97,8	38,3	13,6
25°C	2 tháng	Đáp ứng	0,00	102	97,2	37,4	14,9
25°C	3 tháng	Đáp ứng	0,00	102	97,2	37,2	14,6
5°C	1 tháng	Đáp ứng	0,00	104	98,2	38,1	13,3
5°C	2 tháng	Đáp ứng	0,00	101	97,9	38,1	13,4
5°C	3 tháng	Đáp ứng	0,00	101	97,8	38,4	13,1
5°C	6 tháng	Đáp ứng	0,00	106	97,8	39,6	13,4
5°C	9 tháng	Đáp ứng	0,00	105	97,9	40,8	13,4
5°C	12 tháng	Đáp ứng	0,00	112	97,6	38,3	13,5

Các kết quả từ thử nghiệm đại diện để đánh giá độ ổn định của Chế phẩm A, chứa 6 mg/mL mAb1 trong Bơm tiêm số 3 được thể hiện trong Bảng 22 dưới đây.

Bảng 22

Độ ổn định của chế phẩm A chứa 6 mg/mL mAb1 trong bơm tiêm đã điền đầy và nhon, số 3							
Mô tả bơm tiêm số 3							
Bơm tiêm:		Daikyo Seiko CZ 1 mL cỡ STD 30 x 1/2 "					
Pittông:		Daikyo D-21-6-1 FluroTec® được phủ					
Nắp chụp đầu:		7028					
Silic hóa:		N/A					
Nhiệt độ	Thời gian	Quan sát bằng mắt	Độ đục (OD _{405 nm})	% thu hồi	% mAb1 tự nhiên (SE-HPLC)	% mAb1 đỉnh chính (CEX-HPLC)	% mAb1 có tính axit (CEX-HPLC)
--	Bắt đầu	Đáp ứng	0,00	100	98,8	45,6	16,8
37°C	7 ngày	Đáp ứng	0,00	101	98,7	46,2	17,2
37°C	14 ngày	Đáp ứng	0,00	101	98,5	45,8	18,2
37°C	28 ngày	Đáp ứng	0,00	101	98,3	44,5	19,8
25°C	1 tháng	Đáp ứng	0,00	106	98,8	45,7	17,3
25°C	2 tháng	Đáp ứng	0,00	103	98,8	44,3	18,1
25°C	3 tháng	Đáp ứng	0,00	101	98,3	42,9	18,6
5°C	1 tháng	Đáp ứng	0,00	105	99,0	46,0	16,6
5°C	2 tháng	Đáp ứng	0,00	102	98,8	45,6	16,8

5°C	3 tháng	Đáp ứng	0,00	101	98,8	45,7	16,3
5°C	6 tháng	Đáp ứng	0,00	105	98,5	46,7	16,5
5°C	9 tháng	Đáp ứng	0,00	106	98,8	47,8	17,2
5°C	12 tháng	Đáp ứng	0,00	115	97,8	47,6	17,5

Các kết quả từ loạt thử nghiệm này cho thấy các chế phẩm khác nhau giữ được tính ổn định tương đối trong các bơm tiêm đã điền đầy, cụ thể là khi được bảo quản ở nhiệt độ 25°C và dưới đây, trong một tháng hoặc lâu hơn.

Ví dụ 9: Độ ổn định của chế phẩm chứa mAb1 ở nồng độ thấp trong ống tiêm liều nhỏ làm bằng thủy tinh

Mức ổn định gia tăng và theo thời gian thực của mAb1 ở nồng độ 0,2, 0,5, 1, và 2 mg/mL được đánh giá trong các ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh, các kết quả được cập nhật theo thời gian được thể hiện trong các bảng từ 23 đến 27. Đối với các thử nghiệm này, độ ổn định của mAb1 được xác định trong các ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh bosilicat, loại 1 do Schott sản xuất. Chế phẩm chứa mAb1 được sử dụng trong Các ví dụ từ 9 đến 12 tương tự với chế phẩm được mô tả trong Bảng 9, ngoại trừ nồng độ của kháng thể được sử dụng thấp hơn nồng độ được thử nghiệm trước đó và thay đổi trong suốt thời gian thử nghiệm. Nồng độ chính xác của mAb1 được sử dụng trong từng thử nghiệm được nêu trong từng bảng dưới đây. Các chế phẩm được thử nghiệm về độ ổn định khi bảo quản trong các ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh ở 45°C, 25°C và 5°C trong các khoảng thời gian khác nhau (từ 7 ngày đến 6 tháng, phụ thuộc vào các điều kiện được thử nghiệm).

