



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

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



1-0037942

(51)⁷ A61K 9/00; A61P 27/02; A61K 39/395 (13) B

-
- (21) 1-2017-01738 (22) 06/11/2015
(86) PCT/US2015/059571 06/11/2015 (87) WO 2016/073915 12/05/2016
(30) 62/076,770 07/11/2014 US; 62/088,061 05/12/2014 US
(45) 25/12/2023 429 (43) 25/09/2017 354A
(73) NOVARTIS AG (CH)
Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland
(72) ZHANG, Huixiang (US); BORING, Charles (US); KULSHRESHTHA, Alok (US);
ZENG, Yuhong (US); WAN, Li (US); ALANI, Laman (US).
(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)
-

(54) DƯỢC PHẨM CHO MẮT CHỨA NƯỚC CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG YẾU TỐ TĂNG TRƯỞNG NỘI MẠC MẠCH MÁU (VEGF), DỤNG CỤ PHÂN PHỐI VÀ CHẾ PHẨM ĐÔNG KHÔ CHỨA DƯỢC PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm cho mắt chứa nước chứa kháng thể kháng VEGF được bào chế ở nồng độ cao, thích hợp dùng để tiêm, tốt hơn là tiêm trong dịch kính của mắt. Dược phẩm có chứa nước này cũng hữu ích trong việc phân phối nồng độ cao của thành phần hoạt tính là kháng thể đến với bệnh nhân mà không có mức độ kết tụ kháng thể cao và không có mức độ cao các tiểu phân dưới mức nhìn thấy được. Dược phẩm có chứa nước theo sáng chế chứa kháng thể có nồng độ ít nhất là 50mg/ml. Dược phẩm có chứa nước theo sáng chế chứa đường, chất đệm, và chất hoạt động bề mặt. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các dụng cụ phân phối và chế phẩm đông khô chứa các dược phẩm này. Dược phẩm có chứa nước chứa kháng thể kháng VEGF này được sử dụng để phân phối kháng thể kháng VEGF đến với đối tượng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dược phẩm có chứa nước chứa kháng thể kháng VEGF và quy trình bào chế dược phẩm này. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các dụng cụ phân phối và dạng bào chế đông khô chứa dược phẩm này. Dược phẩm có chứa nước chứa kháng thể kháng VEGF này được sử dụng để phân phối kháng thể kháng VEGF đến với đối tượng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch máu (VEGF: vascular endothelial growth factor) là chất điều hòa hình thành mạch và phát triển mạch mới đã được biết đến, và đã được chứng minh là chất trung gian quan trọng của quá trình phát triển mạch mới liên quan đến khối u và các rối loạn nội nhãn (Ferrara *et al.* Endocr. Rev. 18:4-25 (1997)). mARN VEGF bị biểu hiện quá mức ở nhiều loại khối u ở người, và nồng độ của VEGF trong dịch của mắt tương quan cao độ với sự có mặt của sự tăng sinh chủ động của mạch máu ở bệnh nhân mắc bệnh lý võng mạc do tiểu đường và các bệnh lý võng mạc liên quan đến chứng thiếu máu cục bộ khác (Berkman *et al.*, J Clin Invest 91:153-159 (1993); Brown *et al.* Human Pathol. 26:86-91 (1995); Brown *et al.* Cancer Res. 53:4727-4735 (1993); Mattern *et al.* Brit. J. Cancer. 73:931-934 (1996); và Dvorak *et al.* Am J. Pathol. 146:1029-1039 (1995); Aiello *et al.* N. Engl. J. Med. 331:1480-1487 (1994)). Ngoài ra, các nghiên cứu gần đây đã cho thấy sự có mặt của VEGF được khu trú trong các màng tân mạch hắc mạc ở các bệnh nhân chịu ảnh hưởng của AMD (Lopez *et al.* Invest. Ophtholmo. Vis. Sci. 37:855-868 (1996)). Kháng thể trung hòa kháng VEGF có thể được sử dụng để ức chế sự tăng trưởng của nhiều dòng tế bào khối u ở người trong chuột trụi lông và cũng ức chế hình thành mạch nội nhãn ở các mẫu rối loạn võng mạc do thiếu máu cục bộ (Kim *et al.* Nature 362:841-844 (1993); Warren *et al.* J. Clin. Invest 95:1789-1797 (1995); Borgstrom *et al.* Cancer Res. 56:4032-4039 (1996); và Melnyk *et al.* Cancer Res. 56:921-924 (1996)) (Adamis *et al.* Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996)).

Nhiều kháng thể được cấp phép để sử dụng trong điều trị ở người và các động vật có vú khác, bao gồm các kháng thể kháng VEGF. Nồng độ của các kháng thể điều trị trong các dược phẩm dạng lỏng khác nhau rất lớn, phụ thuộc vào, ví dụ, đường dùng. Thường có nhu cầu đối với dược phẩm bào chế chứa nồng độ kháng thể cao khi mong muốn thể tích nhỏ. Ví dụ, dược phẩm có nồng độ cao có thể được mong muốn để sử dụng dưới da hoặc tiêm trong dịch kính của mắt.

Tuy nhiên, dược phẩm bào chế chứa nồng độ kháng thể cao có thể có thời hạn sử dụng ngắn, và các kháng thể được bào chế có thể bị mất hoạt tính sinh học do các tính chất không bền với tác nhân vật lý và hóa học trong quá trình lưu giữ. Kết tụ, khử amin và oxi hóa được biết đến là các nguyên nhân phổ biến nhất của phân hủy kháng thể. Cụ thể là, kết tụ có thể có tiềm năng dẫn đến đáp ứng miễn dịch gia tăng ở bệnh nhân, dẫn đến các lo ngại về an toàn. Do đó, cần giảm thiểu tối đa hoặc ngăn ngừa kết tụ.

Sự tạo thành các tiểu phân trong dược phẩm bào chế điều trị ứng dụng sinh học cũng là lo ngại chính về chất lượng, do các tiểu phân có kích thước nằm trong khoảng hàng chục micromet đến dưới milimet và milimet, nói chung là, có thể được nhìn thấy bằng mắt thường (xem Das, 2012, *AAPS PharmSciTech*, 13:732-746). Các tiểu phân trong các chế phẩm điều trị dùng cho mắt có thể gây ra tổn thương mắt. Vì thế, có các tiêu chuẩn kiểm soát để đảm bảo hàm lượng tiểu phân dưới mức nhìn thấy được trong các chế phẩm dùng cho mắt nằm trong các giới hạn nhất định. Ví dụ, Dược điển Hoa Kỳ (USP: U.S. Pharmacopeial Convention) đã đặt ra các yêu cầu đối với tiểu phân trong các dung dịch dùng cho mắt, như là số lượng tối đa của các tiểu phân có đường kính $\geq 10\mu\text{m}$ là 50/ml, số lượng tối đa của các tiểu phân có đường kính $\geq 25\mu\text{m}$ là 5/ml, và số lượng tối đa của các tiểu phân có đường kính $\geq 50\mu\text{m}$ là 2/ml được xác định bằng phương pháp đếm tiểu phân sử dụng kính hiển vi (xem Chương chung <789> của USP).

Các phương pháp bào chế dược phẩm chứa nồng độ kháng thể cao đã được biết đến. Tuy nhiên, chưa tồn tại phương án tiếp cận chung để khắc phục tác động không thể dự đoán được của trình tự axit amin của kháng thể đến xu hướng tạo ra kết tụ hoặc phân hủy khi có mặt các loại tá dược được dùng, chất đệm được dùng, v.v. Ngoài ra, bào chế chế phẩm dùng cho mắt có nồng độ protein cao (như là kháng thể) có mức độ chấp nhận được của các tiểu phân dưới mức nhìn thấy được là khó khăn và không thể dự đoán được.

Mục tiêu của sáng chế là đề xuất được phẩmbào chế được cải thiện có nồng độ kháng thể kháng VEGF cao và có mức độ thấp của kết tụ kháng thể và các tiểu phân dưới mức nhìn thấy được, thích hợp để sử dụng chongười, cụ thể là với mắt của người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo đó, sáng chế đề cập đến được phẩm có chứa nước có nồng độ kháng thể kháng VEGF cao thích hợp dùng để tiêm mắt. Theo các khía cạnh nhất định, được phẩm có chứa nước theo sáng chế thể hiện mức độ phân hủy hoặc kết tụ kháng thể thấp đến mức không thể phát hiện được, mất rất ít hoặc không mất hoạt tính sinh học trong quá trình sản xuất, bào chế, phân phối và lưu giữ lâu dài, nồng độ của kháng thể kháng VEGF ít nhất là khoảng 50mg/ml, 60mg/ml, 80mg/ml, 100mg/ml, 120mg/ml, 140mg/ml, 160mg/ml, 180mg/ml, hoặc 200mg/ml.

Sáng chế đề xuất được phẩm có chứa nước chứa kháng thể kháng VEGF, chất ổn định, chất đệm, và chất hoạt động bề mặt. Theo các khía cạnh nhất định, được phẩm có chứa nước chứa: (i) ít nhất 50mg/ml kháng thể kháng VEGF, (ii) sucroza hoặc trehaloza làm chất ổn định, (iii) xitrat hoặc histidin làm chất đệm, và (iv) polysorbat 80 làm chất hoạt động bề mặt.

Theo các khía cạnh nhất định, được phẩm có chứa nước chứa nồng độ khoảng 4,5% - 11% w/v (khối lượng/thể tích) của sucroza hoặc nồng độ 5% - 10% của trehaloza, nồng độ 0,006% đến 0,012% (khối lượng/ thể tích) của axit xitric, nồng độ 0,2% đến 0,6% của trinatri xitrat dihydrat (khối lượng/ thể tích), và nồng độ khoảng 0,01% đến 0,1% (khối lượng/ thể tích) của Polysorbat 80, trong đó độ pH của được phẩmbào chế này nằm trong khoảng 6,3 đến 7,3.

Các phương án được ưu tiên cụ thể theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ phần mô tả chi tiết hơn dưới đây cho các phương án được ưu tiên nhất định và phần yêu cầu bảo hộ.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

FIG. 1 thể hiện biểu đồ kết quả của thử nghiệm độ đục đối với 1008 được bào chế ở độ pH khác nhau. Trục x trình bày thời gian ủ ở 55°C; trong khi trục y trình bày mật độ quang được theo dõi ở 350nm.

FIG. 2A và FIG. 2B thể hiện thử nghiệm độ đục theo dõi các thay đổi ở OD₃₆₀ với các dược phẩm chứa 1008 khác nhau được ủ ở 55°C trong 180 phút (FIG. 2A). Các đường cong OD₃₆₀ thu được trong 60 phút đã được giãn cách và được thể hiện trong (FIG. 2B). Số của mẫu trong Fig. 2A và 2B tương ứng với số của dược phẩm trong bảng 13.

FIG. 3 thể hiện thử nghiệm độ đục với các dữ liệu được thu trong khoảng thời gian từ 0 phút đến 90 phút để đơn giản hóa. Toàn bộ thí nghiệm là 180 phút. Những thay đổi về giá trị OD₃₆₀ được theo dõi ở các dược phẩm chứa 1008 khác nhau được ủ ở 55°C. Số của mẫu trong Fig này tương ứng với số của dược phẩm bào chế trong bảng 15.

FIG. 4 là sơ đồ thể hiện các kết quả SEC cho đỉnh chính trong số các đỉnh của tám dược phẩm bào chế được chọn trong suốt thời gian lưu giữ 6 tuần ở 40°C.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất dược phẩm có chứa nước có chứa nồng độ cao của kháng thể kháng VEGF. Theo các phương án nhất định, dược phẩm có chứa nước theo sáng chế ổn định trong ít nhất 18 tháng ở 2-8°C và thích hợp để sử dụng cho mắt, bao gồm tiêm hoặc truyền. Theo phương án cụ thể, dược phẩm có chứa nước theo sáng chế đáp ứng các yêu cầu trong USP <789> liên quan đến sự có mặt của các tiểu phân. Do đó, theo các phương án nhất định, số lượng tối đa của các tiểu phân có đường kính $\geq 10\mu\text{m}$ trong dược phẩm có chứa nước theo sáng chế là 50/ml, số lượng tối đa của các tiểu phân có đường kính $\geq 25\mu\text{m}$ trong dược phẩm có chứa nước theo sáng chế là 5/ml, và số lượng tối đa của các tiểu phân có đường kính $\geq 50\mu\text{m}$ trong dược phẩm có chứa nước theo sáng chế là 2/ml, số lượng tiểu phân đã nêu được xác định bằng phương pháp đếm tiểu phân nhờ sự che khuất ánh sáng và/hoặc phương pháp đếm tiểu phân sử dụng kính hiển vi như được yêu cầu bởi Chương chung <789> của Dược điển Hoa Kỳ.

Khi được sử dụng ở đây, dược phẩm "có chứa nước" là chế phẩm thích hợp để dùng trong dược học, trong đó chất mang chứa nước là nước cất. Chế phẩm thích hợp để dùng trong dược học có thể là chế phẩm được khử trùng, đồng nhất, và/hoặc đẳng trương. Dược phẩm có chứa nước có thể được bào chế trực tiếp ở dạng chứa nước, ví dụ, ở dạng ống tiêm được nạp trước sẵn sàng để sử dụng ("dược phẩm bào chế dạng

lông") hoặc ở dạng đông khô được hoàn nguyên ngay trước khi sử dụng. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "dược phẩm có chứa nước" để chỉ dược phẩm dạng lỏng hoặc dược phẩm dạng đông khô được hoàn nguyên. Theo các phương án nhất định, dược phẩm có chứa nước theo sáng chế thích hợp để sử dụng cho mắt với đối tượng là người. Theo phương án cụ thể, dược phẩm có chứa nước theo sáng chế thích hợp để sử dụng trong dịch kính. Theo phương án khác, dược phẩm có chứa nước theo sáng chế thích hợp để sử dụng bằng cách truyền trong dịch kính.

Sáng chế đề xuất các dược phẩm mới, cụ thể là các dược phẩm mới trong đó thành phần hoạt tính gồm kháng thể kháng VEGF của người. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến dược phẩm có chứa nước với nồng độ cao của kháng thể kháng VEGF. Kháng thể kháng VEGF được ưu tiên trong dược phẩm theo sáng chế đã được mô tả trong WO 2009/155724, toàn bộ các nội dung của nó được kết hợp ở đây bằng cách tham chiếu.

Thuật ngữ "kháng thể" khi được sử dụng ở đây bao gồm toàn bộ kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên bất kỳ (tức là, "phần gắn kết kháng nguyên", "polypeptit gắn kết kháng nguyên" hoặc "chất gắn kết miễn dịch") hoặc chuỗi đơn của chúng. "Kháng thể" bao gồm glycoprotein chứa ít nhất hai chuỗi nặng (H: heavy chain) và hai chuỗi nhẹ (L: light chain) được nối với nhau bằng các liên kết disulfua, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của chúng. Mỗi chuỗi nặng gồm vùng biến đổi trên chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là V_H) và vùng cố định trên chuỗi nặng. Vùng cố định trên chuỗi nặng gồm ba miền, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ gồm vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là V_L) và vùng cố định trên chuỗi nhẹ. Vùng cố định trên chuỗi nhẹ gồm một miền, CL. Các vùng V_H và V_L ngoài ra có thể được chia nhỏ hơn thành các vùng siêu biến, được gọi là vùng quyết định bổ sung (CDR: complementarity determining region), nằm xen kẽ với các vùng được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung hoạt động (FR: framework region). Mỗi V_H và V_L gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu amino đến đầu carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa miền gắn kết tương tác với kháng nguyên. Các vùng cố định của kháng thể có thể là trung gian gắn kết phân tử globulin miễn dịch với các mô hoặc yếu tố của vật chủ, bao gồm nhiều loại tế bào

của hệ miễn dịch (ví dụ, các tế bào thực hiện) và thành phần thứ nhất (Clq) của hệ thống bổ thể cổ điển.

Thuật ngữ “phần gắn kết kháng nguyên” của kháng thể (hoặc đơn giản là “phần kháng thể”) để chỉ một hoặc nhiều mảnh kháng thể giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, VEGF). Đã được chứng minh rằng chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bởi các mảnh của kháng thể có chiều dài đủ. Các ví dụ về mảnh gắn kết kháng nguyên được bao hàm bên trong thuật ngữ “phần gắn kết kháng nguyên” của kháng thể bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hóa trị một gồm các miền V_L , V_H , CL và CH1; (ii) mảnh $F(ab')_2$, mảnh hóa trị hai gồm hai mảnh Fab được nối với nhau bằng cầu disulfua ở vùng bản lề; (iii) mảnh Fd gồm các miền V_H và CH1; (iv) mảnh Fv gồm các miền V_L và V_H của cánh tay đơn của kháng thể, (v) mảnh dAb hoặc miền đơn (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), gồm miền V_H ; và (vi) vùng quyết định bổ sung (CDR: complementarity determining region) được phân lập hoặc (vii) tổ hợp của hai hoặc nhiều CDR được phân lập có thể tùy ý được liên kết với nhau bằng phân tử nối tổng hợp. Ngoài ra, mặc dù hai miền của mảnh Fv, V_L and V_H , được mã hóa bằng các gen riêng biệt, chúng có được liên kết với nhau, bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng phân tử cầu nối tổng hợp cho phép chúng được tạo ra ở dạng protein duy nhất trong đó các vùng V_L và V_H tạo thành cặp với nhau để tạo ra các phân tử hóa trị một (được biết đến là Fv chuỗi đơn (scFv: single-chain Fv); xem ví dụ, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; và Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Các kháng thể chuỗi đơn này cũng được chủ định là được bao gồm bởi thuật ngữ “phần gắn kết kháng nguyên” của kháng thể. Các mảnh kháng thể này thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã được biết đến bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực này, và các mảnh này được sàng lọc để sử dụng theo phương thức giống như là các kháng thể nguyên vẹn. Các phần gắn kết kháng nguyên có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc bằng cách phân cắt hóa học hoặc bằng enzym các phân tử globulin miễn dịch nguyên vẹn. Các kháng thể có thể là isotyp khác nhau có thể là của isotyp khác nhau, ví dụ, kháng thể IgG (ví dụ, phân loại IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE, hoặc IgM.

