



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

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

(11)



1-0051787

(51)^{2020.01} A61K 9/00; A61K 47/22; A61P 27/02; (13) B
A61K 9/08; A61K 38/17; A61K 47/26

(21) 1-2020-06952

(22) 10/05/2019

(86) PCT/US2019/031879 10/05/2019

(87) WO2019/217927 14/11/2019

(30) 62/669,506 10/05/2018 US; 62/752,127 29/10/2018 US; 62/769,876 20/11/2018 US;
62/813,882 05/03/2019 US

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/05/2021 398A

(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)

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

(72) GRAHAM, Kenneth S. (US); WADHWA, Saurabh (US).

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

(54) CHẾ PHẨM DƯỢC CHỨA NƯỚC CHỨA PROTEIN DUNG HỢP THỤ THỂ YẾU
TỔ SINH TRƯỞNG NỘI MÔ MẠCH (VEGF), PHƯƠNG PHÁP BÀO CHẾ VÀ
XY LANH NẠP SẴN THUỐC CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

(21) 1-2020-06952

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm dùng cho mắt chứa protein dung hợp thụ thể yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF) với nồng độ cao và có tính ổn định cao trong khi bảo quản.

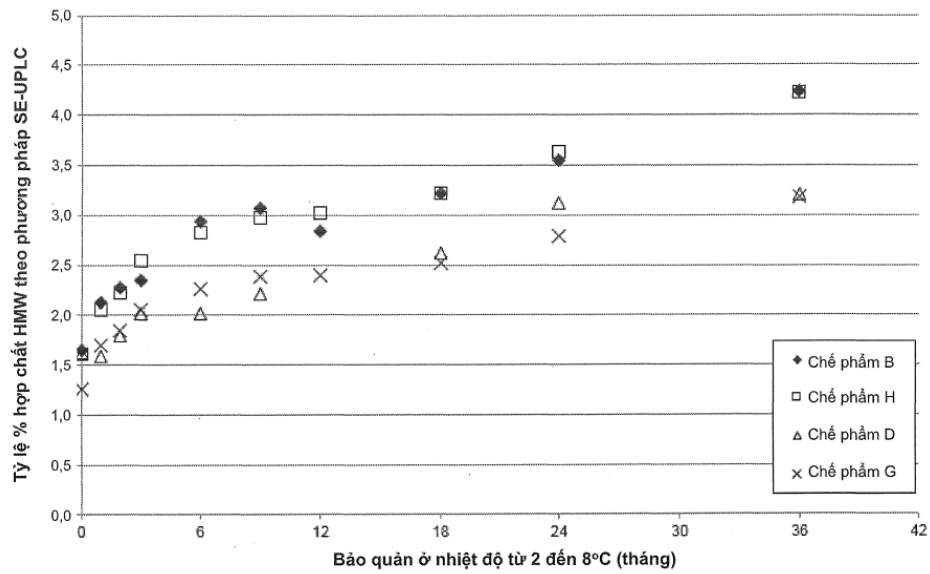


FIG. 1A

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, các phương án của sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF với nồng độ cao thích hợp để sử dụng cho mắt. Cụ thể hơn, các phương án của sáng chế đề cập đến chế phẩm được dạng lỏng để sử dụng trong thủy tinh thể, trong đó chế phẩm này chứa protein dung hợp thụ thể VEGF với nồng độ cao hơn 40 mg/ml, và có hiệu lực, tính ổn định, độ nhớt và độ pH được dụng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự phát triển chế phẩm dạng lỏng hữu ích trong điều trị đòi hỏi sự kết hợp của các thành phần với lượng khác nhau để tạo ra sự giải phóng ổn định và có chức năng cho được chất quan tâm. Điều này đặc biệt đúng khi được chất là protein, và ngoài ra, là kháng thể. Các chế phẩm chứa kháng thể tạo ra thách thức lâu dài cho các nhà phát triển và sản xuất thuốc, do hoạt tính và việc sử dụng kháng thể thường cần có hiệu lực, nồng độ mol/kg nước dung dịch, tính ổn định của protein, độ nhớt, và độ pH thích hợp về mặt được dụng. Các thách thức này càng gia tăng khi kháng thể có mặt với nồng độ cao hơn trong chế phẩm, ví dụ, cao hơn từ 20 đến 40 mg/ml, là nồng độ của phần lớn kháng thể có bán trên thị trường được phẩm.