Các kết quả được cập nhật cho thấy sự phân hủy gia tăng (các biến thể kết tủa, kết tụ, phân cắt, và mang điện) của các chế phẩm 0,2 và 0,5 mg/mL khi ủ ở 45°C trong từ 7 đến 14 ngày. Ngoài ra, có sự gia tăng kết tụ đối với các chế phẩm ở tất cả các nồng độ ≤ 2 mg/mL khi ủ ở 45°C trong 28 ngày ($> 15\%$ so với $\sim 2\%$ đối với các chế phẩm ≥ 6 mg/mL). Quan sát thấy hiện tượng kết tủa khi chế phẩm 0,2 mg/mL được bảo quản ở 5°C trong 6 tháng. Không quan sát thấy sự phân hủy/kết tủa đáng kể chế phẩm 0,5, 1, và 2 mg/mL được bảo quản ở 5°C trong 6 tháng.

Bảng 23

Độ ổn định của mAb1 nồng độ thấp trong các ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh (ủ ở 45°C)	
Thời gian (ngày)	% mAb1 thu hồi được (RP-HPLC)
	Nồng độ của mAb1 (mg/ml ống tiêm nhỏ)

	0,2	0,5	1,0	2,0
0	100	100	100	100
7	91	97	103	109
14	67	94	101	108
28	40	82	100	106
Chế phẩm: 8% Sucroza, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0				

Bảng 24

Độ ổn định mAb1 nồng độ thấp trong các ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh (ủ ở 25°C)				
Thời gian (ngày)	% mAb1 tự nhiên thu hồi được (SE-HPLC)			
	Nồng độ của mAb1 (mg/ml ống tiêm nhỏ)			
	0,2	0,5	1,0	2,0
0	98,1	98,4	98,6	98,5
7	98,3	98,6	98,6	98,7
14	98,1	98,7	98,6	98,7
28	97,6	98,5	98,6	98,7
56	92,2	96,6	98,1	98,5
Chế phẩm: 8% Sucroza, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0				

Bảng 25

Độ ổn định mAb1 nồng độ thấp trong các ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh (ủ ở 5°C)				
Thời gian (tháng)	% mAb1 thu hồi được (RP-HPLC)			
	Nồng độ của mAb1 (mg/ml ống tiêm nhỏ)			
	0,2	0,5	1,0	2,0
0	100	100	100	100
1	101	97	105	109
2	99	100	107	110
3	105	99	105	111
6	80	97	102	106
Chế phẩm: 8% Sucroza, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0				

Bảng 26

Độ ổn định mAb1 nồng độ thấp trong các ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh (ủ ở 5°C)				
Thời gian (tháng)	% mAb1 tự nhiên thu hồi được (SE-HPLC)			
	Nồng độ của mAb1 (mg/ml ống tiêm nhỏ)			
	0,2	0,5	1,0	2,0
0	98,1	98,4	98,6	98,5

1	97,7	98,6	98,7	98,8
2	97,8	98,3	98,3	98,7
3	98,2	98,7	98,7	98,3
6	97,6	98,4	98,6	98,5
Chế phẩm: 8% Sucroza, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0				

Bảng 27: Độ ổn định mAb1 nồng độ thấp trong các bơm tiêm PFS hoặc các ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh (ủ ở 45°C)