Theo phương án được ưu tiên, được phẩm có chứa nước theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2.

VH: SEQ ID NO: 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFI
DPDDDPYYATWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSG
WGLDIWGQGT LVT VSS

VL: SEQ ID NO: 2

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLA
SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD DFATYYCQNVYLASTNGANFGQG TKLTV
LG

Theo một phương án được ưu tiên khác, kháng thể kháng VEGF là mảnh kháng thể Fv chuỗi đơn (scFv: single-chain Fv) chứa trình tự:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLA
STLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD DFATYYCQNVYLASTNGANF
QG TKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL
RLSCTASGFSLTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFI DPDDDPYYATWAK
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ
GTLVT VSS (SEQ ID NO: 3)

Kháng thể kháng VEGF trong được phẩm có chứa nước theo sáng chế có thể được tạo ra, ví dụ, như được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2009/155724. scFv có thể được tạo ra bằng cách sử dụng vector biểu hiện, như được mô tả trong tài liệu nêu trên. Methionin có nguồn gốc từ codon khởi đầu trong vector biểu hiện có mặt trong protein cuối cùng trong các trường hợp trong đó nó không bị phân cắt sau dịch mã (xem SEQ ID NO: 4 trong phần ví dụ thực hiện sáng chế).

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng VEGF trong được phẩm có chứa nước theo sáng chế gồm CDR1, CDR2 và CDR 3 của chuỗi nặng như được nêu

tương ứng trong SEQ ID NO: 5, 6, và 7, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ như được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 8, 9, và 10.

SEQ ID NO: 5	GFSLTDYYMT
SEQ ID NO: 6	FIDPDDDPYYATWAKG
SEQ ID NO: 7	GDHNSGWGLDI
SEQ ID NO: 8	QASEIIHSWLA
SEQ ID NO: 9	LASTLAS
SEQ ID NO: 10	QNVYLASTNGAN

Theo một phương án, nồng độ của kháng thể kháng VEGF trong dược phẩm có chứa nước theo sáng chế ít nhất là 50mg/ml. Tốt hơn là, dược phẩm có chứa nước theo sáng chế chứa kháng thể kháng VEGF ở nồng độ khoảng 50mg/ml, khoảng 60mg/ml, khoảng 70mg/ml, khoảng 80mg/ml, khoảng 90mg/ml, khoảng 100mg/ml, khoảng 110mg/ml, khoảng 120mg/ml, khoảng 130mg/ml, khoảng 140mg/ml, khoảng 150mg/ml, khoảng 160mg/ml, khoảng 170mg/ml, khoảng 180mg/ml, khoảng 190mg/ml, khoảng 200mg/ml, khoảng 210mg/ml, khoảng 220mg/ml, khoảng 230mg/ml, khoảng 240mg/ml, khoảng 250mg/ml hoặc khoảng 300mg/ml.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm có chứa nước theo sáng chế chứa kháng thể kháng VEGF có nồng độ nằm trong khoảng từ 60mg/ml đến 120mg/ml, ví dụ, kháng thể chứa SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2.

Theo một phương án, dược phẩm có chứa nước theo sáng chế chứa kháng thể kháng VEGF chứa SEQ ID NO: 3 ở nồng độ 60mg/ml.

Theo phương án khác, dược phẩm có chứa nước theo sáng chế chứa kháng thể kháng VEGF chứa SEQ ID NO: 3 ở nồng độ 120mg/ml.

Dược phẩm có chứa nước theo sáng chế bao gồm, ngoài kháng thể kháng VEGF, còn các thành phần như là một hoặc nhiều thành phần trong số các thành phần sau: (i) chất ổn định; (ii) chất đệm; (iii) chất hoạt động bề mặt; và (iv) axit amin tự do. Việc bao gồm mỗi thành phần bổ sung trong các thành phần bổ sung này có thể mang lại cho dược phẩm độ kết tụ kháng thể kháng VEGF thấp. Tốt hơn là, dược phẩm có chứa nước

theo sáng chế chứa, ngoài kháng thể kháng VEGF: (i) chất ổn định; (ii) chất đệm; và (iii) chất hoạt động bề mặt.

Chất ổn định thích hợp để sử dụng với sáng chế có thể hoạt động như là, ví dụ, các chất tăng cường độ nhớt, chất độn, các chất hòa tan, và/hoặc chất tương tự. Chất ổn định này có thể là chất ổn định ion hoặc không ion (ví dụ, đường). Các chất ổn định là đường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đường đơn (monosacarit), ví dụ, fructoza, maltoza, galactoza, glucoza, D-mannoza, sorboza và tương tự; đường đôi (disacarit), ví dụ lactoza, sucroza, trehaloza, xelobioza, và tương tự; đường đa (polysacarit), ví dụ, rafinoza, meleziotoza, maltodextrin, dextran, tinh bột, và tương tự; và các alditol, như là manitol, xylitol, maltitol, lactitol, xylitol sorbitol (gluxitol) và tương tự. Ví dụ, đường có thể là sucroza, trehaloza, rafinoza, maltoza, sorbitol hoặc manitol. Đường có thể là rượu đường hoặc đường amino. Sucroza và trehaloza được ưu tiên. Được ưu tiên nhất là sucroza. Chất ổn định ion có thể bao gồm các muối như là NaCl hoặc các thành phần axit amin như là arginin-HCl.

Các chất đệm thích hợp để sử dụng với sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, muối axit hữu cơ như là muối của axit xitric, axit ascorbic, axit gluconic, axit cacbonic, axit tartaric, axit succinic, axit axetic hoặc axit phtalic; Tris, thometamin clohydric, hoặc đệm phosphat. Ngoài ra, các thành phần axit amin cũng có thể được sử dụng làm chất đệm. Đệm xitrat hoặc đệm histidin đặc biệt hữu dụng, bao gồm đệm histidin 10-20mM, ví dụ, histidin 0,13% đến 0,26% khối lượng/thể tích (w/v) và histidin clohydric monohydrat 0,03% – 0,07% (khối lượng/ thể tích)), hoặc 10-đệm xitrat 20mM, ví dụ, axit xitric 0,006% đến 0,012% (khối lượng/ thể tích) và trinatri xitrat dihydrat 0,2% đến 0,6% (khối lượng/ thể tích). Axit xitric được sử dụng trong dược phẩm bào chế theo sáng chế có thể ở dạng hydrat hóa bất kỳ, ví dụ, dạng khan hoặc monohydrat.

Dược phẩm có chứa nước chứa chất đệm hoặc chất điều chỉnh pH này mang đến sự kiểm soát độ pH được cải thiện. Theo phương án nhất định, dược phẩm có chứa nước theo sáng chế có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 8,0, nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, hoặc nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0. Theo một phương án, độ pH của dược phẩm có chứa nước theo sáng chế là khoảng 6,3 đến

khoảng 7,3. Theo phương án cụ thể, dược phẩm có chứa nước theo sáng chế có độ pH bằng khoảng 6,8.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất hoạt động bề mặt" ở đây để chỉ các chất hữu cơ có các cấu trúc lưỡng tính; tức là, chúng bao gồm các nhóm có các xu hướng hòa tan ngược nhau, điển hình là chuỗi hydrocacbon tan trong dầu và nhóm ion tan trong nước. Các chất hoạt động bề mặt có thể được phân loại, phụ thuộc vào điện tích của gốc hoạt động bề mặt, thành các chất anion, các chất cation và các chất phân tán cho nhiều loại dược phẩm và dạng bào chế được chứa các nguyên liệu sinh học.

Các chất hoạt động bề mặt thích hợp để sử dụng với sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất hoạt động bề mặt không ion, các chất hoạt động bề mặt ion và các chất hoạt động bề mặt lưỡng tính. Các chất hoạt động bề mặt điển hình để sử dụng với sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các sorbitan este của axit béo (ví dụ, sorbitan monocaprylat, sorbitan monolaurat, sorbitan monopalmitat), sorbitan trioleat, glycerin este của axit béo (ví dụ, glycerin monocaprylat, glycerin monomyristat, glycerin monostearat), các polyglycerin este của axit béo (ví dụ, decaglyxeryl monostearat, decaglyxeryl distearat, decaglyxeryl monolinoleat), các polyoxyetylen sorbitan este của axit béo (ví dụ, polyoxyetylen sorbitan monolaurat, polyoxyetylen sorbitan monooleat, polyoxyetylen sorbitan monostearat, polyoxyetylen sorbitan monopalmitat, polyoxyetylen sorbitan trioleat, polyoxyetylen sorbitan tristearat), các polyoxyetylen sorbitol este của axit béo (ví dụ, polyoxyetylen sorbitol tetrastearat, polyoxyetylen sorbitol tetraoleat), polyoxyetylen glycerin este của axit béo (ví dụ, polyoxyetylen glyxeril monostearat), các polyetylen glycol este của axit béo (ví dụ, polyetylen glycol distearat), các polyoxyetylen alkyl ete (ví dụ, polyoxyetylen lauryl ete), polyoxyetylen polyoxypropylen alkyl ete (ví dụ, polyoxyetylen polyoxypropylen glycol, polyoxyetylen polyoxypropylen propyl ete, polyoxyetylen polyoxypropylen xetyl ete), polyoxyetylen alkylphenyl ete (ví dụ, polyoxyetylen nonylphenyl ete), dầu thầu dầu được hydro hóa polyoxyetylen (ví dụ, dầu thầu dầu polyoxyetylen, dầu thầu dầu được hydro hóa polyoxyetylen), các dẫn xuất sáp ong polyoxyetylen (ví dụ, polyoxyetylen sorbitol sáp ong), các dẫn xuất polyoxyetylen lanolin (ví dụ, polyoxyetylen lanolin), và các polyoxyetylen amit của axit béo (ví dụ, polyoxyetylen amit của axit stearic); các C₁₀-C₁₈ alkyl sulfat (ví dụ, natri xetyl sulfat,

natri lauryl sulfat, natri oleyl sulfat), polyoxyetylen C₁₀-C₁₈ alkyl ete sulfat với lượng trung bình là 2 đến 4 mol của các đơn vị etylen oxit được thêm vào (ví dụ, natri polyoxyetylen lauryl sulfat), và các muối của este C₁-C₁₈ alkyl sulfosuccinat (ví dụ, muối natri của este lauryl sulfosuccinat); và các chất hoạt động bề mặt tự nhiên như là lecithin, glycerophospholipit, sphingophospholipit (ví dụ, sphingomyelin), và các sucroza este của axit béo C₁₂-18. Dược phẩm có thể chứa một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt trong số các chất hoạt động bề mặt này. Các chất hoạt động bề mặt được ưu tiên là các polyoxyetylen sorbitan este của axit béo, ví dụ, polysorbat 20, 40, 60 hoặc 80. Polysorbat 80 đặc biệt được ưu tiên.

Các axit amin tự do thích hợp để sử dụng với sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, arginin, lysin, histidin, ornithin, isoleuxin, leuxin, alanin, glyxin axit glutamic hoặc axit aspartic. Sự bao gồm axit amin có tính bazơ được ưu tiên tức là arginin, lysin và/hoặc histidin. Nếu dược phẩm chứa histidin thì có thể hoạt động như là chất đệm và như là axit amin tự do, nhưng khi đệm histidin được sử dụng, điển hình là chứa axit amin tự do không phải histidin, ví dụ, chứa đệm histidin và lysin. Axit amin có thể có ở dạng D và/hoặc dạng L, nhưng dạng L là điển hình. Axit amin có thể có mặt như là muối thích hợp bất kỳ, ví dụ, muối clohydric, như là arginin-HCl. Theo một phương án được ưu tiên, dược phẩm có chứa nước theo sáng chế không chứa bất kỳ axit amin tự do nào trong số các axit amin tự do này.

Theo phương án được ưu tiên, đường có trong dược phẩm có chứa nước theo sáng chế, ví dụ, sau khi hoàn nguyên dạng đông khô trong nước, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 3% đến 11% (khối lượng/ thể tích). Theo các phương án nhất định, đường là sucroza ở nồng độ nằm trong khoảng 4,5% đến khoảng 11%, hoặc trehaloza ở nồng độ nằm trong khoảng 5% đến khoảng 10%. Sucroza ở nồng độ 6,75% (khối lượng/ thể tích) được ưu tiên.

Theo phương án được ưu tiên, chất đệm có trong dược phẩm có chứa nước theo sáng chế, ví dụ, sau khi hoàn nguyên dạng đông khô trong nước, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1mM đến 60mM, ví dụ, 10-40mM, 15-30mM, 15-25mM. Theo các phương án nhất định, chất đệm là xitrat hoặc histidin. Đệm xitrat ở nồng độ 15mM được ưu tiên.

Theo phương án được ưu tiên, chất hoạt động bề mặt có trong dược phẩm có chứa nước theo sáng chế, ví dụ, sau khi hoàn nguyên dạng đông khô trong nước, ở nồng độ lên đến 0,2% (theo thể tích), ví dụ, 0,01-0,1%, 0,03-0,08%, 0,04-0,08%. Polysorbat 80 ở nồng độ 0,05% được ưu tiên.

Các tá dược được bao gồm khác, có thể được sử dụng trong dược phẩm có chứa nước theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các chất kháng vi sinh vật, chất chống oxy hóa, chất khử tĩnh điện, các lipid như là phospholipit hoặc axit béo, steroid như là cholesterol, các tá dược protein như là albumin huyết thanh (albumin huyết thanh của người), albumin của người tái tổ hợp, gelatin, casein, các ion đối nghịch tạo muối như là natri và tương tự. Các tá dược và/hoặc các chất phụ gia dược dụng này và các tá dược và/hoặc các chất phụ gia dược dụng đã biết bổ sung thích hợp để sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế đã được biết đến trong lĩnh vực này, ví dụ, như được liệt kê trong "The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th edition, Rowe et al., Eds., American Pharmaceuticals Association (2003); và Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 21st edition, Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005).

Các dược phẩm theo sáng chế được ưu tiên được trình bày trong bảng 40 trong phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm dạng đông khô của kháng thể kháng VEGF được bao gồm để cung cấp dược phẩm có chứa nước theo sáng chế để điều trị cho bệnh nhân.

Các kỹ thuật đông khô kháng thể được biết rõ trong lĩnh vực này, ví dụ, xem tài liệu của John F. Carpenter và Michael J. Pikal, 1997 (*Pharm. Res.* 14, 969-975); Xialin (Charlie) Tang và Michael J. Pikal, 2004 (*Pharm. Res.* 21, 191-200).

Trước khi dạng đông khô có thể được sử dụng với bệnh nhân, nó nên được hoàn nguyên bằng chất hoàn nguyên chứa nước. Bước này cho phép kháng thể và các thành phần khác trong chế phẩm đông khô tái hòa tan để tạo thành dung dịch thích hợp để tiêm cho bệnh nhân.

Thể tích của nguyên liệu có chứa nước được sử dụng để hoàn nguyên quyết định nồng độ của kháng thể trong dược phẩm thu được. Tái hoàn nguyên bằng thể tích chất hoàn nguyên nhỏ hơn thể tích trước đông khô tạo ra chế phẩm có nồng độ cao hơn chế phẩm trước khi đông khô. Hệ số hoàn nguyên (thể tích của dược phẩm bào chế sau khi hoàn nguyên: thể tích của dược phẩm bào chế trước khi đông khô) có thể từ 1:0,5 đến 1:6. Hệ số hoàn nguyên 1:3 là hữu ích. Như đã nêu trên, chế phẩm dạng đông khô theo sáng chế có thể được hoàn nguyên để tạo ra dược phẩm có chứa nước với nồng độ cao của kháng thể kháng VEGF bằng ít nhất là 50mg/ml (tức là, ít nhất 60mg/ml, 70mg/ml, 80mg/ml, 90mg/ml, 100mg/ml, 110mg/ml, 120mg/ml, hoặc 130mg/ml), và thể tích của chất hoàn nguyên theo đó sẽ được chọn. Nếu yêu cầu, dược phẩm hoàn nguyên có thể được pha loãng trước khi sử dụng với bệnh nhân nếu thích hợp để cung cấp liều dự định.

Các chất hoàn nguyên điển hình cho các kháng thể được hoàn nguyên bao gồm nước tiết trùng hoặc đệm tiết trùng, tùy ý chứa chất bảo quản. Nếu chế phẩm dạng đông khô chứa chất đệm thì chất hoàn nguyên cũng có thể chứa chất đệm (có thể là chất đệm giống hoặc khác với chất đệm của chế phẩm dạng đông khô) hoặc thay vào đó nó có thể không chứa chất đệm (ví dụ, nước để pha tiêm (WFI: water for injection), hoặc nước muối sinh lý).

Dược phẩm có chứa nước theo sáng chế chứa kháng thể kháng VEGF có thể được sử dụng để điều trị nhiều loại bệnh hoặc rối loạn khác nhau. Dược phẩm chứa kháng thể kháng VEGF đặc biệt hữu ích để điều trị các bệnh về mắt do phát triển mạch mới ở đối tượng.

“Bệnh về mắt do phát triển mạch mới” có thể được điều trị bằng cách sử dụng dược phẩm có chứa nước theo sáng chế bao gồm, tình trạng, bệnh, hoặc rối loạn liên quan đến phát triển mạch mới ở mắt, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hình thành mạch bất thường, phát triển mạch mới hắc mạc (CNV: choroidal neovascular), tính thấm qua mạch máu võng mạc, phù võng mạc, bệnh lý võng mạc do tiểu đường (đặc biệt là bệnh lý võng mạc do tiểu đường tăng sinh), phù điểm vàng do tiểu đường, thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD) do phát triển mạch mới (rò rỉ dịch), bao gồm nAMD (AMD do phát triển mạch mới) liên quan đến CNV, di chứng liên quan đến thiếu máu

võng mạc, tắc tĩnh mạch võng mạc trung tâm (CRVO), và phát triển mạch mới bán phần sau của mắt.