Các chế phẩm chứa kháng thể với nồng độ cao hơn cho phép thời gian tiêm ngắn hơn, thể tích tiêm nhỏ hơn, tần suất sử dụng kháng thể ít hơn, và tính hữu dụng khi sản xuất và bảo quản hiệu quả hơn. Tuy nhiên, như đã nêu trên đây, nồng độ của kháng thể hoặc protein càng cao, càng khó duy trì hoạt tính và các thông số giải phóng thích hợp của chế phẩm. Cụ thể, các chế phẩm chứa kháng thể và protein nồng độ cao thường có mức độ kết tụ và độ nhớt của protein gia tăng, điều này dẫn đến làm giảm hiệu lực chung của kháng thể hoặc protein, và tính ổn định khi sản xuất thấp hơn và tính ổn định khi bảo quản kém hơn. Do các vấn đề liên quan đến chế phẩm chứa protein hoặc kháng thể nồng độ cao, rất ít chế phẩm được dụng như vậy được phát triển. Cần tạo ra các chế phẩm chứa kháng thể và protein với nồng độ cao, có tính ổn định cao, chế phẩm này có hiệu lực, tính ổn định, độ nhớt, nồng độ mol/kg nước dung

dịch và độ pH thích hợp.

Một loại protein trong chế phẩm với nồng độ cao như vậy là protein dung hợp thụ thể yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (vascular endothelial growth factor: VEGF). Các protein dung hợp thụ thể VEGF được sử dụng để phong bế chức năng của VEGF trong nhiều chế phẩm dùng cho mắt, ví dụ, EYLEA® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.). Các chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF nồng độ cao có thể cho phép thời gian tiêm vào mắt ngắn hơn, thể tích tiêm nhỏ hơn, số lần tiêm trong mỗi liệu trình sử dụng có thể ít hơn và việc sản xuất và bảo quản hiệu quả hơn.

Sáng chế nhằm khắc phục một hoặc nhiều vấn đề đã bàn luận trên đây.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các phương án khác nhau được mô tả ở đây đề cập đến chế phẩm chứa protein nồng độ cao (ví dụ, chế phẩm thích hợp để sử dụng trong thủy tinh thể), và cụ thể là các chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF) nồng độ cao. Các chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF nồng độ cao tạo ra nhiều lợi ích về điều trị và kinh tế, bao gồm hiệu lực được dụng, tính ổn định khi sản xuất và bảo quản trong thời gian dài, và độ nhớt và độ pH thích hợp với việc tiêm vào mắt. Các chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF nồng độ cao cũng cho phép thể tích sử dụng cho mắt được giảm đi, lợi ích về việc tránh được các tác dụng không mong muốn đối với thể tích hạn chế của mắt.

Các phương án của sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF, chất đệm, chất ổn định nhiệt, chất làm giảm độ nhớt, và chất hoạt động bề mặt. Theo các phương án khác, chế phẩm này không chứa chất làm giảm độ nhớt. Các chế phẩm của sáng chế có độ pH và độ nhớt thích hợp dùng để tiêm, và cụ thể là tiêm vào mắt để điều trị.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề xuất chế phẩm được chứa protein dung hợp thụ thể VEGF với nồng độ ít nhất 41 mg/ml hoặc nồng độ chứa liều đơn của protein dung hợp thụ thể VEGF (được bàn luận ở đây) trong thể tích nhỏ hơn khoảng 100 μ l, nhỏ hơn khoảng 50 μ l, khoảng 50 μ l, khoảng 57 μ l, khoảng 60 μ l, khoảng 70 μ l, hoặc khoảng 75 μ l, của chất đệm, tùy ý, chất ổn định nhiệt và/hoặc chất làm giảm độ nhớt, và chất hoạt động bề mặt, trong đó chế phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,8 (ví dụ, 5,8).

Theo một phương án của sáng chế, nồng độ của protein dung hợp thụ thể VEGF bằng khoảng 30 mg/ml, 60 mg/ml, 114 mg/ml, 120 mg/ml hoặc 140 mg/ml.

Theo một phương án của sáng chế, chất hoạt động bề mặt có thể là chất hoạt động bề mặt không ion (ví dụ, với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,02% đến khoảng 0,1%; hoặc bằng khoảng 0,03% (trọng lượng/thể tích)). Theo một phương án của sáng chế, chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt không ion có gốc polyoxyetylen, ví dụ, polysorbat 20 (PS20), polysorbat 80 (PS80), poloxame 188, polyetylen glycol 3350 hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án của sáng chế, chất đệm là chất đệm trên cơ sở histidin (ví dụ, 10mM hoặc 20mM), như histidin, histidin HCl hoặc histidin axetat; chất đệm trên cơ sở phosphat, như natri phosphat (ví dụ, 10mM); chất đệm trên cơ sở axetat, như natri axetat và axit axetic, hoặc chất đệm trên cơ sở xitrat, như natri xitrat hoặc axit xitric. Theo một phương án của sáng chế, nếu chất đệm là chất đệm phosphat, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,7 đến khoảng 8,0, từ khoảng 5,8 đến khoảng 8,0, từ khoảng 5,7 đến khoảng 7,0, từ khoảng 5,8 đến khoảng 7,0, từ khoảng 5,9 đến khoảng 7,0 hoặc từ khoảng 6,0 đến khoảng 7,0; nếu chất đệm là chất đệm histidin, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,5; nếu chất đệm là chất đệm xitrat, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 3,0 đến khoảng 6,2 hoặc từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,0; nếu chất đệm là chất đệm axetat, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 3,7 đến khoảng 5,6 hoặc từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,0.