A. Các ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh

Thời gian (ngày)	% mAb1 tự nhiên thu hồi được (SE-HPLC)			
	Nồng độ của mAb1 (mg/ml ống tiêm nhỏ)			
	0,2	0,5	1,0	2,0
0	98,1	98,4	98,6	98,5
7	90,4	97,2	98,3	98,2
14	76,1	92,0	96,1	97,8
28	42,9	51,0	83,7	81,7
Chế phẩm: 8% Sucroza, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0				

B. Bơm tiêm

Thời gian (ngày)	% mAb1 tự nhiên thu hồi được (SE-HPLC)			
	Nồng độ của mAb1 (mg/ml ống tiêm nhỏ)			
	0,2	0,5	1,0	2,0
0	98,1	98,6	98,5	98,4
7	97,6	98,1	98,2	98,1
14	97,9	97,9	97,8	97,8
28	96,9	96,8	96,7	96,6
Chế phẩm: 8% Sucroza, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0				

Ví dụ 10: Độ ổn định của chế phẩm chứa mAb1 nồng độ thấp trong bơm tiêm BD và Ompi

Độ ổn định được tăng cường và theo thời gian thực của mAb1 0,2 và 0,6 mg/mL được đánh giá trong bơm tiêm BD và Ompi. Cả hai bơm tiêm có chiều dài 1 mL, được sản xuất bằng vonfram thấp, và có cỡ 27 x ½ inch, thành mỏng, đầu nhọn. Bơm tiêm BD chứa 0,8 mg silicon, được sử dụng bằng cách phun lên đầu của pittông. Bơm tiêm Ompi chứa 0,5 mg silicon và được sử dụng bằng công nghệ vòi chia, mà tạo ra lớp phủ đồng nhất hơn dọc theo chiều dài của nòng bơm tiêm. Các chế phẩm được thử nghiệm về độ ổn định khi bảo quản trong cả hai bơm tiêm đã điền đầy ở 45°C, 25°C và 5°C trong các khoảng thời gian khác nhau (từ 7 ngày đến 6 tháng, phụ thuộc vào các điều kiện thử nghiệm).

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 28 đến 30, cho thấy độ ổn định của mAb1 ở 45°C trong bơm tiêm BD được cải thiện nhiều so với loại 1, ống tiêm nhỏ bằng bosilicat thủy tinh như được xác định bằng phân tích RP-HPLC (kết tủa) và SE-HPLC (loại kết tụ và phân cắt).

Độ ổn định của mAb1 ở 45°C trong bơm tiêm Ompi được cải thiện so với loại 1, các ống tiêm nhỏ làm bằng bosilicat thủy tinh, nhưng ít ổn định hơn đáng kể so với trong bơm tiêm BD. Số liệu này gợi ý rằng silicon có thể ngăn chặn sự tương tác của chế phẩm với bề mặt thủy tinh, do đó cải thiện độ ổn định. Do bơm tiêm BD chứa nhiều silicon hơn dọc theo nồng độ bơm tiêm thủy tinh so với bơm tiêm Ompi, nên điều này có thể giải thích tại sao chế phẩm này ổn định hơn trong bơm tiêm BD so với bơm tiêm Ompi.

Quan sát thấy sự phân hủy không đáng kể khi mAb1 được bảo quản trong bơm tiêm BD và Ompi ở 5°C hoặc 25°C trong 6 tháng như được xác định bằng phân tích SE-HPLC và CEX-HPLC.

Bảng 28

Độ ổn định của 0,6 mg/mL mAb1 trong bơm tiêm BD, bơm tiêm Ompi hoặc ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh (ủ ở 45°C)			
Thời gian (ngày)	% mAb1 tự nhiên thu hồi được (SE-HPLC)		
	Ống tiêm nhỏ bằng thủy tinh loại 1	Bơm tiêm BD	Bơm tiêm Ompi
0	98,6	98,6	98,9
7	98,2	98,4	98,5
14	97,7	98,0	98,5
28	66,1	97,1	84,5
54	-	95,6	24,5
Chế phẩm: 8% Sicroza, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0			