Dược phẩm có chứa nước theo sáng chế, có thể chứa các thành phần hoạt tính khác ngoài kháng thể kháng VEGF. Các chất có hoạt tính dược khác có thể gồm, ví dụ, các kháng thể khác hữu ích để điều trị bệnh về mắt.

Dược phẩm có chứa nước theo sáng chế có thể được sử dụng với bệnh nhân. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đối tượng” hoặc “bệnh nhân” để chỉ người và các động vật có vú không phải người, bao gồm nhưng, không chỉ giới hạn ở, linh trưởng, thỏ, chó, ngựa, mèo, cừu, và bò. Tốt hơn là, đối tượng hoặc bệnh nhân là người.

Việc sử dụng điển hình là sẽ qua ống tiêm. Do đó, sáng chế đề xuất dụng cụ phân phối (ví dụ, ống tiêm) chứa dược phẩm theo sáng chế (ví dụ, ống tiêm được nạp trước). Các bệnh nhân sẽ nhận lượng có hiệu quả của kháng thể kháng VEGF làm thành phần hoạt tính chủ yếu (tức là, lượng đủ để đạt được hoặc ít nhất là đạt được phần nào tác động mong muốn). Liệu có hiệu quả điều trị là thích đáng nếu nó có thể tạo ra thậm chí chỉ là một sự thay đổi gia tăng các triệu chứng hoặc tình trạng liên quan đến bệnh này. Liệu có hiệu quả điều trị không cần phải chữa khỏi hoàn toàn bệnh hoặc loại bỏ hoàn toàn các triệu chứng. Tốt hơn là, liệu có hiệu quả điều trị có thể ít nhất là chặn lại một phần bệnh và các biến chứng của nó ở bệnh nhân đã mắc bệnh này. Lượng có hiệu quả với việc sử dụng này sẽ phụ thuộc vào tính nghiêm trọng của rối loạn được điều trị và tình trạng tổng quát về hệ miễn dịch của bệnh nhân.

Độ lớn của liều dùng có thể được xác định dễ dàng sử dụng các kỹ thuật điều chỉnh liều đã biết bởi bác sĩ có kỹ năng thông thường trong điều trị bệnh hoặc tình trạng này. Lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể kháng VEGF được sử dụng trong dược phẩm có chứa nước theo sáng chế được xác định bằng cách, ví dụ, xem xét các thể tích liều mong muốn và (các) chế độ sử dụng. Điển hình là, chế phẩm có hiệu quả điều trị được sử dụng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,001mg/ml đến khoảng 200mg/ml/liều. Tốt hơn là, liều dùng được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là khoảng 60mg/ml đến khoảng 120mg/ml (tức là, khoảng 60mg/ml, 70mg/ml, 80mg/ml, 90mg/ml, 100mg/ml, 110mg/ml, hoặc 120mg/ml). Theo phương án được ưu tiên, liều

dùng của kháng thể kháng VEGF được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là 60mg/ml hoặc 120mg/ml.

Theo các phương án nhất định, liều được sử dụng trực tiếp với mắt của bệnh nhân. Theo một phương án, liều dùng với một mắt bằng ít nhất khoảng 0,5mg đến khoảng 6mg. Các liều dùng với một mắt được ưu tiên bao gồm khoảng 0,5mg, 0,6mg, 0,7mg, 0,8mg, 0,9mg, 1,0mg, 1,2mg, 1,4mg, 1,6mg, 1,8mg, 2,0mg, 2,5mg, 3,0mg, 3,5mg, 4,0mg, 4,5mg, 5,0mg, 5,5mg, và 6,0mg. Các liều lượng có thể được sử dụng ở các thể tích khác nhau thích hợp để sử dụng cho mắt, như là 50 μ l hoặc 100 μ l, ví dụ, gồm 3mg/50 μ l hoặc 6mg/50 μ l. Các thể tích nhỏ hơn cũng có thể được sử dụng, bao gồm 10 μ l hoặc nhỏ hơn, ví dụ, khoảng 10 μ l hoặc khoảng 8,0 μ l. Theo các phương án nhất định, liều dùng 1,2mg/10 μ l hoặc 1mg/8,0 μ l (ví dụ, 1mg/8,3 μ l) được chuyển đến một mắt của bệnh nhân để điều trị hoặc để cải thiện một hoặc nhiều rối loạn hoặc bệnh trong số các rối loạn hoặc bệnh đã được mô tả. Việc phân phối có thể là, ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền trong dịch kính.

Sáng chế cũng đề xuất các dược phẩm (tức là, dược phẩm chứa nước) theo sáng chế để dùng làm thuốc, ví dụ, để sử dụng trong phân phối kháng thể đến với bệnh nhân, hoặc để sử dụng trong điều trị hoặc cải thiện một hoặc nhiều bệnh hoặc rối loạn trong số các bệnh hoặc rối loạn đã được mô tả.

Dược mô tả ở đây là phương pháp phân phối kháng thể kháng VEGF đến với bệnh nhân, bao gồm bước cho bệnh nhân dùng dược phẩm có chứa nước theo sáng chế.

Dược mô tả ở đây là phương pháp phân phối kháng thể kháng VEGF theo sáng chế đến với bệnh nhân bao gồm các bước: (i) hoàn nguyên dạng đông khô theo sáng chế để tạo thành dược phẩm chứa nước, và (ii) cho bệnh nhân sử dụng dược phẩm có chứa nước này. Bước (ii) lý tưởng là diễn ra trong vòng 24 giờ sau bước (i) (ví dụ, trong vòng 12 giờ, trong vòng 6 giờ, trong vòng 3 giờ, hoặc trong vòng 1 giờ).

Các phương án nhất định theo sáng chế được mô tả được đánh số như sau:

1. Dược phẩm chứa nước, chứa (i) kháng thể kháng VEGF chứa CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng có trình lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 5, 6, và 7, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ có trình lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 8, 9, và 10 ở nồng độ ít nhất là 50mg/ml, (ii) sucroza hoặc trehaloza, (iii)

xitrat hoặc histidin làm chất đệm, và (iv) polysorbat 80 làm chất hoạt động bề mặt.

2. Dược phẩm có chứa nước theo phương án 1, chứa sucroza ở nồng độ 4,5% đến 11% (khối lượng/ thể tích) hoặc trehaloza ở nồng độ 5% đến 10%, axit xitric ở nồng độ 0,006% đến 0,012% (khối lượng/ thể tích), trinati xitrat dihydrat ở nồng độ 0,2% đến 0,6% (khối lượng/ thể tích), và polysorbat 80 ở nồng độ 0,01% đến 0,1% (khối lượng/ thể tích), trong đó độ pH của dược phẩm là khoảng 6,3 đến khoảng 7,3.
3. Dược phẩm có chứa nước theo phương án 2, trong đó nồng độ của sucroza là 6,75% (khối lượng/ thể tích), nồng độ của axit xitric là khoảng 0,01% (khối lượng/ thể tích), nồng độ của trinati xitrat dihydrat là khoảng 0,428% (khối lượng/ thể tích), nồng độ của polysorbat 80 là khoảng 0,05% (khối lượng/ thể tích), và độ pH là khoảng 6,8.
4. Dược phẩm có chứa nước theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-3, trong đó nồng độ của kháng thể kháng VEGF bằng ít nhất 60mg/ml, ít nhất 70mg/ml, ít nhất 80mg/ml, ít nhất 90mg/ml, ít nhất 100mg/ml, ít nhất 110mg/ml, ít nhất 120mg/ml, ít nhất 130mg/ml, ít nhất 140mg/ml, hoặc ít nhất 150mg/ml.
5. Dược phẩm có chứa nước theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-4, trong đó nồng độ của kháng thể kháng VEGF là khoảng 60mg/ml, khoảng 70mg/ml, khoảng 80mg/ml, khoảng 90mg/ml, khoảng 100mg/ml, khoảng 110mg/ml, khoảng 120mg/ml, khoảng 130mg/ml, khoảng 140mg/ml, hoặc khoảng 150mg/ml.
6. Dược phẩm có chứa nước theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-5, trong đó kháng thể kháng VEGF chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2.
7. Dược phẩm có chứa nước theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-6, trong đó kháng thể kháng VEGF chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3.

8. Dược phẩm có chứa nước theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-7, trong đó nồng độ của kháng thể kháng VEGF là khoảng 60mg/ml hoặc khoảng 120mg/ml.
9. Dụng cụ phân phối chứa dược phẩm có chứa nước theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-8.
10. Dụng cụ phân phối theo phương án 9, trong đó dụng cụ phân phối này là ống tiêm được nạp trước.
11. Chế phẩm đông khô được bào chế bằng cách đông khô dược phẩm có chứa nước theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-8.
12. Phương pháp bào chế dạng đông khô, bao gồm các bước: (i) chuẩn bị dung dịch chứa nước chứa kháng thể kháng VEGF, sucroza hoặc trehaloza, đệm xitrat hoặc histidin, và chất hoạt động bề mặt; và (ii) đông khô dung dịch chứa nước này.
13. Phương pháp theo phương án 12, trong đó kháng thể kháng VEGF gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng tương ứng là có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, 6, và 7, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ tương ứng là có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 8, 9, và 10.
14. Phương pháp theo phương án 13, trong đó kháng thể kháng VEGF gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2.
15. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 12-13, trong đó kháng thể kháng VEGF gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3.
16. Dược phẩm có chứa nước theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-8 để sử dụng trong phân phối kháng thể kháng VEGF đến với đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng dược phẩm chứa nước.

17. Dược phẩm có chứa nước theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-8 để sử dụng trong điều trị rối loạn hoặc bệnh về mắt do VEGF làm trung gian, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng dược phẩm có chứa nước

18. Dược phẩm có chứa nước để sử dụng theo phương án 17, trong đó bệnh hoặc rối loạn về mắt đã nêu là bệnh về mắt do phát triển mạch mới.

Khi được sử dụng ở đây, tất cả các số phần trăm là các phần trăm theo khối lượng, trừ phi điều ngược lại được đề cập.

Khi được sử dụng ở đây và trừ phi điều ngược lại được chỉ ra, các thuật ngữ "một" và "này" được dùng với nghĩa là "một", "ít nhất một" hoặc "một hoặc nhiều". Trừ phi điều ngược lại được yêu cầu bởi ngữ cảnh, các thuật ngữ chỉ số ít được sử dụng ở đây sẽ bao gồm số nhiều và các thuật ngữ số nhiều sẽ bao gồm số ít.

Nội dung của patent, đơn sáng chế, và các tài liệu tham khảo bất kỳ được trích dẫn trong toàn bộ phần mô tả này được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo toàn bộ nội dung của chúng.

Các phương án khác theo sáng chế sẽ là điều hiển nhiên với người có hiểu biết trong lĩnh vực này khi xem xét phần mô tả và thực hành sáng chế được bộc lộ ở đây, Được chủ định rằng phần mô tả và phần ví dụ thực hiện sáng chế chỉ được coi là ví dụ đại diện với phạm vi và tinh thần đúng theo sáng chế sẽ được chỉ ra bằng phần các yêu cầu bảo hộ dưới đây và các đương lượng của chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau mô tả các nỗ lực phát triển dược phẩm được thiết kế để xác định các phương án thực hiện ổn định hóa thích hợp và các dược phẩm để cung cấp các dung dịch có nồng độ cao, ổn định chứa kháng thể 1008, cho phép chế phẩm IVT với thời

hạn sử dụng ít nhất là 18 tháng ở các điều kiện bảo quản lạnh đáp ứng các yêu cầu thông thường với các sản phẩm dùng cho mắt.

Kháng thể 1008 là kháng thể chuỗi đơn gắn với và ức chế hoạt tính sinh học của yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch máu A (VEGF-A) của người. Trình tự axit amin của 1008 được biểu hiện là:

```
MEIVMTQSPS    TLSASVGDRV    IITCQASEII    HSWLAWYQQK
PGKAPKLLIY LASTLASGVP SRFSGSGSGA EFTLTISLQ PDDFATYYCQ
NVYLASTNGA    NFGQGTKLTV    LGGGGGSGGG    GSGGGGSGGG
GSEVQLVESG    GGLVQPGGSL    RLSCTASGFS    LTDYYYMTWV
RQAPGKGLEW    VGFIDPDDDP    YYATWAKGRF    TISRDNSKNT
LYLQMNSLRA EDTAVYYCAG GDHNSGWGLD IWGQGTLVTV SS (SEQ
ID NO: 4)
```

Các lượng đáng kể của các tiểu phân nhìn được bằng kính hiển vi được quan sát thấy ở nồng độ kháng thể 1008 là 60mg/ml khi 1008 được bào chế ở dạng dung dịch đẳng trương trong dung dịch đệm xitrat 15mM với polysorbat 20 0,001% ở độ pH 6,25. Vấn đề chính của sản phẩm bào chế ban đầu này là vật tiểu phân vượt quá các giới hạn thông thường của dung dịch dùng để tiêm mắt (USP<789>), thậm chí khi được giữ ở -20°C.

Các ví dụ sau tóm tắt sự phát triển sản phẩm bào chế chứa 1008 ở nồng độ 60mg/ml và 120mg/ml trong dịch kính (IVT) ổn định ở điều kiện bảo quản 2-8°C trong ít nhất 18 tháng. Nỗ lực phát triển sản phẩm bào chế tập trung vào việc ức chế tạo thành các tiểu phân nhìn được bằng kính hiển vi và đáp ứng yêu cầu USP về hàm lượng, độ tinh sạch và hiệu lực.

Các phương pháp phân tích

Các phương pháp sau được sử dụng trong toàn bộ các ví dụ được đề cập.

Phương pháp hình ảnh hóa vi dòng (MFI: Micro-Flow Imaging)

Phương pháp MFI được sử dụng để phân tích sàng lọc tá dược, Nghiên cứu 1 và Nghiên cứu 2 cho các nghiên cứu tối ưu hóa 60mg/ml như sau:

Tổng thể tích mẫu được sử dụng: 0,50mL

Thể tích lọc: 0,20ml

Thể tích phân tích: 0,26ml

Bước tối ưu độ rọi được tiến hành với nước không chứa các tiểu phân được lọc được tinh sạch.

Phương pháp MFI được sử dụng để phân tích Nghiên cứu 3 và Nghiên cứu 4 1008 nồng độ 120mg/ml:

Tổng thể tích mẫu được sử dụng: 0,80ml

Thể tích lọc: 0,23ml

Thể tích phân tích: 0,48ml

Bước tối ưu độ rọi được tiến hành với nước không chứa các tiểu phân được lọc được tinh sạch.

Phương pháp SEC

Sắc ký loại trừ kích thước (SE-HPLC: Size exclusion chromatography) phân tách các protein theo kích thước của chúng. Đạt được sự phân tách bằng sự loại trừ, hoặc bao gồm chênh lệch, của các phân tử mẫu khi chúng đi qua pha tĩnh có lỗ dạng tiểu phân. Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao có khả năng duy trì tốc độ chảy là 0,25ml/phút và nhiệt độ của mẫu là 4°C, được trang bị cột TOSOH SuperSW3000 (Tosoh Bioscience LLC, King of Prussia, PA), và máy phát hiện có khả năng vận hành đồng thời ở 214nm và 280nm. Phương pháp này được sử dụng để kiểm tra độ tinh sạch.

Phương pháp IEX-HPLC

Sắc ký lỏng hiệu năng cao trao đổi anion (AIEX-HPLC: Anion exchange high performance liquid chromatography) phân tách các protein theo điện tích lưới của chúng. Quy trình này được tiến hành bằng cách sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), cho phép duy trì tốc độ dòng là 0,8ml/phút, với bộ phận cột được kiểm soát nhiệt độ (cài đặt ở 25°C) bao gồm cột trao đổi anion mạnh, máy lấy mẫu tự động (cài đặt ở 4°C), và máy phát hiện UV bước sóng biến thiên, cho phép hoạt động ở 280nm.

Phương pháp CGE

Phương pháp điện di mao quản được thực hiện để xác định độ đồng nhất và độ tinh sạch của các protein có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10kDa đến 225kDa bằng điện di mao quản gen SDS. Mao quản được nạp động với đệm gel SDS 0,2% Beckman Coulter, độ pH= 8, chế phẩm độc quyền. Sự phân tách protein được tiến hành bằng điện di rây phân tử. Logarit của khối lượng phân tử protein là tuyến tính với độ di động điện di thuận nghịch của nó. Danh tính của protein được xác định bằng cách so sánh sự di chuyển của nó với khối lượng phân tử chuẩn. Độ tinh sạch được xác định bằng cách phân tích phần trăm diện tích của đỉnh gốc và các tạp chất. Máy phát hiện mảng diot quang (PDA) được sử dụng để phân tích mẫu ở 220nm.

Phân tích hiệu lực thuốc

ELISA cạnh tranh được sử dụng để kiểm tra hiệu lực thuốc. ELISA cạnh tranh, khả năng của 1008 để cạnh tranh với VEGFR2/Fc đối với VEGF được biotinyl hóa đã được đo. Tín hiệu quan sát được tỷ lệ nghịch với nồng độ của 1008, khi tăng lượng 1008 đã chặn hiệu quả sự gắn kết của VEGF biotinylat hóa với thụ thể VEGFR2/Fc của nó. Mỗi mẫu được phân tích trong đĩa vi chuẩn 96 giếng so với chất chuẩn tham chiếu 1008, và hiệu lực thuốc tương đối của mẫu là that của chất chuẩn tham chiếu được báo cáo.