Theo một phương án của sáng chế, chất ổn định nhiệt là đường, như sucroza (ví dụ, với nồng độ khoảng 2,5%, 5% hoặc 8%, 10% hoặc 20% (trọng lượng/thể tích), ví dụ, nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 20%), manitol, sorbitol, hoặc trehaloza; L-prolin (ví dụ, với nồng độ khoảng 2%, 3% hoặc 4% (trọng lượng/thể tích)); glyxin (ví dụ, với nồng độ khoảng 50mM), glyxerol, taurin (ví dụ, với nồng độ khoảng 50mM) hoặc axit propan sulfonic (ví dụ, với nồng độ khoảng 50mM) hoặc tổ hợp bất kỳ của các hợp chất trên đây.

Theo một số phương án của sáng chế, chế phẩm dược theo sáng chế chứa chất làm giảm độ nhớt, ví dụ, arginin hydroclorua (ví dụ, L-arginin monohydroclorua) (ví dụ, nồng độ 50mM), lysin, natri clorua (ví dụ, nồng độ 40mM hoặc 50mM), hoặc magie clorua. Ngoài ra, theo các phương án khác, chế phẩm của sáng chế loại trừ cụ thể gần như toàn bộ, nếu không phải là toàn bộ, các chất làm giảm độ nhớt.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm được theo sáng chế chứa, bao gồm hoặc chủ yếu bao gồm các thành phần với tỷ lệ như trong chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm từ A đến KKKK như được nêu trong bản mô tả này.

Theo các khía cạnh của sáng chế, chế phẩm được theo sáng chế có thể chứa protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept hoặc conbercept) với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 41 mg/ml đến khoảng 275 mg/ml, từ khoảng 80 mg/ml đến khoảng 275 mg/ml, từ khoảng 140 mg/ml đến khoảng 150 mg/ml, từ khoảng 140 mg/ml đến khoảng 159 hoặc 160 mg/ml; bao gồm cả khoảng 60 mg/ml, khoảng 80 mg/ml, khoảng 100 mg/ml, khoảng 113,3 mg/ml, khoảng 114,3 mg/ml, khoảng 120 mg/ml, khoảng 133,3 mg/ml, khoảng 140 mg/ml, khoảng 150 mg/ml, khoảng 200 mg/ml hoặc khoảng 250 mg/ml. Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF với nồng độ khoảng 40 mg/ml.

Một số khía cạnh của chế phẩm được theo sáng chế chứa chất ổn định nhiệt với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 2% (trọng lượng/thể tích) đến khoảng 9% (trọng lượng/thể tích) hoặc từ khoảng 4% (trọng lượng/thể tích) đến khoảng 9% (trọng lượng/thể tích), với điều kiện là khi chất ổn định nhiệt là taurin hoặc axit propan sulfonic, chất ổn định này có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25mM đến khoảng 100mM, chất hoạt động bề mặt có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,02% (trọng lượng/thể tích) đến khoảng 0,1% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, khoảng 0,03%), và chất đệm có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 5mM đến khoảng 15mM.

Protein dung hợp thụ thể VEGF có thể có các đặc điểm, ví dụ:

- được mã hóa bằng trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc các nucleotit từ 79 đến 1374 hoặc từ 79 đến 1371 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1;
- chứa các axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc các axit amin từ 27 đến 457 hoặc từ 27 đến 458 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2;
- chứa:
 - (1) thành phần VEGFR1 bao gồm các axit amin từ 27 đến 129 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2;
 - (2) thành phần VEGFR2 bao gồm các axit amin từ 130 đến 231 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2;

(3) thành phần multime hóa ("FcΔC1(a)") bao gồm các axit amin từ 232 đến 457 hoặc 458 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 (các axit amin ở đầu tận cùng C của trình tự SEQ ID NO: 2, nghĩa là K458, có thể được đưa vào hoặc không được đưa vào protein dung hợp thụ thể VEGF). Cần lưu ý rằng các axit amin từ 1 đến 26 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 là trình tự tín hiệu;

- chứa miền tương tự globin miễn dịch (Ig) 2 của thụ thể VEGF thứ nhất (ví dụ, VEGFR1) và miền Ig 3 của thụ thể VEGF thứ hai (ví dụ, VEGFR2), tùy ý còn bao gồm miền Ig 4 của thụ thể VEGF thứ hai (ví dụ, VEGFR2) và thành phần multime hóa (ví dụ, miền Fc của IgG);
- là conbercept; hoặc
- là aflibercept.