Bảng 29

Độ ổn định của mAb1 nồng độ thấp trong bơm tiêm BD và Ompi (ủ ở 5°C; SE-HPLC)						
Thời gian (tháng)	% mAb1 tự nhiên thu hồi được (SE-HPLC)					
	Nồng độ của mAb1 (mg/mL)					
	Ống tiêm nhỏ		BD		Ompi	
	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2	0,6
0	98,6	98,6	98,4	98,6	98,7	98,9
1	98,7	99,0	98,5	98,9	98,5	98,9
2	98,3	98,9	98,7	98,9	98,6	98,9

3	98,4	98,6	98,4	98,7	98,3	98,7
6	98,3	98,6	98,3	98,7	98,2	98,7
Chế phẩm: 8% Sucroza, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0						

Bảng 30

Độ ổn định mAb1 nồng độ thấp trong ống tiêm nhỏ, bơm tiêm BD và Ompi (ủ ở 45°C; RP-HPLC)						
% mAb1 thu hồi được (RP-HPLC)						
Thời gian (ngày)	Nồng độ của mAb1 (mg/mL)					
	ống tiêm nhỏ		BD		CZ	
	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2	0,6
0	100	100	100	100	100	100
7	92	103	96	107	99	106
14	88	96	96	99	104	100
28	39	94	85	99	104	101
42	-	-	61	-	94	-
56	-	-	55	-	96	-
62	-	-	-	88	-	98
Chế phẩm: 8% Sucroza, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0						

Ví dụ 11: Độ ổn định của chế phẩm chứa mAb1 ở nồng độ thấp trong thiết bị bảo quản thay thế

Các nghiên cứu được tiến hành để xác định độ ổn định của mAb1 trong các thiết bị bảo quản khác, bao gồm: bơm tiêm West CZ (polyolefin vòng), ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh Schott plus® loại 1 (lớp phủ SiO₂ dày 100 – 200 nm trên bề mặt bên trong của Loại 1, ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh bosilicat), và Schott Loại 1, các ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh bosilicat có khoảng không đầu ống chứa nitơ (không khí được loại bỏ khỏi khoảng không đầu ống tiêm nhỏ và được thay thế bằng khí nitơ).

Các kết quả, như được thể hiện trong Bảng từ 31 đến 36, cho thấy độ ổn định ở 45°C được cải thiện nhiều đối với các chế phẩm 0,2 và 0,6 mg/mL trong bơm tiêm CZ so với bơm tiêm BD như được xác định bằng RP-HPLC và SE-HPLC. Ngoài ra, độ ổn định của chế phẩm chứa mAb1 ở 45°C cải thiện nhiều ở nồng độ 0,2 và 0,6 mg/mL trong các ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh Loại 1 plus® so với ống tiêm nhỏ Loại 1 như được xác định bằng RP-HPLC và SE-HPLC.

Quan sát thấy sự phân hủy đáng kể bằng SE-HPLC đối với chế phẩm 0,2 mg/mL trong ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh Loại 1 khi được ủ ở 25°C hoặc 5°C trong 3 tháng.

Quan sát thấy sự phân hủy không đáng kể đối với chế phẩm 0,2 mg/mL trong các ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh Loại 1 plus® khi được ủ ở 25°C hoặc 5°C trong 3 tháng.

Độ ổn định ở 45°C được cải thiện nhiều đối với chế phẩm 0,2 mg/mL trong ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh Loại 1 có lớp phủ nito, so với ống tiêm nhỏ làm bằng thủy tinh Loại 1 với khoảng không gian đầu ống chứa không khí như được xác định bằng SE-HPLC. Việc loại bỏ oxy khỏi khoảng không gian đầu ống tạo ra tác dụng làm ổn định rất lớn đối với mAb1 ở nồng độ 0,2 mg/mL được bào chế cùng với 0,05% polysorbat 20 (như trong Chế phẩm A) mặc dù vẫn quan sát thấy tốc độ phân hủy gia tăng so với chế phẩm 0,2 mg/mL mà không chứa polysorbat 20.