Ví dụ 1

Sàng lọc tá dược

1008 được bào chế trong đệm xitrat ở độ pH=6,25. Thành phần của chế phẩm được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1

Thành phần	Nồng độ (% khối lượng/thể tích)
1008	6%
Trinatri Xitrat (Dihydrat)	0,59%

Natri Clorua	0,73%
Polysorbat 20	0,001%
Axit clohydric	pH 6,25
Nước để pha tiêm	Qs 100

Các số lượng đáng kể của các tiểu phân thấy được bằng kính hiển vi được quan sát thấy trong chế phẩm nêu trên. Tiểu phân này vượt quá các giới hạn quy định đối với dung dịch dùng để tiêm cho mắt USP<789> kể cả trong nhiệt độ bảo quản ở -20°C.

Tác động của các tá dược khác nhau lên sự tạo thành các tiểu phân thấy được bằng kính hiển vi đã được đánh giá để phát triển dung dịch chứa 1008 ổn định hơn. Lưu giữ dung dịch protein ở nồng độ 60mg/ml chứa các tá dược khác nhau được lưu giữ ở 40°C và được phân tích các tiểu phân chất ở kích thước 1-100µm bằng MFI. Dữ liệu thử nghiệm đã chứng minh rằng hầu hết các tá dược được kiểm tra, bao gồm arginin, dextran, axit ascorbic, methionin, và amoni axetat, không giảm sự hình thành các tiểu phân này. Chỉ khi có mặt các đường không khử, như là sucroza và trehaloza, sự hình thành các tiểu phân đã giảm đáng kể.

Tiến hành sàng lọc tá dược ở mức độ cao hơn. Đánh giá tác động của tá dược lên độ ổn định của 1008 trong dung dịch chứa 1008 ở ~60mg/ml. Lưu giữ dung dịch protein chứa albumin huyết thanh của người (HSA) 0,1%, poloxame 407 0,1%, Brij 35 0,1%, glycerin 3%, glyxin 50mM ở 40°C, và thử nghiệm các mẫu bằng MFI, SEC và IEX sau 8, 21, và 28 ngày lưu giữ. Các kết quả được trình bày trong bảng 2. Dữ liệu thử nghiệm đã chứng minh độ bất ổn định của protein khi có mặt các tá dược được kiểm tra.

Bảng 2

Kết quả sàng lọc tá dược

Tá dược	HSA 0,1%	Poloxame 407 0,1%	Brij 35 0,1%	Glycerin 3%	Glyxin 50mM
Thời gian (ngày)	8				
≥ 10µm theo MFI	19	8	18	329	47
≥ 25µm theo MFI	5	5	6	43	8
≥ 50µm theo MFI	1	0	1	3	0
Tổng số theo MFI	538	381	378	24805	2436
SEC (% ban đầu)	96,2	95,5	81,8	96,3	95,8
IEX (% ban đầu)	95,1	94,3	82,7	95,0	95,6

Thời gian (ngày)	21				
≥ 10um theo MFI	30	5	12	95	36
≥ 25um theo MFI	7	0	5	14	10
≥ 50um theo MFI	1	0	0	2	1
Tổng số theo MFI	495	197	1091	5622	1037
SEC (% ban đầu)	88,2	87,7	63,2	89,4	89,4
IEX (% ban đầu)	87,8	86,1	63,2	87,9	87,1
Thời gian (ngày)	28				
≥ 10um theo MFI	69	382	595	365	466
≥ 25um theo MFI	21	39	68	65	72
≥ 50um theo MFI	5	4	6	9	15
Tổng số theo MFI	505	7718	2208	10690	52375
SEC (% ban đầu)	85,7	84,7	65,3	86,1	84,5
IEX (% ban đầu)	82,7	80,9	60,0	83,4	82,3

Đánh giá độ ổn định của 1008 ở nồng độ 57mg/ml trong đệm phosphat 20mM ở pH=6,25. Thử nghiệm chế phẩm chứa sucroza 9% và PS80 0,1% ở 6, 14 và 27 ngày sau khi bảo quản ở 40°C. Các kết quả được liệt kê trong bảng 3.

Bảng 3

Độ ổn định của 1008 ở nồng độ 57mg/ml trong đệm phosphat 20mM

Thời gian ở 40°C (ngày)	6	14	27
≥ 10um theo MFI (#/mL)	43	42	11
≥ 25um theo MFI (#/mL)	3	13	3
≥ 50um theo MFI (#/mL)	1	4	0
Tổng số theo MFI (#/mL)	1418	1650	425
SEC (% ban đầu)	97,3	91,9	82,1
IEX (% ban đầu)	98,3	92,2	79,2

Ví dụ 2

Phát triển chế phẩm mới

Nghiên cứu 1

Sàng lọc tá dược

Sử dụng dung dịch protein chứa 1008 ở nồng độ 60mg/ml trong đệm xitrat 20mM chứa polysorbat 20 0,001% và NaCl 0,73% ở pH 6,25 để chuẩn bị mẫu. Để loại bỏ chất hoạt động bề mặt trong dung dịch protein gốc, trao đổi đệm sử dụng cột NAP-25 trước tiên được thực hiện sử dụng tá dược không chứa polysorbat 20. Sau đó, cô đặc dung dịch protein đã trao đổi đệm đến khoảng 60mg/ml sử dụng dụng cụ lọc Vivaspin với MWCO 10kDa. Thêm riêng các tá dược HSA, glyxin, glyxerin, poloxame 407, và Brij 35. Sau đó, lọc qua ống bơm tiêm qua màng PVDF 0,2um vào ống thủy tinh trong thể tích 4ml. Sử dụng khoảng 100µL mẫu cho thử nghiệm ban đầu, trong khi lưu giữ phần còn lại của mẫu ở 40°C. Lấy ra một mililit mẫu của mỗi dược phẩm bào chế ở thời điểm 8, 21, và 28 ngày sau khi bảo quản ở 40°C để phân tích bằng MFI, SEC và IEX.

Chọn lọc thành phần đệm, đường và chất hoạt động bề mặt

Dựa trên các nghiên cứu sàng lọc tá dược đã được thực hiện nội bộ, hai dung dịch đệm (xitrat và histidin), các đường (sucroza và trehaloza), và các chất hoạt động bề mặt (Polysorbat 20 và Polysorbat 80) được chọn cho việc chọn lọc thành phần của dược phẩm bào chế. Nồng độ của dung dịch đệm là 20mM, nồng độ đường là 264mM, và nồng độ chất hoạt động bề mặt là 0,1% được chọn cho nghiên cứu này. Nghiên cứu thử nghiệm yếu tố đầy đủ được thiết kế như được trình bày trong bảng sau.

Bảng 4

Các yếu tố và thiết kế cho nghiên cứu 1

Nhân tố	Thiết kế
Đệm	Xitrat 20mM hoặc Histidin 20mM
Đường	Sucroza 264mM (9%) hoặc Trehaloza 264mM (9%)
Chất hoạt động bề mặt	Polysorbat 20 0,1% hoặc Polysorbat 80 0,1%

Thiết kế đầy đủ được trình bày trong bảng 5 dưới đây:

Bảng 5

Ba yếu tố của thiết kế yếu tố đầy đủ cho Nghiên cứu 1

STT	Đệm (mM)	Đường	Chất hoạt động bề mặt
1	Xitrat 20mM	Trehaloza 264mM	PS 20 0,1%
2	Xitrat 20mM	Trehaloza 264mM	PS 80 0,1%
3	Xitrat 20mM	Sucroza 264mM	PS 20 0,1%
4	Xitrat 20mM	Sucroza 264mM	PS 80 0,1%
5	Histidin 20mM	Trehaloza 264mM	PS 20 0,1%
6	Histidin 20mM	Trehaloza 264mM	PS 80 0,1%
7	Histidin 20mM	Sucroza 264mM	PS 20 0,1%
8	Histidin 20mM	Sucroza 264mM	PS 80 0,1%

Các tham số khác:

Nồng độ/pH	1008 50 - 60mg/ml ở độ pH=6,25
Trao đổi đệm	cột NAP25, cô đặc bằng Vivaspin MWCO 10kDa
Cỡ mẫu/Pkg	2-2,5ml trong ống thủy tinh thể tích 4ml với nắp xoáy
Bảo quản/Lấy mẫu	40°C/0, 1, 2 và 4 tuần
Các thử nghiệm	MFI, SEC và IEX

Sử dụng dung dịch protein của 1008 ở nồng độ 60mg/ml trong dung dịch đệm gốc chứa polysorbat 20 0,001% để chuẩn bị mẫu. Chuẩn bị bốn dung dịch đệm chất dẫn thuốc mới với các tổ hợp khác nhau của dung dịch đệm/đường (Xitrat 20mM/Trehaloza 264mM, Xitrat 20mM/Sucroza 264mM, Histidin 20mM/Trehaloza 264mM, Histidin 20mM/Sucroza 264mM). Đầu tiên, được chất 1008 (DS: drug substance) được trao đổi vào trong các dung dịch đệm chất dẫn thuốc sử dụng cột Illustra NAP-25 (GE Healthcare). Cân bằng cột bằng 25ml đệm xitrat. Sau đó, nạp 2ml DS 1008 lên trên cột. Sau khi dung dịch DS đã di chuyển toàn bộ vào trong cột, rửa cột bằng 2ml đệm giống như đệm được sử dụng để cân bằng cột. Thu được 6ml dung dịch được rửa giải từ cột trong thiết bị cô đặc Vivaspin 6 (MWCO 10KD, GE Healthcare). Sau đó, cô đặc 6ml

dung dịch được rửa giải đến khoảng 2ml sử dụng Beckman GS-15R ly tâm ở 9384×g và 4°C. Sau đó, đo nồng độ của protein bằng máy đo quang phổ NanoDrop 1000 sử dụng OD280. Đưa Polysorbat 20 (PS20) hoặc Polysorbat 80 (PS80) vào được phẩm bào chế đến nồng độ cuối là 0,1%. Sau đó, lọc các chế phẩm được chuẩn bị qua dụng cụ lọc ống bơm tiêm PVDF 0,2µm và lọc vào ống thủy tinh thể tích 4ml. Sử dụng khoảng 100µL mẫu cho thử nghiệm ban đầu, trong khi lưu giữ phần còn lại của các mẫu này ở 40°C. Lấy một mililit mẫu sau khi bảo quản 1, 2 và 4 tuần ở 40°C để phân tích bằng MFI, SEC và IEX.

Tiến hành nghiên cứu định tính để chọn lọc các thành phần đường/chất hoạt động bề mặt/đệm tối ưu cho chế phẩm. Sử dụng hai dung dịch đệm (xitrat và histidin), hai đường (sucroza và trehaloza), hai chất hoạt động bề mặt (Polysorbat 20 and Polysorbat 80) trong thiết kế như được bàn luận trên đây. Tiến hành nghiên cứu về tính ổn định trong bốn tuần trong các điều kiện được gia tốc (40°C). Thử nghiệm các mẫu về tính ổn định bằng SEC, IEX và MFI. Bảng 6 trình bày các kết quả về tính ổn định bằng SEC, IEX và điểm nóng chảy (T_m) bằng µDSC.

Bảng 6

Phân tích định tính các yếu tố đối với 1008 ở nồng độ 60mg/ml ở 40°C

STT	1 tuần /40°C (SEC)*	2-tuần /40°C (SEC)	4-tuần /40°C (SEC)	1 tuần /40°C (IEX)*	2-tuần /40°C (IEX)	4-tuần /40°C (IEX)	T_m (°C) theo µDSC
1	2,9	10,7	26,6	5,0	13,7	20,2	71,53
2	2,4	7,8	18,3	4,2	10,5	13,6	71,97
3	2,9	11,1	27,1	4,9	13,2	17,5	71,41
4	2,3	7,5	20,9	4,1	10,6	11,7	71,97
5	3,2	11,7	26,8	5,6	14,7	23,4	71,66
6	2,7	8,1	19,1	5,1	12,1	19,9	72,28
7	3,5	13,2	31,4	6,1	16,4	25,2	71,53
8	2,8	8,6	21,2	5,4	13,1	15,1	72,15

* % mất sử dụng diện tích đỉnh tương đối

Phân tích các kết quả về tính ổn định sử dụng Minitab (Minitab Inc., State College PA). Do SEC và IEX cho thấy xu hướng giống nhau, chỉ dữ liệu SEC được phân tích và báo cáo bởi Minitab. Các kết quả SEC đã chứng minh chất hoạt động bề mặt là yếu tố đáng kể duy nhất; các yếu tố khác dường như là tác động mạnh đến đáp

ứng bao gồm chọn lọc đệm và tương tác giữa chất đệm và đường (với mức độ nhỏ hơn). Dữ liệu SEC gợi ý rằng thành phần chế phẩm tối ưu là xitrat làm thành phần chất đệm, polysorbat 80 làm thành phần chất hoạt động bề mặt và sucroza làm thành phần đường.

Các kết quả thí nghiệm về các tiêu phân bằng MFI cũng được phân tích bằng Minitab. Tất cả ba yếu tố này được đánh giá (đường, chất hoạt động bề mặt, và chất đệm) dường như là đáng kể ($\alpha=0,05$). So sánh các tác động chính lên các tiêu phân, xitrat tốt hơn histidin; PS80 tốt hơn PS20; Sucroza tương tự hoặc hơi tốt hơn so với trehaloza. Do đó, xitrat làm thành phần chất đệm, polysorbat 80 làm thành phần chất hoạt động bề mặt và sucroza làm thành phần đường được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Nghiên cứu 2

Tối ưu hóa nồng độ đối với chất đệm, đường và chất hoạt động bề mặt

Tiến hành nghiên cứu yếu tố đầy đủ chứa ba yếu tố ở hai mức độ với hai điểm trung tâm trong các đệm tương ứng là xitrat và histidin, để xác định nồng độ tối ưu đối với mỗi thành phần chế phẩm được chọn. Ba yếu tố này là chất đệm (xitrat hoặc histidin), polysorbat 80 và sucroza. Các yếu tố và khoảng cách thiết kế được lập bảng trong bảng 7 và các thiết kế thí nghiệm chi tiết được trình bày trong bảng 8 và bảng 9.

Bảng 7

Các yếu tố và thiết kế cho nghiên cứu 2

Nhân tố	Thiết kế	
Đệm xitrat	10 - 20mM	NA
Đệm histidin	NA	10 -20mM
Polysorbat 80	0,001 - 0,1%	0,001 - 0,1%
Sucroza	4,5 - 9%	4,5 - 9%

Bảng 8

Thiết kế yếu tố và đầy đủ trong đệm xitrat

Thứ tự chạy	Đệm (mM)	Sucroza (%)	Polysorbat 80 (%)
C1	10	4,5	0,001
C2	20	4,5	0,001

C3	10	9	0,001
C4	20	9	0,001
C5	10	4,5	0,1
C6	20	4,5	0,1
C7	10	9	0,1
C8	20	9	0,1
C9	15	6,75	0,0505
C10	15	6,75	0,0505

Bảng 9

Thiết kế yếu tố đầy đủ trong đệm histidin

(3 yếu tố ở 2 mức độ với 2 điểm trung tâm)

Thứ tự chạy	Đệm (mM)	Sucroza (%)	Polysorbat 80 (%)
H1	10	4,5	0,001
H2	20	4,5	0,001
H3	10	9	0,001
H4	20	9	0,001
H5	10	4,5	0,1
H6	20	4,5	0,1
H7	10	9	0,1
H8	20	9	0,1
H9	15	6,75	0,0505
H10	15	6,75	0,0505

Để chuẩn bị từng chế phẩm riêng, sử dụng dung dịch protein của 1008 ở nồng độ 60mg/ml trong đệm xitrat chứa polysorbat 20 0,001%/NaCl 0,73% ở độ pH=6,25. Dung dịch protein này trước hết được trao đổi đệm với chất dẫn thuốc sử dụng cột NAP-25. Chất dẫn thuốc này chứa đệm và sucroza ở các nồng độ đích của chúng. Cô đặc dung dịch protein được trao đổi này đến nồng độ khoảng 60mg/ml sử dụng Vivaspin MWCO 10kDa.

Sau đó, thêm các lượng theo mẻ của polysorbat 80 và natri clorua để tạo ra các chế phẩm bào chế cuối cùng. Xác định nồng độ protein trong mỗi mẫu bằng hệ số triệt tiêu lý thuyết sử dụng chất hấp phụ được đo bằng UV ở 280nm.

Sau đó, lọc các chế phẩm được chuẩn bị qua dụng cụ lọc ống tiêm PVDF 0,2µm vào ống thủy tinh trong và sạch thể tích 4ml. Sử dụng khoảng 100µL mẫu với thử

thực hiện ban đầu bằng SEC và IEX, trong khi lưu giữ khoảng 2-2,5ml ở 40°C. Lấy khoảng 600µL sau khi bảo quản trong 11, 20, và 27 ngày ở 40°C để phân tích bằng MFI, SEC và IEX.

Dựa trên kết quả của nghiên cứu 1, tiến hành nghiên cứu yếu tố đầy đủ gồm ba yếu tố ở hai mức độ với hai điểm trọng tâm trong tương ứng là đệm xitrat và đệm histidin, để xác định nồng độ tối ưu với mỗi thành phần chế phẩm được chọn. Lưu giữ các mẫu được kiểm tra ở 40°C, và lấy mẫu ở 0, 1,6, 2,9 và 4 tuần để phân tích MFI, SEC và IEX. Các kết quả được lập thành bảng trong bảng 10 và bảng 11.