Bảng 31

Độ ổn định mAb1 ở nồng độ thấp trong ống tiêm nhỏ, bơm tiêm BD và CZ (ủ ở 45°C; SE-HPLC)						
Thời gian (ngày)	% MAb1 tự nhiên (SE-HPLC)					
	Nồng độ của mAb1 (mg/mL)					
	Ống tiêm nhỏ		BD		CZ	
	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2	0,6
0	98,8	98,7	98,5	98,5	98,7	98,6
7	96,5	98,3	97,6	98,3	97,0	98,3
14	82,0	97,2	95,8	97,2	97,1	97,0
28	58,2	64,5	70,6	95,8	96,1	96,2
42	-	-	48,8	-	93,3	-
56	-	-	36,4	-	89,6	-
62	-	-	-	93,4	-	90,3
Chế phẩm: 8% Surozoa, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0						

Bảng 32

Độ ổn định mAb1 ở nồng độ thấp trong ống tiêm nhỏ Loại 1 plus®, (ủ ở 45°C; RP-HPLC)				
Thời gian (ngày)	% mAb1 thu hồi được (RP-HPLC)			
	Nồng độ của mAb1 (mg/mL)			
	ống tiêm nhỏ Loại 1		ống tiêm nhỏ Loại 1 plus®	
	0,2	0,6	0,2	0,6
0	100	100	100	100
7	92	103	99	106
14	88	96	100	99
28	39	94	101	100
Chế phẩm: 8% Surozoa, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0				

Bảng 33

Độ ổn định mAb1 ở nồng độ thấp trong ống tiêm nhỏ Loại 1 plus® (ủ ở 45°; SE-HPLC)				
% MAb1 tự nhiên (SE-HPLC)				
Thời gian (ngày)	Nồng độ của mAb1 (mg/mL)			
	ống tiêm nhỏ Loại 1		ống tiêm nhỏ Loại 1 plus®	
	0,2	0,6	0,2	0,6
0	98,8	98,7	98,7	98,6
7	96,5	98,3	97,3	98,3
14	82,0	97,2	97,4	97,2
28	58,2	64,5	70,6	95,2
Chế phẩm: 8% Sucroza, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0				

Bảng 34

Độ ổn định mAb1 ở nồng độ thấp trong ống tiêm nhỏ Loại 1 plus® (ủ ở 25°; SE-HPLC)				
% MAb1 tự nhiên (SE-HPLC)				
Thời gian (tháng)	Nồng độ của mAb1 (mg/mL)			
	ống tiêm nhỏ Loại 1		ống tiêm nhỏ Loại 1 plus®	
	0,2	0,6	0,2	0,6
0	98,8	98,7	98,7	98,6
1	98,7	98,7	98,6	98,8
2	98,2	98,6	98,2	98,6
3	92,5	97,2	97,5	97,4
Chế phẩm: 8% Sucroza, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0				

Bảng 35

Độ ổn định mAb1 ở nồng độ thấp trong ống tiêm nhỏ Loại 1 Plus® (ủ ở 5°; SE-HPLC)				
% MAb1 tự nhiên (SE-HPLC)				
Thời gian (tháng)	Nồng độ của mAb1 (mg/mL)			
	ống tiêm nhỏ Loại 1		ống tiêm nhỏ Loại 1 Plus®	
	0,2	0,6	0,2	0,6
0	98,8	98,7	98,7	98,7
1	98,9	98,9	98,5	98,7
2	98,7	98,9	98,6	98,6
3	96,5	97,7	97,9	97,7
Chế phẩm: 8% Sucroza, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0				

Bảng 36

Độ ổn định của mAb1 ở nồng độ 0,2 mg/mL trong ống tiêm nhỏ Loại 1 được phủ lớp khí nitơ (ủ ở 45°C; SE-HPLC)	
% MAb1 tự nhiên (SE-HPLC)	

Thời gian (tháng)	Khoảng không đầu ống chứa không khí	Khoảng không đầu ống chứa nito
0	97,5	97,1
7	95,2	95,7
14	84,6	96,6
21	60,9	96,7
28	53,9	96,7
56	-	92,4
Chế phẩm: 8% Suroza, 0,05% Polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0		

Ví dụ 12: Ảnh hưởng của vonfram đến độ ổn định của mAb1 ở nồng độ thấp

Các nghiên cứu được tiến hành để xác định độ ổn định của mAb1 khi được làm nhon bằng chất chiết pin vonfram không lọc. Pin vonfram được sử dụng trong quy trình sản xuất các bơm tiêm đã điền đầy để tạo ra lỗ trong bơm tiêm Luer. Chất chiết của pin vonfram được sử dụng trên dây chuyền sản xuất bởi BD được tạo ra sử dụng thuốc vò mAb1 (tương tự Chế phẩm A không chứa mAb1). Chất chiết pin không lọc chứa tất cả các loại vonfram có thể giữ lại trong bơm tiêm dưới dạng tạp chất (các muối vonfram tan và oxit vonfram không tan).

Các kết quả của phép phân tích SE-HPLC, như được thể hiện trong Bảng từ 37 đến 38, cho thấy rằng độ ổn định ở 25°C bị giảm so với ống tiêm nhỏ đối chứng không chứa vonfram đối với chế phẩm 0,6 mg/mL chứa mức vonfram ≥ 500 ppb. Bơm tiêm vonfram thấp thường chứa < 500 ppb vonfram, trong khi đó bơm tiêm bình thường có thể chứa rất nhiều vonfram và khoảng 2500 ppb.

Không quan sát thấy sự phân hủy đối với chế phẩm 0,6 mg/mL chứa vonfram lên đến 2500 ppb khi được ủ ở 5°C trong 6 tháng.

Bảng 37

Độ ổn định của mAb1 ở nồng độ 0,6 mg/mL khi bảo quản ở 25°C trong chất chiết pin vonfram (SE-HPLC)						
% MAb1 tự nhiên (SE-HPLC)						
Thời gian (tuần)	Ống tiêm đối chứng	50 ppb W	100 ppb W	500 ppb W	1000 ppb W	2500 ppb W
0	98,7	98,8	98,9	98,8	98,8	98,7
1	98,7	98,6	98,7	98,6	98,7	98,7
2	98,6	98,6	98,6	98,4	98,4	98,4
4	98,5	98,5	98,5	98,6	98,2	98,5
8	98,6	98,7	98,6	98,2	98,3	98,6
26	97,4	97,8	97,5	78,6	76,5	74,8
Chế phẩm: 0,6 mg/mL mAb1 trong 8% sucroza, 0,05% polysorbat 20, 10mM axetat, độ pH=5,0						

Bảng 38

Độ ổn định của mAb1 ở nồng độ 0,6 mg/mL khi bảo quản ở 5°C trong chất chiết pin vonfram (SE-HPLC)						
% MAb1 tự nhiên (SE-HPLC)						
Thời gian (tuần)	Ống tiêm đối chứng	50 ppb W	100 ppb W	500 ppb W	1000 ppb W	2500 ppb W
0	98,7	98,8	98,9	98,8	98,8	98,7
1	98,5	98,5	98,6	98,7	98,6	98,4
3	97,7	98,0	98,2	98,2	98,2	98,2
6	98,8	98,6	98,7	98,7	98,8	98,4
Chế phẩm: 0,6 mg/mL mAb1 trong 8% Sucroza, 0,05% polysorbat 20, axetat 10mM, độ pH=5,0						

Sáng chế không bị giới hạn phạm vi ở các phương án cụ thể được mô tả ở đây. Thực vậy, các cải biến khác nhau của sáng chế ngoài các phương án được mô tả ở đây sẽ trở lên rõ ràng với người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này nhờ phần mô tả ở trên và các hình vẽ đi kèm. Các cải biến này được dự định nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa:

(i) 50 đến 100 mg/ml kháng thể của người liên kết đặc hiệu với yếu tố sinh trưởng thần kinh của người (human nerve growth factor: hNGF),

(ii) 0,05% polysorbat 20;

(iii) 8% sucroza; và

(iv) 10 mM axetat;

trong đó

- kháng thể người này liên kết đặc hiệu với hNGF gồm có hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 20 và vùng cố định chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 31, và mỗi chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 22 và vùng cố định chuỗi nhẹ;
- dược phẩm này sau khi bảo quản 6 tháng ở 5°C, vẫn duy trì được độ ổn định sao cho 97% hoặc nhiều hơn lượng kháng thể được giữ lại ở dạng ban đầu của nó như được phát hiện bằng phương pháp sắc ký loại theo kích thước hiệu năng cao; và
- độ pH của dược phẩm này là 5,0.