Bảng 10

Kết quả về tính ổn định với dung dịch có đệm xitrat

Thời gian (tuần)	0	1,6	2,9	4	0	1,6	2,9	4
Điều kiện	Xitrat 10mM/Sucroza 4,5% /PS80 0,001%				Xitrat 20mM/ Sucroza 4,5% /PS80 0,001%			
1008 (mg/ml)	59,1				58,7			
Tiêu phân $\geq$ 10µm #/mL theo MFI	-	61,1	91,7	36518	-	27	203	51209
Tiêu phân $\geq$ 25µm #/mL theo MFI	-	7,64	15,29	6508	-	4	27	5071
Tiêu phân $\geq$ 50µm #/mL theo MFI	-	0	0	325	-	0	4	61
Tổng số tiêu phân #/mL theo MFI	-	2881	7165	82439	-	627	26078	577345
SEC (% Ban	99,2	93,4	89,6	85,8	99,3	93,8	90,1	86,4

đầu)								
IEX (% Ban đầu)	97,7	91,4	85,3	81,4	96,8	92,7	87,2	83,3
Điều kiện	Xitrat 10mM/Sucroza 9%/PS80 0,001%				Xitrat 20mM/Sucroza 9%/PS80 0,001%			
1008 (mg/ml)	54,2				53,3			
Tiêu phân $\geq 10\mu\text{m}$ #/mL theo MFI	-	38	57	84	-	19	42	126
Tiêu phân $\geq 25\mu\text{m}$ #/mL theo MFI	-	4	0	8	-	8	0	11
Tiêu phân $\geq 50\mu\text{m}$ #/mL theo MFI	-	0	0	0	-	0	0	0
Tổng số tiêu phân #/mL theo MFI	-	791	1838	6993	-	841	1594	8472
SEC (% Ban đầu)	99,2	93,5	89,7	86,2	99,5	93,4	89,9	86,5
IEX (% Ban đầu)	97,5	91,1	85,3	81,4	97,4	91,8	86,3	82,6
Điều kiện	Xitrat 10mM/Sucroza 4,5%/PS80 0,1%				Xitrat 20mM/Sucroza 4,5%/PS80 0,1%			
1008 (mg/ml)	58,7				58,7			
Tiêu phân $\geq 10\mu\text{m}$ #/mL theo MFI	-	76	27	31	-	34	149	187
Tiêu phân $\geq 25\mu\text{m}$ #/mL	-	0	4	8	-	11	31	31

theo MFI								
Tiêu phân $\geq$ 50 μ m #/mL theo MFI	-	0	0	0	-	4	0	0
Tổng số tiêu phân #/mL theo MFI	-	1104	803	23839	-	860	1494	31451
SEC (% Ban đầu)	99,2	92,4	87,5	82,3	99,5	92,3	87,4	82,5
IEX (% Ban đầu)	97,5	90,2	83,1	78,0	97,5	90,6	84,0	78,8
Điều kiện	Xitrat 10mM/Sucroza 9%/PS80 0,1%				Xitrat 20mM/Sucroza 9%/PS80 0,1%			
1008 (mg/ml)	54,7				52,5			
Tiêu phân $\geq$ 10 μ m #/mL theo MFI	-	103	187	164	-	88	65	99
Tiêu phân $\geq$ 25 μ m #/mL theo MFI	-	23	42	27	-	23	11	19
Tiêu phân $\geq$ 50 μ m #/mL theo MFI	-	0	4	2	-	0	4	0
Tổng số tiêu phân #/mL theo MFI	-	2538	3642	4055	-	1062	1613	2117
SEC (% Ban đầu)	98,9	93,2	88,5	84,0	99,4	92,8	88,3	84,0
IEX (% Ban đầu)	97,2	90,9	83,8	79,1	97,1	91,3	84,3	79,7

Điều kiện	Xitrat 15mM/Sucroza 6,75%/PS80 0,0505%				Xitrat 15mM/Sucroza 6,75%/PS80 0,0505%			
1008 (mg/ml)	50,8				51,3			
Tiêu phân $\geq$ 10 μ m #/mL theo MFI		42	54	42		31	15	
Tiêu phân $\geq$ 25 μ m #/mL theo MFI		8	8	0		4	4	
Tiêu phân $\geq$ 50 μ m #/mL theo MFI		0	4	0		0	0	
Tổng số tiêu phân #/mL theo MFI		439	1368	1536		1162	1727	
SEC (% Ban đầu)	99,1	93,6	88,8	84,7	99,4	92,9	88,3	84,1
IEX (% Ban đầu)	97,0	91,5	85,0	80,6	97,0	91,4	84,7	80,0

Bảng 11

Kết quả về độ bền với dung dịch có đệm là Histidin

Thời gian (tuần)	0	1,6	2,9	4	0	1,6	2,9	4
Điều kiện	Histidin 10mM/Sucroza 4,5%/PS80 0,001%				Histidin 20mM/Sucroza 4,5%/PS80 0,001%			
1008 (mg/ml)	48,8				50,6			
Tiêu phân $\geq$ 10 μ m #/mL theo MFI	-	26,75	152,86	596		30,57	95,54	4265
Tiêu phân $\geq$ 25 μ m #/mL theo MFI	-	15,29	11,46	76,43		0	7,64	172

Tiêu phân $\geq$ 50 μ m #/mL theo MFI	-	0	0	7,64		0	0	3,82
Tổng số tiêu phân #/mL theo MFI	-	634	2927	42083		592	14204	246370
SEC (% Ban đầu)	99,6	93,4	89,5	85,9	99,6	93,3	89,6	86,4
IEX (% Ban đầu)	96,7	91,9	86,2	82,5	96,9	91,9	86,2	82,4
Điều kiện	Histidin 10mM/ Sucroza 9%/PS80 0,001%				Histidin 20mM/Sucroza 9%/PS80 0,001%			
1008 (mg/ml)	54,8				55,6			
Tiêu phân $\geq$ 10 μ m #/mL theo MFI		19,11	64,97	202,54		15,29	103,18	149,04
Tiêu phân $\geq$ 25 μ m #/mL theo MFI		7,64	7,64	26,75		0	15,29	15,29
Tiêu phân $\geq$ 50 μ m #/mL theo MFI		0	0	0		0	11,46	3,82
Tổng số tiêu phân #/mL theo MFI		684	2538	7505		806	3565	8102
SEC (% Ban đầu)	99,7	92,8	88,9	85,5	98,8	93,4	89,5	85,9
IEX (% Ban đầu)	97,0	90,78	84,8	81,1	97,1	90,6	84,4	80,3
Điều kiện	Histidin 10mM/Sucroza 4,5%/PS80 0,1%				Histidin 20mM/Sucroza 4,5%/PS80 0,1%			
1008 (mg/ml)	48,8				49,8			

Tiêu phân $\geq$ 10 μ m #/mL theo MFI	-	68,8	76,4	126		34	42	54
Tiêu phân $\geq$ 25 μ m #/mL theo MFI	-	15,3	3,82	19,1		0	4	8
Tiêu phân $\geq$ 50 μ m #/mL theo MFI	-	7,64	0	0		0	4	0
Tổng số tiêu phân #/mL theo MFI	-	753	2033	2782		1311	1704	1724
SEC (% Ban đầu)	99,7	92,7	87,6	83,9	99,7	92,7	88,0	83,8
IEX (% Ban đầu)	96,9	90,7	84,5	78,7	97,0	91,0	84,4	78,1
Điều kiện	Histidin 10mM/Sucroza 9%/PS80 0,1%				Histidin 20mM/Sucroza 9%/PS80 0,1%			
1008 (mg/ml)	54,1				54,6			
Tiêu phân $\geq$ 10 μ m #/mL theo MFI		22,93	42,04	68,79		64,97	72,61	80,25
Tiêu phân $\geq$ 25 μ m #/mL theo MFI		3,82	3,82	0		0	7,64	3,82
Tiêu phân $\geq$ 50 μ m #/mL theo MFI		0	0	0		0	0	3,82
Tổng số tiêu phân #/mL theo MFI		783	1330	6111		1716	2469	3844
SEC (% Ban đầu)	99,3	92,8	88,2	84,0	99,7	92,7	87,6	83,3

IEX (% Ban đầu)	97,0	90,5	83,4	78,7	96,8	90,9	83,3	78,3
Điều kiện	Histidin 15mM/Sucroza 6,75%/PS80 0,0505%				Histidin 15mM/Sucroza 6,75%/PS80 0,0505%			
1008 (mg/ml)	50,3				49,6			
Tiểu phân $\geq$ 10 μ m #/mL theo MFI		19	46	172		31	80	114
Tiểu phân $\geq$ 25 μ m #/mL theo MFI		0	0	19		7,6	15,3	22,9
Tiểu phân $\geq$ 50 μ m #/mL theo MFI		0	0	0		0	7,6	3,8
Tổng số tiểu phân #/mL theo MFI		1005	1788	4242		760	1823	3053
SEC (% Ban đầu)	99,3	92,9	87,9	84,2	99,6	92,5	87,7	83,9
IEX (% Ban đầu)	97,1	90,9	84,3	79,6	96,9	91,0	84,6	79,8

Phân tích dữ liệu thử nghiệm bằng Minitab. Với các kết quả SEC trong đệm xitrat, chất hoạt động bề mặt là yếu tố chính ảnh hưởng đến kết tủa protein, trong khi sucroza, tương tác giữa sucroza và polysorbat 80, và nồng độ đệm đóng vai trò ít quan trọng hơn. Nồng độ sucroza cao hơn và nồng độ polysorbat 80 thấp hơn hỗ trợ tính ổn định protein. Tính ổn định protein ảnh hưởng nhẹ đến sự kết tủa và nồng độ đệm xitrat cao hơn hơi thúc đẩy tính ổn định protein tốt hơn.

Với các kết quả MFI trong đệm xitrat, các yếu tố sucroza và polysorbat 80 cũng như sự tương tác của sucroza và polysorbat 80 đóng các vai trò đáng kể như nhau trong việc tạo thành các tiểu phân. Nồng độ cao của sucroza và nồng độ cao của polysorbat

80 ức chế đáng kể sự hình thành các tiểu phân, trong khi nồng độ đệm trong khoảng 10-20mM ảnh hưởng nhỏ đến sự hình thành tiểu phân, nồng độ đệm thấp hơn được ưu tiên.

Các kết quả theo phân tích Minitab của các dung dịch đệm histidin cho thấy chất hoạt động bề mặt, polysorbat 80, là yếu tố chính ảnh hưởng đến sự kết tủa protein, trong khi sự tương tác giữa nồng độ đệm và polysorbat 80, cũng như sucroza, đóng vai trò ít quan trọng hơn. Ít polysorbat 80 hơn hỗ trợ tính ổn định protein. Nồng độ đệm và nồng độ sucroza dường như không ảnh hưởng đến sự kết tủa protein.

Với các kết quả MFI trong đệm histidin, polysorbat 80, sucroza, và sự tương tác của sucroza và polysorbat 80 đóng các vai trò quan trọng trong sự hình thành các tiểu phân. Nồng độ sucroza cao và nồng độ polysorbat 80 thấp, và nồng độ đệm thấp được ưu tiên để giảm thiểu sự hình thành tiểu phân.

Tối ưu độ pH

Nghiên cứu các tác động của độ pH lên trạng thái kết tủa của 1008 trong sáu điều kiện độ pH (5,0, 6,0, 6,25, 6,50, 6,75 và 7,0) trong đệm xitrat 15mM chứa NaCl 0,1%, Sucroza 6,75% và PS80 0,05%. Dược chất 1008 trước tiên được trao đổi đệm vào trong các chất dẫn thuốc (không chứa PS80) có độ pH khác nhau sử dụng cột Illustra NAP-10 (GE Healthcare). Cột này trước tiên được cân bằng bằng 15ml đệm xitrat. Sau đó, nạp 1ml DS 1008 lên cột. Sau khi dung dịch DS di chuyển toàn bộ lên cột, rửa cột bằng 2ml đệm xitrat giống như đã sử dụng để cân bằng cột. Thu 2ml dung dịch được rửa giải từ cột này trong máy cô đặc Vivaspin 2 (MWCO 10KD, GE Healthcare). Sau đó, cô đặc 2ml dung dịch được rửa giải đến khoảng 1ml sử dụng Beckman GS-15R ly tâm ở 9384×g và 4°C. Sau đó, đo nồng độ của protein bằng máy đo quang phổ NanoDrop 1000. Nồng độ 1008 cuối cùng với nghiên cứu này được xác định là khoảng 70mg/ml. Thêm PS80 vào chế phẩm đến nồng độ đích cuối cùng là 0,05%. Tiến hành thử nghiệm độ đục động lực học sử dụng máy đo quang phổ PerkinElmer Lambda 35 với máy giữ cuvet hai vị trí và mở nước để tuần hoàn nước. Trong cuvet thạch anh thể tích siêu hiển vi Starna (Starna Scientific Ltd., Anh) với chiều dài đường quang 1cm, thêm 250µL chế phẩm chứa 1008 hoặc chất dẫn thuốc thích hợp. Đặt các cuvet vào trong máy giữ cuvet được gia nhiệt trước đến 55°C. Theo dõi sự thay đổi OD350 trong

chế phẩm chứa 1008 trong 120 phút. Sau đó, lập biểu đồ các dữ liệu OD₃₅₀ thu được với các chế phẩm có độ pH khác nhau so với thời gian để so sánh.

Sử dụng thử nghiệm động lực học dựa trên độ đục này, nghiên cứu các tác động của độ pH lên trạng thái kết tủa của 1008 với các chế phẩm có độ pH từ 5,0 đến 7,0 chứa nồng độ 1008 khoảng 70mg/ml. Với thử nghiệm độ đục, sự tăng mạnh OD₃₅₀ đi kèm với các sự kiện kết tủa lớn của protein này. Do đó, sự khác nhau về thời gian ủ được yêu cầu đối với OD₃₅₀ của mỗi chế phẩm bào chế để tăng khả năng phản ánh tính ổn định vật lý khác nhau của protein trong các chế phẩm này. Như được thể hiện trong Fig. 1, 1008 dường như ổn định nhất ở pH= 6,75 trong các điều kiện chế phẩm bào chế được kiểm tra, do nó có thời gian ủ dài nhất trước sự tăng mạnh của OD₃₅₀. Các thí nghiệm được lập cái có các kết quả tương tự đã xác nhận rằng chế phẩm bào chế được kiểm tra ổn định nhất ở pH=6,75.

Nghiên cứu 3

Tác động của các tá dược và nồng độ hoạt tính cao

Tiến hành nghiên cứu yếu tố bán phần (Bảng 12) để khảo sát các tác động của các điều kiện chế phẩm chính bao gồm nồng độ của protein (60-120mg/ml), sucroza (4,5% - 9,0%), đệm xitrat (10mM đến 20mM) và polysorbat 80 (0,01% - 0,1%).

Bảng 12

Thiết kế nghiên cứu cho nghiên cứu 3

Thứ tự chạy	Điểm trung tâm	Khối	1008 (mg/ml)	Sucroza (%w/w)	Thể tích (mM)	Polysorbat 80 (%)
1	1	1	60	4,5	10	0,01
2	1	1	120	4,5	10	0,1
3	1	1	60	9	10	0,1
4	1	1	120	9	10	0,01
5	1	1	60	4,5	20	0,1
6	1	1	120	4,5	20	0,01
7	1	1	60	9	20	0,01
8	1	1	120	9	20	0,1
9	0	1	90	6,75	15	0,055
10	0	1	90	6,75	15	0,055

Để chuẩn bị các chế phẩm nêu trên, trước tiên, chuẩn bị đệm xitrat 20% ở độ pH= 6,5 và dung dịch gốc của sucroza 30% trong đệm xitrat 20mM ở độ pH= 6,5. Sau đó trộn đệm xitrat, dung dịch gốc sucroza và nước để pha tiêm ở các tỷ lệ chính xác để tạo ra năm dung dịch đệm với PS80, gồm sucroza 4,5% trong xitrat 10mM, sucroza 9% trong xitrat 10mM, sucroza 4,5% trong xitrat 20mM, sucroza 9% trong xitrat 20mM và sucroza 6,75% trong xitrat 15mM. Tiếp sau đó, trao đổi DS 1008 vào trong năm dung dịch đệm này sử dụng cột Illustra NAP-25 (GE Healthcare), sau đó cô đặc bằng máy cô đặc Vivaspin 6 (MWCO 5KD, GE Healthcare) ở 8000 ×g ở 5°C. Xác định các nồng độ protein trong mỗi mẫu bằng máy đo quang phổ NanoDrop 2000 trong quá trình ly tâm. Với các mẫu trong bốn dung dịch đệm đầu tiên, khi nồng độ 1008 đạt đến ~70mg/ml, phần mẫu được loại bỏ khỏi máy cô đặc và được sử dụng để chuẩn bị các chế phẩm bào chế (#1, 3, 5 và 7 trong bảng 12) với API 60mg/ml bằng cách thêm lượng thích hợp của đệm tương ứng và thêm PS80 10%. Tiếp tục cô đặc phần còn lại của mẫu đến nồng độ cao hơn 130mg/ml và sau đó thêm đệm và PS80 10% để thu được các chế phẩm bào chế cuối (#2, 4, 6 và 8 trong bảng 12). Chuẩn bị các chế phẩm bào chế #9 và 10 trong bảng 12 bằng cách cô đặc các mẫu 1008 được trao đổi vào đệm #5 đến nồng độ khoảng 108mg/ml và sau đó trộn với đệm và PS80 10% để đạt được các nồng độ chế phẩm cuối. Đo và điều chỉnh các giá trị độ pH của tất cả các chế phẩm cuối này đến 6,5,

Sử dụng thử nghiệm độ đục được cải biến từ thử nghiệm độ đục nêu trên làm công cụ phân tích để đánh giá. Trong thử nghiệm độ đục cải biến này, sử dụng máy đo quang phổ Cary 100 UV-Vis 12 vị trí cuvet. Các cuvet được sử dụng trong thử nghiệm này là các cuvet thạch anh 1mm với các nút chặn. Trong mỗi cuvet, thêm 300μL mẫu để kiểm tra. Theo dõi sự thay đổi mật độ quang ở 360nm với chế phẩm được ủ ở 55°C.

Tác động của các tá dược và các nồng độ hoạt tính cao

Các nồng độ 1008 và độ pH cuối đo được của tất cả các chế phẩm của nghiên cứu 3 được tóm tắt trong bảng 13. Ở các chế phẩm với các nồng độ 1008 thấp, trung bình và cao (Bảng 4.3.1.-1) với các nồng độ sucroza, PS80 và nồng độ đệm khác nhau ở 55°C và giám sát các thay đổi OD₃₆₀. Như được thể hiện trong Fig. 2, đã quan sát được xu hướng kết tủa khác nhau của các chế phẩm này. Hai chế phẩm gần như bị kết tủa ngay lập tức khi bước ủ bắt đầu là các chế phẩm 2 và 6, chứa nồng độ 1008 cao hơn

tương đối (~120mg/ml) và nồng độ sucroza thấp hơn tương đối (4,5%). Mặt khác, các chế phẩm 3 và 7, chứa nồng độ 1008 thấp hơn tương đối (~60mg/ml) và nồng độ sucroza cao hơn tương đối (9%), kết tủa chậm hơn so với các chế phẩm khác. Xu hướng kết tủa của các tổ hợp khác của nồng độ 1008 và nồng độ sucroza trung bình thuộc một trong hai nhóm nêu trên.

Bảng 13

Điều kiện chế phẩm cuối với nghiên cứu 3

Chế phẩm #	Nồng độ tá dược	Nồng độ 1008 cuối (mg/ml)	Độ pH cuối
1	Xitrat 10mM/Sucroza 4,5%/PS80 0,01%	58,223 (thấp hơn)	6,56
2	Xitrat 10mM/Sucroza 4,5%/PS80 0,1%	113,554 (cao hơn)	6,53
3	Xitrat 10mM/Sucroza 9%/PS80 0,1%	59,034 (thấp hơn)	6,55
4	Xitrat 10mM/Sucroza 9%/PS80 0,01%	117,489 (cao hơn)	6,48
5	Xitrat 20mM/Sucroza 4,5%/PS80 0,1%	58,910 (thấp hơn)	6,53
6	Xitrat 20mM/Sucroza 4,5%/PS80 0,01%	116,712 (cao hơn)	6,50
7	Xitrat 20mM/Sucroza 9%/PS80 0,01%	57,431 (thấp hơn)	6,47
8	Xitrat 20mM/Sucroza 9%/PS80 0,1%	116,466 (cao hơn)	6,45
9	Xitrat 15mM/Sucroza 6,75%/PS80 0,055%	87,555 (trung bình)	6,48
10	Xitrat 15mM/Sucroza 6,75%/PS80 0,055%	87,769 (trung bình)	6,49

Sử dụng thời gian để OD₃₆₀ của mỗi chế phẩm đạt đến 0,25 làm tiêu chí, các tác động của các yếu tố chế phẩm khác nhau được so sánh. Kết quả gợi ý rằng sucroza có tác động lớn nhất đến sự kết tủa 1008, tiếp theo đó là nồng độ API. Tác động của nồng độ sucroza và nồng độ API là ngược nhau, biểu thị nồng độ sucroza cao hơn và nồng độ API thấp hơn được ưu tiên cho độ ổn định chế phẩm tốt hơn. Hai yếu tố khác, nồng độ đệm và PS80 cho thấy tác động ít hơn.

Nghiên cứu 4

Nghiên cứu tiếp theo về hoạt tính và nồng độ sucroza

Dựa trên kết quả từ nghiên cứu 3, thực hiện nghiên cứu 4 để khảo sát thêm về các tác động của nồng độ protein (60 - 120mg/ml) và nồng độ sucroza (với khoảng hẹp hơn từ 6% đến 9%) trong đệm xitrat 15mM chứa PS 80 0,05% ở độ pH= 6,50. Thiết kế nghiên cứu được trình bày trong bảng sau.

Bảng 14

Thiết kế nghiên cứu cho nghiên cứu 4

Thứ tự chạy	Điểm trung tâm	Số lượng Khối	1008 (mg/ml)	Sucroza (%w/v)
1	1	1	60	6
2	1	1	120	6
3	1	1	60	9
4	1	1	120	9
5	-1	1	47,6	7,5
6	-1	1	132,4	7,5
7	-1	1	90	5,4
8	-1	1	90	9,6
9	0	1	90	7,5
10	0	1	90	7,5
11	0	1	90	7,5
12	0	1	90	7,5

Để bào chế các dược phẩm bào chế này, nạp khoảng 80g dược chất 1008 lên hệ thống TFF và sau đó, tiến hành trao đổi đệm với đệm xitrat 15mM chứa sucroza 6% ở khoảng 5 lần thể tích so với thể tích của dược chất. Sau khi trao đổi đệm, thể tích của dung dịch protein này được giảm xuống khoảng một nửa thể tích ban đầu sử dụng hệ thống TFF. Thu khoảng 44g dung dịch 1008 đã cô đặc và cô đặc protein này đến khoảng 112mg/ml đo bằng máy đo quang phổ NanoDrop 2000. Sau đó, sử dụng dung dịch 1008 cô đặc để chuẩn bị các chế phẩm bào chế #1, 3, 5, 7-12 bằng cách trộn với lượng thích hợp của PS80 10% và đệm xitrat 15mM chứa sucroza ở nồng độ 0%, 6% và/hoặc 40% để thu được các nồng độ API, sucroza và PS80 cuối tương ứng trong mỗi chế phẩm trong số các chế phẩm bào chế này. Tiếp tục cô đặc phần còn lại của dung dịch 1008 đến khoảng 132mg/ml để chuẩn bị các chế phẩm bào chế #2 và 4 theo cùng một kiểu. Sau cùng, chuẩn bị chế phẩm bào chế #6 bằng cách cô đặc dung dịch 1008 với khoảng 171mg/ml và các nồng độ của protein, sucroza và PS80 được điều chỉnh

bằng PS80 10% và đệm xitrat 15mM chứa sucroza ở nồng độ 0%, 6% và/hoặc 40%. Xác định nồng độ cuối của 1008 trong mỗi được phẩm bào chế bằng máy đo quang phổ NanoDrop 2000 và điều chỉnh độ pH đến 6,5.

Phân tích các mẫu này sử dụng thử nghiệm độ đục được mô tả trên đây. Tám được phẩm bào chế được chọn (#1-4 và #7-10) cũng được giữ trong máy ủ nghiên cứu 40°C trong 6 tuần và phân tích bằng các phương pháp MIF, IEX và SEC ở các thời điểm khác nhau.

Mười hai chế phẩm, như được liệt kê trong bảng 15 đã được khảo sát.

Bảng 15

Các điều kiện chế phẩm cuối và T_m từ thử nghiệm độ đục của nghiên cứu 4

Chế phẩm #	Nồng độ Sucroza	1008 cuối cùng (mg/ml)	Độ pH cuối	T_m (phút)
1	6%	61,6	6,49	62,0
2	6%	122,8	6,49	27,4
3	9%	60,0	6,50	86,3
4	9%	119,0	6,51	34,2
5	7,5%	47,7	6,50	97,0
6	7,5%	134,5	6,50	24,2
7	5,38%	94,6	6,50	33,1
8	9,62%	86,2	6,50	49,4
9	7,5%	91,7	6,50	41,2
10	7,5%	89,5	6,50	44,5
11	7,5%	88,4	6,48	38,6
12	7,5%	90,1	6,52	40,0

Sử dụng thử nghiệm về độ đục ở 55°C để theo dõi sự kết tủa của các chế phẩm này. Như được thể hiện trong Fig. 3, các mức độ kết tủa khác nhau được thể hiện bởi các chế phẩm bào chế này trong áp lực nhiệt giống nhau. Các chế phẩm có nồng độ 1008 cao tương đối và nồng độ sucroza thấp tương đối (như là chế phẩm bào chế # 2 và 6 trong bảng 15) là các chế phẩm bị kết tủa nhanh chóng sau khi ủ. Các chế phẩm có nồng độ 1008 thấp tương đối và nồng độ sucroza cao tương đối (chế phẩm bào chế # 3 và 5 trong bảng 15) kết tủa chậm hơn tất cả các chế phẩm còn lại. Các đường cong thu được từ thử nghiệm độ đục của các chế phẩm bào chế khác nhau được khớp với hàm sigmoid. Thời gian ủ tương ứng với điểm giữa của sự chuyển tiếp đã được ghi lại là T_m

(transition mid-point time) với mỗi chế phẩm bào chế. Kết quả được liệt kê trong bảng 15, giá trị T_m theo nồng độ sucroza và nồng độ 1008 đã cho thấy các tác động đối nghịch của nồng độ sucroza và nồng độ 1008 lên sự kết tủa protein.

Bên cạnh các nghiên cứu sử dụng thử nghiệm độ đục ở 55°C, giám sát tính ổn định của tám chế phẩm bào chế được chọn ở 40°C bằng MFI, SEC và IEX qua 6 tuần. Chế phẩm bào chế và kết quả được liệt kê trong bảng 16 đến bảng 23. Kết quả tương đồng với thử nghiệm độ đục, kết quả MFI cho thấy rằng với nồng độ 1008 cao (~120mg/ml) tạo ra nhiều tiểu phân hơn, đặc biệt là các tiểu phân có kích thước lớn hơn 25µm, so với các chế phẩm có nồng độ API thấp hơn. Kết quả MFI không cho thấy rõ tác động của nồng độ sucroza đối với các chế phẩm bào chế có lượng 1008 tương tự (chế phẩm bào chế #7 đến 10). Như được thể hiện trong Fig. 4, sau 6 tuần bảo quản ở 40°C, hai chế phẩm bào chế (#2 và 4) có nồng độ 1008 cao phân hủy nhiều nhất, các chế phẩm bào chế có nồng độ 1008 ~60mg/ml phân hủy ít hơn tất cả các chế phẩm bào chế khác. Với các chế phẩm bào chế có nồng độ 1008 ~90mg/ml, quan sát thấy ở nồng độ sucroza cao hơn (chế phẩm bào chế #8) xảy ra sự phân hủy hơi ít hơn so với ở nồng độ sucroza thấp hơn (chế phẩm bào chế #7). Các kết quả IEX đã cho thấy xu hướng giống như SEC.

Bảng 16

Kết quả của nghiên cứu về tăng tính ổn định ở 40°C
của chế phẩm #1 từ nghiên cứu 4

Điều kiện chế phẩm	F1: 1008 61,6mg/ml trong xitrat 15mM, sucroza 6%, PS80 0,05%, pH 6,5			
Thời gian	Ban đầu	2 tuần	4 tuần	6 tuần
Tiểu phân theo MFI				
$\geq 10\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	42	18	107	26
$\geq 25\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	6	2	4	4
$\geq 50\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	0	0	0	0
$\geq 2\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	1076	656	12911	2076
SEC (% ban đầu)	99,9	93,6	83,0	77,1
IEX (% ban đầu)	97,7	92,8	83,2	76,8

Bảng 17

Kết quả của nghiên cứu về tăng tính ổn định ở 40°C
của chế phẩm #2 từ nghiên cứu 4

Điều kiện chế phẩm	F2: 1008 122,8mg/ml trong xitrat 15mM, sucroza 6%, PS80 0,05%, pH 6,5			
Thời gian	Ban đầu	2 tuần	4 tuần	6 tuần
Tiêu phân theo MFI				
$\geq 10\mu\text{m}$, < $100\mu\text{m}$ (#/mL)	36	8	16	32
$\geq 25\mu\text{m}$, < $100\mu\text{m}$ (#/mL)	8	2	2	2
$\geq 50\mu\text{m}$, < $100\mu\text{m}$ (#/mL)	2	2	0	0
$\geq 2\mu\text{m}$, < $100\mu\text{m}$ (#/mL)	1267	994	235	4856
SEC (% ban đầu)	100,0	91,2	78,7	63,3
IEX (% ban đầu)	97,8	91,0	79,1	69,3

Bảng 18

Kết quả của nghiên cứu về tăng tính ổn định ở 40°C của chế phẩm #3 từ nghiên cứu 4

Điều kiện chế phẩm	F3: 1008 60,0mg/ml trong xitrat 15mM, Sucroza 9%, PS80 0,05%, pH 6,5			
Thời gian	Ban đầu	2 tuần	4 tuần	6 tuần
Tiêu phân theo MFI				
$\geq 10\mu\text{m}$, < $100\mu\text{m}$ (#/mL)	10	22	16	28
$\geq 25\mu\text{m}$, < $100\mu\text{m}$ (#/mL)	0	0	0	2
$\geq 50\mu\text{m}$, < $100\mu\text{m}$ (#/mL)	0	0	0	0
$\geq 2\mu\text{m}$, < $100\mu\text{m}$ (#/mL)	959	782	897	2428
SEC (% ban đầu)	100,0	94,0	84,8	77,7
IEX (% ban đầu)	97,8	93,1	84,4	76,9

Bảng 19

Kết quả của nghiên cứu về tăng tính ổn định ở 40°C của chế phẩm #4 từ nghiên cứu 4

Điều kiện chế phẩm	F4: 1008 119,0mg/ml trong xitrat 15mM, Sucroza 9%, PS80 0,05%, pH 6,5			
Thời gian	Ban đầu	2 tuần	4 tuần	6 tuần
Tiêu phân theo MFI				
$\geq 10\mu\text{m}$, < $100\mu\text{m}$ (#/mL)	12	24	4	16
$\geq 25\mu\text{m}$, < $100\mu\text{m}$ (#/mL)	0	0	0	4
$\geq 50\mu\text{m}$, < $100\mu\text{m}$ (#/mL)	0	0	0	2
$\geq 2\mu\text{m}$, < $100\mu\text{m}$ (#/mL)	366	581	384	2659
SEC (% ban đầu)	100,0	92,5	79,1	63,6
IEX (% ban đầu)	97,8	92,2	81,3	69,1

Bảng 20

Kết quả của nghiên cứu về tăng tính ổn định ở 40°C của chế phẩm #7 từ nghiên cứu 4

Điều kiện chế phẩm	F7: 1008 94,6mg/ml trong xitrat 15mM, sucroza 5,4%, PS80 0,05%, pH 6,5			
	Ban đầu	2 tuần	4 tuần	6 tuần
Tiêu phân (MFI)				
$\geq 10\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	14	20	6	6
$\geq 25\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	0	0	0	0
$\geq 50\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	0	0	0	0
$\geq 2\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	626	1647	843	2896
SEC (% ban đầu)	100,0	93,1	82,2	70,3
IEX (% ban đầu)	97,9	92,5	82,6	71,5

Bảng 21

Kết quả của nghiên cứu về tăng tính ổn định ở 40°C của chế phẩm #8 từ nghiên cứu 4

Điều kiện chế phẩm	F8: 1008 86,2mg/ml trong xitrat 15mM, sucroza 9,6%, PS80 0,05%, pH 6,5			
Thời gian	Ban đầu	2 tuần	4 tuần	6 tuần
Tiêu phân theo MFI				
$\geq 10\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	4	18	8	8
$\geq 25\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	0	0	0	0
$\geq 50\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	0	0	0	0
$\geq 2\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	533	1810	1281	2162
SEC (% ban đầu)	100,0	93,3	83,2	73,8
IEX (% ban đầu)	97,8	93,1	83,6	73,9

Bảng 22

Kết quả của nghiên cứu về tăng tính ổn định ở 40°C của chế phẩm #9 từ nghiên cứu 4

Điều kiện chế phẩm	F9: 1008 91,7mg/ml trong xitrat 15mM, sucroza 7,5%, PS80 0,05%, pH 6,5			
Thời gian	Ban đầu	2 tuần	4 tuần	6 tuần
Tiêu phân theo MFI				
$\geq 10\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	6	20	6	28
$\geq 25\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	0	0	2	0
$\geq 50\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	0	0	0	0
$\geq 2\mu\text{m}$, $< 100\mu\text{m}$ (#/mL)	678	682	1068	4003
SEC (% ban đầu)	100,0	93,8	83,0	71,0
IEX (% ban đầu)	97,8	93,2	83,7	72,2

Bảng 23

Kết quả của nghiên cứu về tính ổn định ở 40°C
của chế phẩm #10 từ nghiên cứu 4

Điều kiện chế phẩm	F10: 1008 89,5mg/ml trong xitrat 15mM, sucroza 7,5%, PS80 0,05%, pH 6,5			
Thời gian	Ban đầu	2 tuần	4 tuần	6 tuần
Tiêu phân theo MFI				
$\geq 10\mu\text{m}, < 100\mu\text{m}$ (#/mL)	18	10	22	44
$\geq 25\mu\text{m}, < 100\mu\text{m}$ (#/mL)	0	2	4	0
$\geq 50\mu\text{m}, < 100\mu\text{m}$ (#/mL)	0	0	0	0
$\geq 2\mu\text{m}, < 100\mu\text{m}$ (#/mL)	352	638	1068	2536
SEC (% ban đầu)	100,0	93,9	83,4	72,0
IEX (% ban đầu)	97,9	93,5	83,7	72,9

Ví dụ 3

Nghiên cứu về tính ổn định nghiên cứu

Chế phẩm đối chứng

Tiến hành tính ổn định nghiên cứu với chế phẩm chứa dung dịch 1008 ở nồng độ 60mg/ml trong xitrat 20mM, PS20 0,001% ở độ pH= 6,25 làm chế phẩm đối chứng. Lọc chế phẩm đối chứng này qua dụng cụ lọc ống tiêm 0,2 μm và giữ ở 40°C, nhiệt độ phòng ambient, và tủ lạnh. Trích ra từ các mẫu ở thời điểm 0, 2 và 5 tuần với các mẫu 40°C, và 26 tuần với các mẫu được giữ ở nhiệt độ phòng ambient và tủ lạnh. Kiểm tra các mẫu về tính ổn định được chọn về độ pH, độ thẩm thấu, hàm lượng theo A280, SEC, IEX CGE và ELISA. Kết quả được trình bày trong bảng 24.