2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này được chứa trong lọ thủy tinh hoặc bơm tiêm thủy tinh, lọ nhựa, và bơm tiêm nhựa.

3. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó

(a) lọ thủy tinh là lọ thủy tinh được phủ silic dioxit; tùy ý trong đó khoảng không gian trên của lọ thủy tinh này được nạp khí trơ để loại bỏ oxy, tốt hơn là trong đó khí trơ này là argon hoặc nitơ; hoặc

(b) bơm tiêm bao gồm pittông được phủ flocacbon; tùy ý trong đó bơm tiêm này là bơm tiêm có hàm lượng vonfram thấp, tốt hơn là bơm tiêm là bơm tiêm có hàm lượng vonfram thấp và bao gồm pittông được phủ flocacbon.

4. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2; trong đó dược phẩm này được chứa trong thiết bị tự tiêm hoặc thiết bị vi truyền.

5. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó dược phẩm này ở dạng được dùng trong tĩnh mạch hoặc dưới da.

LIỆT KÊ TRÌNH TỰ

<110> Scott Walsh
Terra Potocky
Daniel Dix
Renuka Sivendran

<120> Được phẩm được làm ổn định chứa kháng thể kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh

<130> Được chỉ định

<140> Được chỉ định

<141> Được nộp kèm theo đây

<150> 61/364,112

<151> 2010-07-14

<160> 31

<170> FastSEQ cho Windows phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 847

<212> ADN

<213> Người

<400> 1

```

agcgtccgga cccaataaca gttttacca gggagcagct ttctatcctg gccacactga 60
ggtgcatagc gtaatgtcca tggtgttcta cactctgata acagcttttc tgatcggcat 120
acaggcggaa ccacactcag agagcaatgt ccctgcagga cacaccatcc cccaagccca 180
ctggactaaa cttcagcatt cccttgacac tgcccttcgc agagcccga gcgccccggc 240
agcggcgata gctgcacgcg tggcggggca gaccgcgaac attactgtgg accccaggct 300
gtttaaaaag cggcgactcc gttcaccccg tgtgctgttt agcaccagc ctccccgtga 360
agctgcagac actcaggatc tggacttcga ggtcgggtgt gctgccccct tcaacaggac 420
tcacaggagc aagcgggtcat catcccatcc catcttccac aggggcgaat tctcgggtgtg 480
tgacagtgtc agcgtgtggg ttggggataa gaccaccgcc acagacatca agggcaagga 540
ggtgatggtg ttgggagagg tgagcattaa caacagtgtt ttcaaacagt acttttttga 600
gaccaagtgc cgggacccaa atcccgttga cagcgggtgc cggggcattg actcaaagca 660
ctggaactca tattgtacca cgactcacac ctttgtcaag gcgctgacca tggatggcaa 720
gcaggctgcc tggcgggtta tccggataga tacggcctgt atgtgtgtgc tcagcaggaa 780
ggctgtgaga agagcctgac ctgccgacac gctccctccc cctgcccctt ctacactctc 840
ctgggcc
847

```

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> Người

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 357

<212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp

<400> 3
 caggtgcagc tgggtgcagtc cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccctc cgtgaagggtg 60
 tcctgcaagg tgtccggctt caccctgacc gagctgtcca tgcactgggt gcggcaggcc 120
 cccggcaagg gcctggagtg gatgggcggc ttcgaccccg aggacggcga gaccatctac 180
 gcccagaagt tccagggccg ggtgaccatg accgaggaca cctccaccga caccgcctac 240
 atggagctgt cctccctgcg gtccgaggac accgccgtgt actactgctc caccatcttc 300
 ggctgtggtga ccaacttcga caactggggc cagggcaccc tggtgaccgt gtcctcc 357