Bảng 24

Kết quả độ ổn định khám phá của chế phẩm đối chứng

(1008 ở nồng độ 60mg/ml trong xitrat 20mM, PS20 0,001% ở độ pH=6,25)

Nhiệt độ		40°C		RT	2-8°C
Thời gian (tuần)	0	2	5	26	26
Nồng độ theo A280 (mg/ml)	na	62	61*	Na	na
pH	na	6,297	6,333	Na	na

Độ thấm thấu	na	312	310	Na	na
SEC (% Ban đầu)	100	90,6	75,6	88,8	99,4
IEX (% Ban đầu)	100	91,3	70,9	88,5	99,3
CGE	na	99,3	98,3	Na	na
ELISA	na	na	1,0	Na	na

*Mẫu này được quan sát bằng mắt là đục với kết tủa trắng.

Tiến hành một nghiên cứu khác trên chế phẩm đối chứng chứa dung dịch 1008 ở nồng độ 60mg/ml trong xitrat 20mM, PS20 0,001% và NaCl 0,73% ở độ pH=6,25. Lọc chế phẩm qua dụng cụ lọc ống tiêm 0,2 μ m và giữ trong 40°C. Trích mẫu từ các mẫu này tại thời điểm 1, 2, 3, và 4 tuần để phân tích MFI. Kết quả được trình bày trong bảng 25.

Bảng 25

Kết quả về độ ổn định của chế phẩm POC ở 40°C

(1008 ở nồng độ 60mg/ml trong xitrat 20mM, PS20 0,001% ở độ pH=6,25)

Thời gian (tuần)	0	1	2	3	4
$\geq 10\mu\text{m}$ theo MFI (#/mL)	Na	172	894	2946	3183
$\geq 25\mu\text{m}$ theo MFI (#/mL)	Na	23	157	539	1189
$\geq 50\mu\text{m}$ theo MFI (#/mL)	Na	4	19	92	248
Tổng số tiểu phân theo MFI (#/mL)	Na	2381	8954	29716	17705

Nghiên cứu tính ổn định trong nghiên cứu đối với 1008 ở nồng độ 60mg/ml với Sucroza 9% và Polysorbat 80 0,5%

Tiến hành tính ổn định trong nghiên cứu đối với chế phẩm của 1008 ở nồng độ 60mg/ml chứa Sucroza 9% và PS80 0,5%. Lọc chế phẩm qua dụng cụ lọc ống tiêm 0,2 μ m và giữ ở 40°C. Trích lấy mẫu của các mẫu này ở thời điểm 1,6, 2,9 và 4 tuần và phân tích bằng MFI, SEC và IEX. Kết quả được lập thành bảng trình bày trong bảng 26.

Bảng 26

Kết quả về độ ổn định của chế phẩm của 1008 ở nồng độ 60mg/ml ở 40°C

(1008 ở nồng độ 60mg/ml trong xitrat 20mM, Sucroza 9% và PS80 0,5% ở độ pH=6,25)

Thời gian (tuần)	0	1,6	2,9	4
≥ 10um theo MFI (#/mL)	-	12	80	130
≥ 25um theo MFI (#/mL)	-	4	12	12
≥ 50um theo MFI (#/mL)	-	0	4	0
Tổng số tiểu phân theo MFI (#/mL)	-	688	2900	4876
SEC (% Ban đầu)	98,4	93,3	88,6	84,1
IEX (% Ban đầu)	97,0	91,3	83,9	78,9

Nghiên cứu tính ổn định thí điểm đối với 1008 ở nồng độ 60mg/ml, Sucroza 9%, Xitrat 20mM, PS80 0,1% ở độ pH=6,25

Tiến hành nghiên cứu tính ổn định thời gian thực của dung dịch 1008 ở nồng độ 60mg/ml đối với chế phẩm chứa Sucroza 9%, Xitrat 20mM, PS80 0,1% ở độ pH=6,25 như được trình bày trong bảng 27. Giữ các mẫu kiểm tra tính ổn định ở 2-8°C, 25°C, 40°C và tủ có đèn chiếu sáng (LC: light cabinet); chúng cũng trải qua ba chu kỳ đông-rã đông (FT:Freeze-Thaw). Trích lấy mẫu các mẫu này theo lịch trình được trình bày trong bảng 28, và phân tích bằng các phương pháp phân tích khác nhau như là pH, độ thẩm thấu, MFI, hàm lượng, SEC, IEX, CGE là hiệu lực.

Bảng 27

Thành phần của chế phẩm cho thử nghiệm tính ổn định thí điểm

Thành phần	Nồng độ (% khối lượng/thể tích)
1008	6
Axit xitric, khan	0,012
Trinatri xitrat (dihydrat)	0,57
Sucroza	9
Polysorbat 80	0,1
Axit clohydric hoặc Natri hydroxit	pH 6,25
Nước để pha tiêm	qs 100

Bảng 28

Điều kiện bảo quản và lịch trình trích lấy mẫu cho thử nghiệm tính ổn định thí điểm

Điều kiện	Lịch trình trích lấy mẫu
2-8°C (tủ lạnh)	0, 4, 6, 9, 8, 12, và 26 tuần
25°C	2, 4, 6, 9, 8, 12, và 26 tuần
40°C	1, 1, 2, và 4 tuần
Tủ có đèn chiếu sáng (LC)	6 tuần
Đông-Rã đông (FT)	3 chu kỳ

Trong giai đoạn sớm, nghiên cứu tính ổn định thời gian thực của dung dịch 1008 ở nồng độ 60mg/ml đã được bắt đầu. Chế phẩm chứa Sucroza 9%, Xitrat 20mM, PS80 0,1% ở độ pH=6,25 như được trình bày trong bảng 29. Giữ các mẫu ở 2-8°C, 25°C, 40°C và tủ có đèn chiếu sáng (LC); chúng cũng trải qua ba chu kỳ đông-rã đông (FT). Trích lấy mẫu các mẫu này theo lịch trình được trình bày trong bảng 30, và phân tích bằng các phương pháp phân tích khác nhau. Kết quả về tính ổn định được lập thành bảng trình bày trong bảng 31-bảng 33.

Bảng 29

Thành phần của chế phẩm cho thử nghiệm tính ổn định thí điểm

Dung dịch 1008 (1008) ở nồng độ 60mg/ml

Thành phần	Nồng độ (% khối lượng/thể tích)
1008	6
Axit xitric, khan	0,012
Trinatri xitrat (dihydrat)	0,57
Sucroza	9
Polysorbat 80	0,1
Axit clohydric hoặc Natri hydroxit	pH 6,25
Nước để pha tiêm	qs 100

Bảng 30

Điều kiện bảo quản và lịch trình trích lấy mẫu cho thử nghiệm tính ổn định thí điểm

Điều kiện	Thời điểm lấy mẫu
2-8°C (tủ lạnh)	0, 4, 6,9, 8, 12, và 26 tuần
25°C	2, 4, 6,9, 8, 12, và 26 tuần
40°C	1,1, 2, và 4 tuần
Tủ có đèn chiếu sáng (LC)	6 tuần
Đông-Rã đông (FT)	3 chu kỳ

Bảng 31

Kết quả (Phần 1/3) của nghiên cứu tính ổn định thí điểm
của 1008 6%, Sucroza 9%, Xitrat 20mM, PS80 0,1% ở độ pH=6,25

Nhiệt độ	2-8°C					
Thời gian (tuần)	0	4	6,9	8	12	26
≥ 10um theo MFI (#/mL)	31	57	134	8	19	42
≥ 25um theo MFI (#/mL)	8	4	31	4	0	11
≥ 50um theo MFI (#/mL)	0	0	8	0	0	4
Tổng số tiểu phân theo MFI (#/mL)	1284	4620	6848	5916	1047	4976
Hình thức						
Nồng độ (mg/ml)	58	64	66			
pH	6,197	6,184	6,184			
Độ thẩm thấu	349	349	356			
UV 280 (mg/ml)						
SEC (% Ban đầu)	100			99,5	99,4	99,9
IEX (% Ban đầu)	100			99,3	99,3	98,9
CGE	99,83			99,7	99,5	
ELISA	0,86			1,2	0,97	1,1

Bảng 32

Kết quả (Phần 2/3) của nghiên cứu tính ổn định thí điểm đối với 1008 6%, Sucroza 9%,
Xitrat 20mM, PS80 0,1% ở độ pH=6,25

Nhiệt độ	25°C					
Thời gian (tuần)	2	4	6,9	8	12	26
≥ 10um theo MFI (#/mL)	46	50	206	27	38	157

≥ 25um theo MFI (#/mL)	4	4	50	4	0	19
≥ 50um theo MFI (#/mL)	0	0	11	0	0	0
Tổng số tiểu phân theo MFI (#/mL)	8186	6581	8679	2553	4143	10681
Hình thức						
Nồng độ (mg/ml)	66	75	69			
pH	6,209	6,198	6,196			
Độ thẩm thấu	356	353	350			
UV 280 (mg/ml)						
SEC (% Ban đầu)	99,3	98,1	95,8	95,2	93,8	86,6
IEX (% Ban đầu)	99,8	97,2	95,0	94,2	91,5	85,7
CGE	99,6	99,7		99,6	99,3	
ELISA	-	-	-	1,1	0,92	1,1

Bảng 33

Kết quả (Phần 3/3) của nghiên cứu tính ổn định thí điểm đối với 1008 6%, Sucroza 9%, Xitrat 20mM, PS80 0,1% ở độ pH=6,25

Nhiệt độ	40°C				LC	FT
Thời gian (tuần)	0	1,1	2	4	6	3 chu kỳ
≥ 10um theo MFI (#/mL)	31	34	161	88	287	138
≥ 25um theo MFI (#/mL)	8	4	50	15	31	19
≥ 50um theo MFI (#/mL)	0	0	15	4	0	0
Tổng số tiểu phân theo MFI (#/mL)	1284	3871	6306	29372	16081	8415
Hình thức				màu đục, quan sát thấy kết tủa trắng	màu vàng	
Nồng độ (mg/ml)	58	66	65	74	57	63
pH	6,20	6,18	6,22	6,24	6,16	6,19
Độ thẩm thấu (mOsm/Kg)	349	348	350	353	353	349
UV 280 (mg/ml)						
SEC (% Ban đầu)	100	95,6	88,6	72,9	10,5	100
IEX (% Ban đầu)	100	98,1	89,1	71,3	n/a	100
CGE	99,8	99,8	99,0	98,6	34,9	99,5
ELISA	0,86	-	-	0,87		

Tính ổn định trong nghiên cứu của đệm xitrat: 1008 ở nồng độ 60mg/ml trong xitrat 15mM/Sucroza 6,75% / PS80 0,05% / pH 6,75

Thực hiện thử nghiệm tính ổn định trong nghiên cứu của đệm xitrat đối với chế phẩm của 1008 ở nồng độ 60mg/ml trong xitrat 15mM/Sucroza 6,75%/PS80 0,05%/pH6,75. Giữ các mẫu kiểm tra tính ổn định ở 5°C và 25°C, các mẫu này cũng trải qua chu kỳ đông-rã đông. Trích lấy mẫu các mẫu này theo lịch trình được trình bày trong bảng sau, và phân tích về hình thức, pH, độ thẩm thấu, MFI, hàm lượng, SEC, và IEX.

Bảng 34

Điều kiện bảo quản và lịch trình trích lấy mẫu cho thử nghiệm độ ổn định Interim

Điều kiện	Thời điểm lấy mẫu
25°C	0, 1, 3, 6, và 9 tháng
5°C	3, 6, và 9 tháng
Đông-Rã đông (FT)	3 chu kỳ

Tương tự, tiến hành thử nghiệm tính ổn định trong nghiên cứu của đệm histidin với chế phẩm của 1008 ở nồng độ 60mg/ml trong Histidin 15mM/Sucroza 6,75%/PS80 0,05%/pH6,75. Giữ các mẫu kiểm tra tính ổn định ở 5°C và 25°C. Các mẫu này cũng trải qua chu kỳ đông-rã đông. Trích lấy mẫu các mẫu này theo lịch trình được trình bày trong bảng sau, và phân tích về hình thức, pH, độ thẩm thấu, MFI, hàm lượng, SEC, và IEX.

Bảng 35

Điều kiện bảo quản và lịch trình trích lấy mẫu cho thử nghiệm độ ổn định Interim

Điều kiện	Thời điểm lấy mẫu
25°C	0, 1, 3, và 6 tháng
5°C	3 và 6 tháng
Đông-Rã đông (FT)	3 chu kỳ

Dữ liệu thử nghiệm được lập thành bảng trong các bảng sau.

Bảng 36 Kết quả (Phần 1/2) của nghiên cứu tính ổn định Interim ở 25°C

1008 ở nồng độ 60mg/ml trong xitrat 15mM/Sucroza 6,75%/ PS80 0,05% / pH=6,75

Thời gian (tháng)	Ban đầu	1	3	6	9
Tiểu phân					
≥ 10µm theo MFI (#/mL)	28	42	49	70	
≥ 25µm theo MFI (#/mL)	3	0	3	3	
≥ 50µm theo MFI (#/mL)	0	0	0	0	
Tổng số tiểu phân theo MFI (#/mL)	400	1819	2279	8355	
≥ 10µm theo HIAC (#/mL)	218,3				
≥ 25µm theo HIAC (#/mL)	38,7				
≥ 50µm theo HIAC (#/mL)	7,0				
Tổng số tiểu phân theo HIAC (#/mL)	11170				
Hình thức					
Màu sắc	Không màu	Không màu	Không màu	Không màu	
Độ trong	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1	
pH	6,74	6,72	6,76		
Độ thẩm thấu (mOsm)	320				
SEC (% Ban đầu)	99,9 (diện tích %)	98,6	94,2	97,4	
IEX (% Ban đầu)	97,0 (diện tích %)	98,4	94,2	91,0	89,9

Bảng 37 Kết quả (Phần 2/2) của nghiên cứu tính ổn định Interim 1008 ở nồng độ 60mg/ml trong xitrat 15mM/Sucroza 6,75%/ PS80 0,5% / pH=6,75

Điều kiện	5°C			Đông-Rã đông
Thời gian (tháng)	3	6	9	3 chu kỳ
Tiểu phân				
≥ 10µm theo MFI (#/mL)	56	63		24
≥ 25µm theo MFI (#/mL)	14	6,95		3
≥ 50µm theo MFI (#/mL)	0	0		0
Tổng số tiểu phân theo MFI (#/mL)	1092	6322		29052
≥ 10µm theo HIAC (#/mL)				441
≥ 25µm theo HIAC (#/mL)				67
≥ 50µm theo HIAC (#/mL)				18
Tổng số tiểu phân theo HIAC (#/mL)				27700
Hình thức				
Màu sắc	Không màu	Không màu		ND
Độ trong	NMT EP1	NMT EP1		ND
pH	6,72	-		6,71

Độ thẩm thấu (mOsm)	-	-		306
SEC (% Ban đầu)	99,8	99,8		99,7
IEX (% Ban đầu)	100,0	99,4	99,9	99,5

Bảng 38

Kết quả (Phần 1/2) của nghiên cứu tính ổn định Interim ở 25°C

1008 ở nồng độ 60mg/ml trong Histidin 15mM /Sucroza 6,75%/ PS80 0,05% / pH=6,75

Thời gian (tháng)	Ban đầu	1	3	6
Tiểu phân				
≥ 10um theo MFI (#/mL)	14	642	153	56
≥ 25um theo MFI (#/mL)	3	54	14	3
≥ 50um theo MFI (#/mL)	0	4	0	0
Tổng số tiểu phân theo MFI (#/mL)	302	20483	9805	13374
≥ 10um theo HIAC (#/mL)	1493			
≥ 25um theo HIAC (#/mL)	127			
≥ 50um theo HIAC (#/mL)	15			
Tổng số tiểu phân theo HIAC (#/mL)	17341			
Hình thức				
Màu sắc	Không màu	Không màu	Không màu	Không màu
Độ trong	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1
pH	6,72	6,70	6,70	
Độ thẩm thấu (mOsm)	286			
SEC (% Ban đầu)	99,9 (% diện tích)	98,3	93,6	97,5
IEX (% Ban đầu)	97,1 (%diện tích)	97,9	92,5	87,8

Bảng 39

Kết quả (Phần 2/2) của nghiên cứu tính ổn định Interim ở 25°C

1008 ở nồng độ 60mg/ml trong Histidin 15mM /Sucroza 6,75%/ PS80 0,05% / pH=6,75

Điều kiện	5°C		Đông lạnh-rã đông
Thời gian (tháng)	3	6	3 chu kỳ
Tiểu phân			
≥ 10um theo MFI (#/mL)	167	59,	17
≥ 25um theo MFI (#/mL)	10	7	0

≥ 50um theo MFI (#/mL)	3	0	0
Tổng số tiểu phân theo MFI (#/mL)	17404	7368	7607
≥ 10um theo HIAC (#/mL)			756
≥ 25um theo HIAC (#/mL)			175
≥ 50um theo HIAC (#/mL)			51
Tổng số tiểu phân theo HIAC (#/mL)			27698
Hình thức			
Màu sắc	Không màu	Không màu	ND
Độ trong	NMT EP1	NMT EP1	ND
pH	6,70		6,70
Độ thẩm thấu (mOsm)	-	-	271
SEC (% Ban đầu)	99,7	100,0	99,9
IEX (% Ban đầu)	99,2	99,2	99,2

Dữ liệu thử nghiệm đã chỉ ra rằng tính ổn định của các chế phẩm được tăng cường đáng kể, đặc biệt là trong việc ức chế sự hình thành tiểu phân, so với tính ổn định của chế phẩm đối chứng ở nồng độ protein là 60mg/ml.

Chế phẩm dung dịch ổn định được xác định là chứa xitrat 15mM/Sucroza 6,75%/PS80 0,0505% như được trình bày trong bảng 40.