<210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 4
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp 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
 Ser Thr Ile Phe Gly Val Val Thr Asn Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 5
 ggattcaccc tcactgaatt atcc

24

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 6
 Gly Phe Thr Leu Thr Glu Leu Ser
 1 5

<210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 7

tttgatcctg aagatgggtga aaca

24

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 8

Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr
1 5

<210> 9

<211> 36

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 9

tcaacgattt ttggagtgggt taccaacttt gacaac

36

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 10

Ser Thr Ile Phe Gly Val Val Thr Asn Phe Asp Asn
1 5 10

<210> 11

<211> 324

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 11

gacatccaga	tgacccagtc	cccctcctcc	ctgtccgcct	ccgtggggcga	ccgggtgacc	60
atcacctgcc	gggcctccca	ggccatccgg	aacgacctgg	gctggtacca	gcagaagccc	120
ggcaaggccc	ccaagcggct	gatctacgcc	gccttcaacc	tgcagtccgg	cgtgccctcc	180
cggttctccg	gctccggctc	cggcaccgag	ttcaccctga	ccatctcctc	cctgcagccc	240
gaggacttcg	ccacctacta	ctgccagcag	tacaaccggg	accctgggac	cttcggccag	300
ggcaccaagg	tgagatcaa	gcgg				324

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 12

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

<210> 13
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 13
 caggccatta gaaatgat

18

<210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 14
 Gln Ala Ile Arg Asn Asp
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 15
 gctgcattc

9

<210> 16
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 16
 Ala Ala Phe
 1

<210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 17

caacagtata atagataccc gtggacg

27

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 18

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 19

<211> 357

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 19

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggct	60
tcctgcaagg	tttccggatt	caccctcact	gaattatcca	ttcactgggt	gcgacaggct	120
cctggaaaag	ggcttgagtg	gatggggaggt	tttgatcctg	aagatgggtga	aacaatctac	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctacaga	cacagcctac	240
atggagctga	ccagcctgag	atcggaagac	acggccgtgt	attactgttc	aacgattttt	300
ggagtggtta	ccaactttga	caactggggc	caggggaacc	tggtcaccgt	ctcctca	357

<210> 20

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 20

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

<210> 21

<211> 324

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

```

<400> 21
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgcaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggccattaga aatgatttag gctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcattcaatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
agattcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagtag cctgcagcct 240
gaagatcttg caagttatta ctgtcaacag tataatagat acccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatcaa acga 324

```

```

<210> 22
<211> 108
<212> PRT
<213> Nhân tạo

```

```

<220>
<223> Tổng hợp

```

```

<400> 22
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ala Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Arg Asn Asp
          20           25           30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
        35           40           45
Tyr Ala Ala Phe Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Leu Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Trp
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
        100           105

```

```

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

```

```

<220>
<223> Tổng hợp

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(8)
<223> Xaa = Axit amin bất kỳ

```

```

<400> 23
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1           5

```

```

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

```

```

<220>
<223> Tổng hợp

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(8)
<223> Xaa = Axit amin bất kỳ

```

```

<400> 24
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1           5

```

<210> 25
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1) . . . (18)
 <223> Xaa = Axit amin bất kỳ

<400> 25
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa

<210> 26
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1) . . . (6)
 <223> Xaa = Axit amin bất kỳ

<400> 26
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 27
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1) . . . (3)
 <223> Xaa = Axit amin bất kỳ

<400> 27
 Xaa Xaa Xaa
 1

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1) . . . (9)
 <223> Xaa = Axit amin bất kỳ

<400> 28

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 29

<211> 330

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 29

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
			20				25					30			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90						95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165						170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230					235					240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				325					330						

<210> 30

<211> 327

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 30

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys 325

<210> 31
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 31
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

[illegible]