Bảng 40

Thành phần	Nồng độ (% khối lượng/thể tích)	Khoảng nồng độ (% khối lượng/thể tích)
1008	12	6-12
Axit xitric, khan	0,009	0,006 – 0,012
Trinatri xitrat (dihydrat)	0,428	0,285 – 0,57
Sucroza	6,75	6,75
Polysorbat 80	0,05%	0,05%
Axit clohydric hoặc Natri hydroxit	pH 6,75	pH 6,75
Nước để pha tiêm	qs 100	qs 100

Sáng chế và các phương án của nó đã được mô tả chi tiết. Tuy nhiên, phạm vi của sáng chế không được chủ định là được giới hạn bởi bất kỳ phương án cụ thể nào về quá trình, sản xuất, chế phẩm chứa vật chất, hợp chất, phương tiện, phương pháp, và/hoặc các

bước đã được mô tả trong phần mô tả. Các cải biến, phương án thay thế, các biến thể khác có thể được tạo ra từ nguyên liệu đã được bộc lộ này mà không xa rời tinh thần và/hoặc các đặc tính thiết yếu của sáng chế. Theo đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ một cách dễ dàng từ phần mô tả này rằng các cải biến, phương án thay thế, và/hoặc các biến thể sau này thực hiện chức năng về cơ bản là giống hoặc đạt được kết quả về cơ bản là giống như các phương án đã được mô tả ở đây có thể được sử dụng như là các phương án có liên quan của sáng chế. Do đó, các yêu cầu bảo hộ dưới đây được chủ định để bao hàm trong phạm vi của chúng các cải biến, phương án thay thế, các biến thể về quá trình, sự sản xuất, chế phẩm chứa vật chất, hợp chất, phương tiện, phương pháp, và/hoặc các bước được bộc lộ trong phần mô tả này. Các yêu cầu bảo hộ không nên được hiểu là bị giới hạn về thứ tự được mô tả hoặc các thành phần trừ phi được đề cập đến tác động đó. Nên được hiểu rằng các thay đổi khác nhau về dạng và chi tiết có thể được tạo ra mà không xa rời phạm vi của phần yêu cầu bảo hộ.

Đơn sáng chế yêu cầu hưởng quyền ưu tiên từ đơn sáng chế Hoa Kỳ có quyền tạm thời số 62/088,061, nộp ngày 5 tháng 12 năm 2014, và từ đơn sáng chế Hoa Kỳ có quyền tạm thời số 62/076,770, nộp ngày 7 tháng 11 năm 2014, các phần mô tả của các đơn này được kết hợp cụ thể trong đơn sáng chế này bằng cách tham chiếu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm cho mắt chứa nước, có chứa (i) ít nhất 60 mg/ml kháng thể kháng VEGF mà chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2, (ii) khoảng 6,75% (w/v) sucroza, (iii) đệm xitrat có chứa khoảng 0,01% (w/v) axit xitric và khoảng 0,428% (w/v) trinati xitrat dehydrat, và (iv) khoảng 0,05% (w/v) polysorbat 80 làm chất hoạt động bề mặt, trong đó số lượng lớn nhất của các hạt có đường kính $\geq 10\mu\text{m}$ trong dược phẩm cho mắt chứa nước là 50 trong 1mL.
2. Dược phẩm cho mắt chứa nước theo điểm 1, trong đó kháng thể có chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 3.
3. Dược phẩm cho mắt chứa nước theo điểm 1, trong đó nồng độ của kháng thể kháng VEGF là khoảng 60 mg/ml.
4. Dược phẩm cho mắt chứa nước theo điểm 3, trong đó kháng thể kháng VEGF có chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 3, và pH là khoảng 6,8.
5. Dược phẩm cho mắt chứa nước theo điểm 1, trong đó nồng độ của kháng thể kháng VEGF là khoảng 120 mg/ml.
6. Dược phẩm cho mắt chứa nước theo điểm 5, trong đó kháng thể kháng VEGF có chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 3, và pH là khoảng 6,8.
7. Dụng cụ phân phối chứa dược phẩm cho mắt chứa nước theo điểm 1.
8. Dụng cụ phân phối theo điểm 7, trong đó dụng cụ phân phối này là bơm tiêm được nạp trước.
9. Dụng cụ phân phối chứa dược phẩm cho mắt chứa nước theo điểm 5.
10. Dụng cụ phân phối theo điểm 9, trong đó dụng cụ phân phối này là bơm tiêm được nạp trước.

11. Chế phẩm đông khô được bào chế bằng cách đông khô dược phẩm cho mất chứa nước theo điểm 1.

12. Chế phẩm đông khô được bào chế bằng cách đông khô dược phẩm cho mất chứa nước theo điểm 5.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Novartis AG
 Zhang, Huixiang
 Boring, Charles
 Kulshreshtha, Alok
 Zeng, Yuhon
 Wan, Li
 Alani, Laman
 <120> DƯỢC PHẨM CHO MẮT CHỨA NƯỚC CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG YẾU TỐ TĂNG
 TRƯỜNG NỘI MẠC MẠCH MÁU (VEGF), DỤNG CỤ PHÂN PHỐI VÀ CHẾ PHẨM ĐÔNG KHÔ
 CHỨA DƯỢC PHẨM NÀY
 <130> PAT056450-WO-PCT
 <140> US 14/934,666
 <141> 2015-11-06
 <150> US 62/088,061
 <151> 2014-12-05
 <150> US 62/076,770
 <151> 2014-11-07
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng tổng hợp
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60

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

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ tổng hợp

<400> 2

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 3
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc kháng thể tổng hợp

<400> 3

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
 85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu
 145 150 155 160

Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 165 170 175

Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala
180 185 190

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile
225 230 235 240

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 4

<211> 252

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc kháng thể tổng hợp

<400> 4

Met Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser
20 25 30

Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser
85 90 95

Thr Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 130 135 140

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser
 145 150 155 160

Leu Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 165 170 175

Gly Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr
 180 185 190

Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 195 200 205

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp
 225 230 235 240

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR H1

<400> 5

Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr
 1 5 10

<210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR H2

<400> 6

Phe	Ile	Asp	Pro	Asp	Asp	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Trp	Ala	Lys	Gly
1				5					10					15	

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR H3

<400> 7

Gly	Asp	His	Asn	Ser	Gly	Trp	Gly	Leu	Asp	Ile
1				5					10	

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR L1

<400> 8

Gln	Ala	Ser	Glu	Ile	Ile	His	Ser	Trp	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo.

<220>
 <223> CDR L2

<400> 9

Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser
1				5		

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR L3

<400> 10

Gln	Asn	Val	Tyr	Leu	Ala	Ser	Thr	Asn	Gly	Ala	Asn
1				5					10		

1 / 4

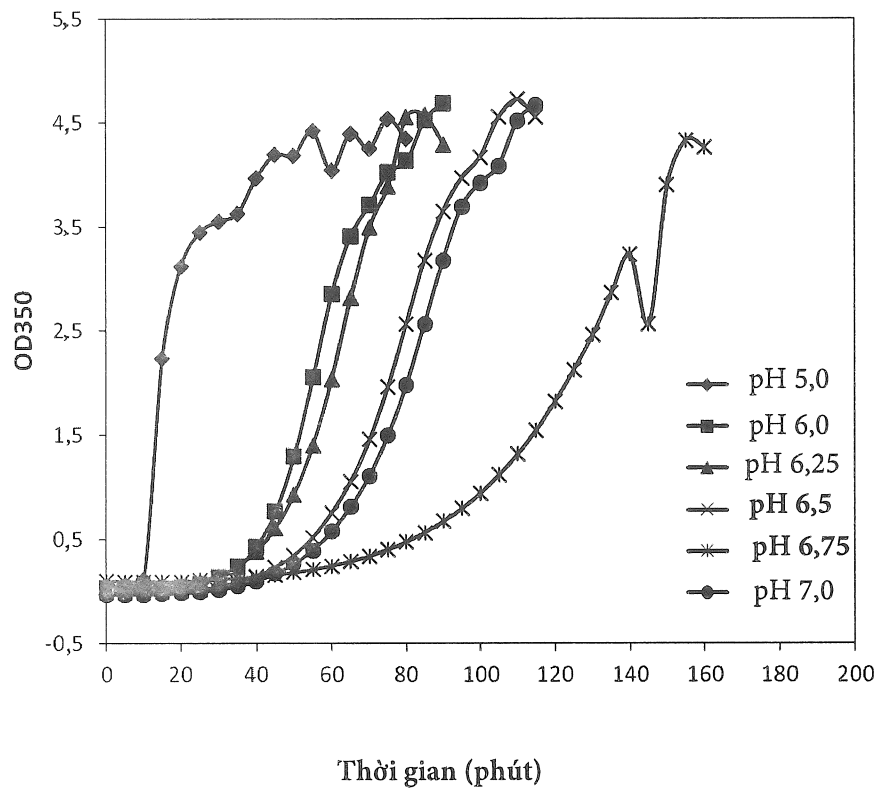


FIG. 1

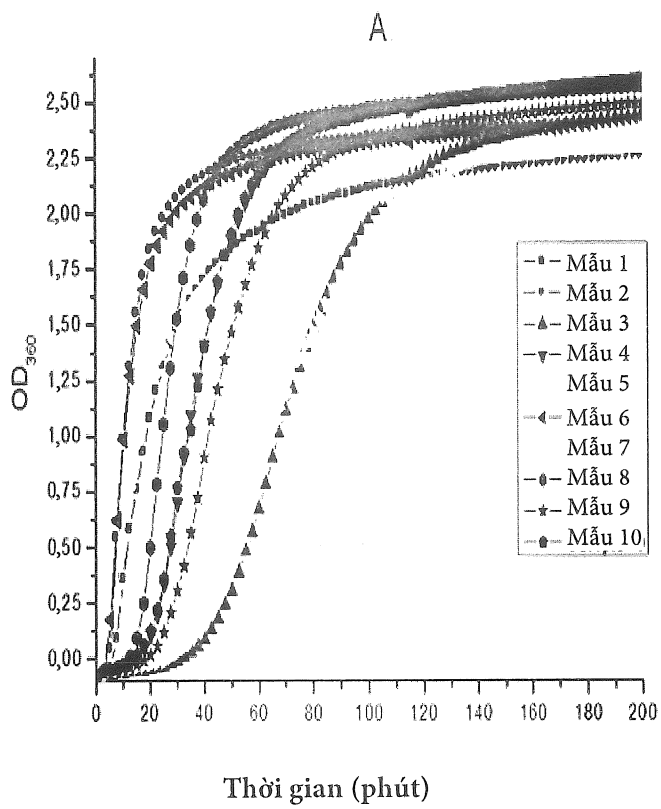


FIG. 2A

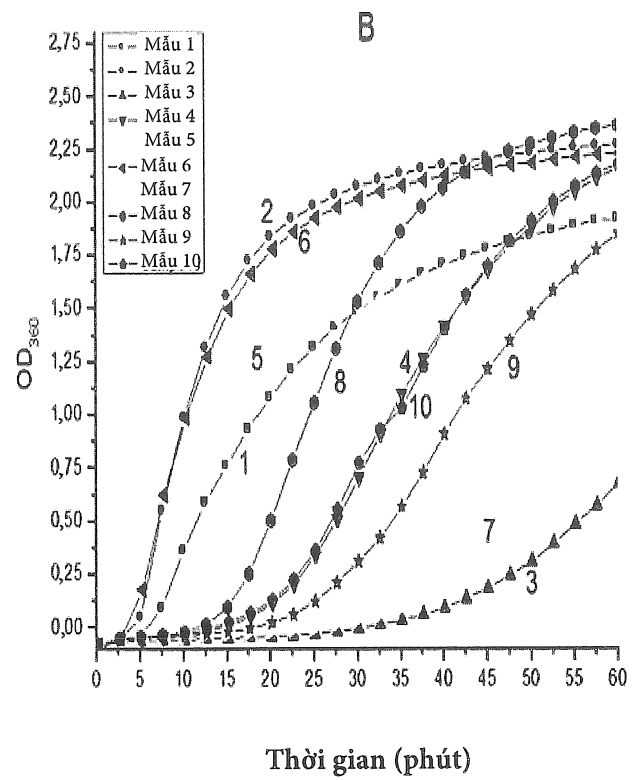


FIG. 2B

3/ 4

Nghiên cứu động lực học ở 55°C

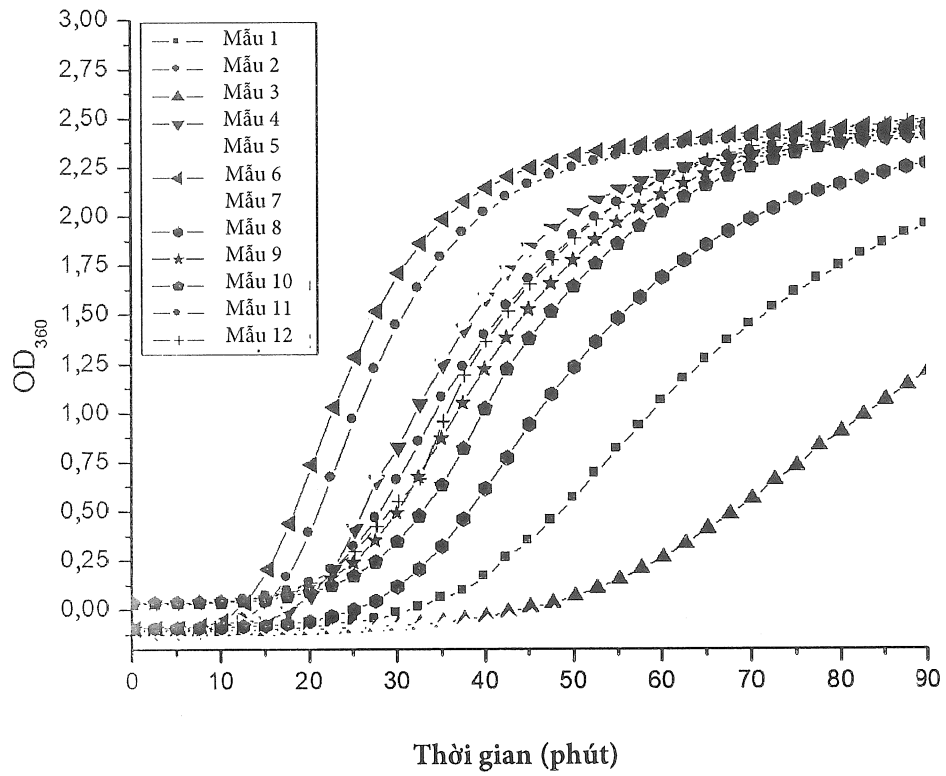


FIG. 3

4 / 4

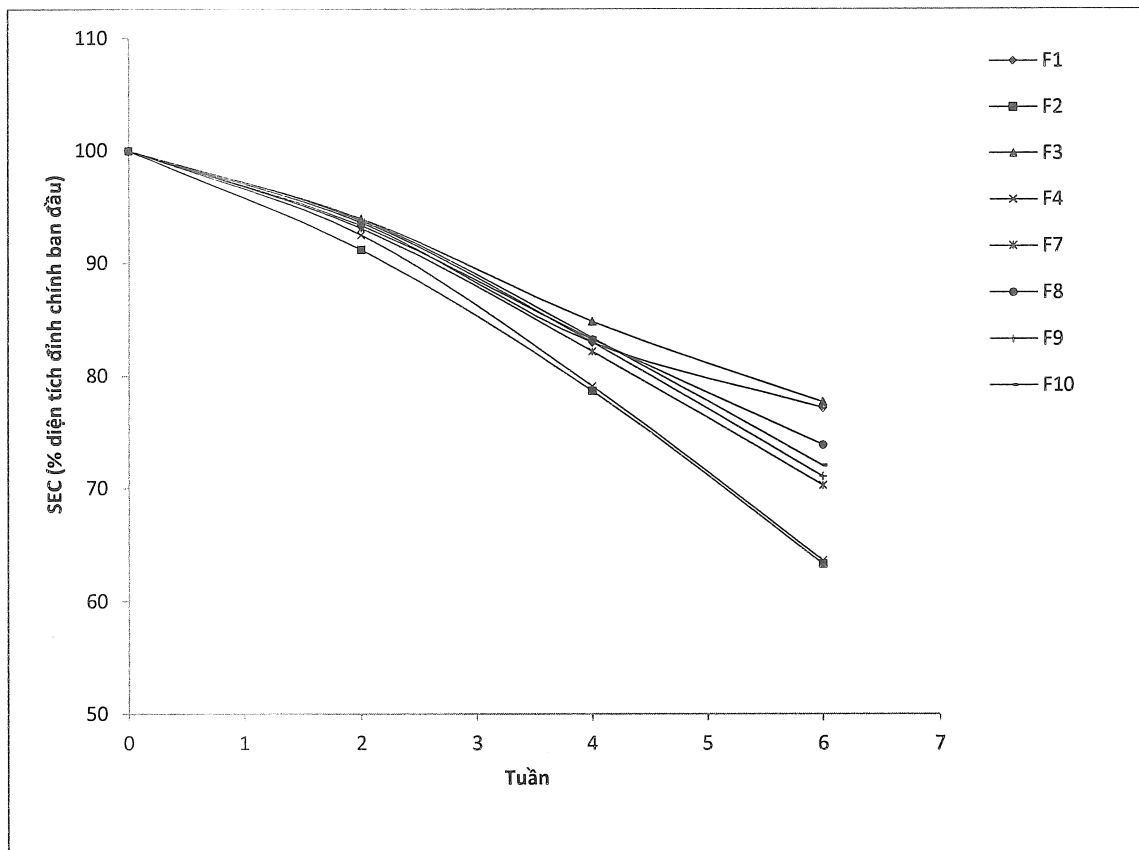


FIG. 4