VEGF Trap

atggtcagctactgggacaccggggtcctgctgtgcgcgctgctcagctgtctgcttctc
acaggatctagtccggaagtgataccggtagaccttctgtagagatgtacagtgaatc
cccgaattatacatgactgaaggaaggagctcgtcattccctgccgggttacgtca
cctaacatcactgttactttaaaaaagttccacttgacactttgatccctgatggaaaa
cgcataatctgggacagtagaaaagggttcacatcatcaaatgcaacgtacaaagaaata
gggcttctgacctgtgaagcaacagtcaatgggcatttgtataagacaaactatctcaca
catcgacaaaccaatacatagatgtggttctgagtcctcatggaattgaacta
tctgttgagaaaagctgtcttaattgtacagcaagaactgaactaaatgtggggatt
gacttcaactgggaatacccttctcgaagcatcagcataaagaaactgtaaaccgagac
ctaaaaaccagctctgggagtgagatgaagaaattttgagcaccttaactatagatgt
gtaaccgggagtgaccaaggattgtacacctgtgcagcatccagtgggctgatgaccaag
aagaacagcacattgtcagggtccatgaaaaggacaaaactcacacatgccaccgtgc
ccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctcttcccccaaaaccaaggac
accctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaa
gacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca
aagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg
caccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaagccctccca
gccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac
accctgccccatcccggtgatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtc
aaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaac

aactacaagaccacgcctcccgctggactccgacggctcctctctctacagcaag
ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcat
gaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaata

(SEQ ID NO: 1)

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI
PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVN
GHLKYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNW
EYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGL
MTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 2)

Các axit amin từ 1 đến 26 = Trình tự tín hiệu

Các axit amin từ 27 đến 129 = Flt1-D2 (VEGFR1-D2)

Các axit amin từ 130 đến 231 = Flk1-D3 (VEGFR2-D3)

Các axit amin từ 232 đến 458 = FcΔC1

Theo phương án khác của sáng chế, sáng chế đề xuất đồ chứa để đựng dung dịch nước chứa chất đệm được đựng với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 5mM đến khoảng 25mM, chất ổn định nhiệt được đựng với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 4% (trọng lượng/thể tích) đến khoảng 9% (trọng lượng/thể tích), chất hoạt động bề mặt được đựng với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,02% (trọng lượng/thể tích) đến khoảng 0,1% (trọng lượng/thể tích), và protein dung hợp thụ thể VEGF với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 41 mg/ml đến khoảng 275 mg/ml. Khi chất ổn định nhiệt chứa taurin hoặc axit propan sulfonic, taurin hoặc axit propan sulfonic này có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25mM đến khoảng 100mM. Dung dịch nước có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,8, và có thể nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,2 (ví dụ, 5,8). Theo một số khía cạnh, đồ chứa là lọ hoặc bơm tiêm. Theo các khía cạnh khác, dung dịch nước không chứa muối vô cơ. Khi chất ổn định nhiệt là đường, đường này có thể là sucroza, manitol, sorbitol hoặc trehaloza, và có thể có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ

khoảng 4% (trọng lượng/thể tích) đến 9% (trọng lượng/thể tích); chất hoạt động bề mặt có thể là chất hoạt động bề mặt không ion, và có thể chứa gốc polyoxyetylen, như polysorbat 20, polysorbat 80, poloxame 188, hoặc polyetylen glycol 3350, với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,02% đến khoảng 0,1% trọng lượng theo thể tích (trọng lượng/thể tích), và thông thường hơn là nằm trong khoảng từ 0,02% đến khoảng 0,04% (trọng lượng/thể tích). Theo một phương án của sáng chế, protein dung hợp thụ thể VEGF được mã hóa bằng trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc các nucleotit từ 79 đến 1374 hoặc từ 79 đến 1371 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1; bao gồm các axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc các axit amin từ 27 đến 457 hoặc từ 27 đến 458 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2; chứa (1) thành phần VEGFR1 bao gồm các axit amin từ 27 đến 129 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2; (2) thành phần VEGFR2 bao gồm các axit amin từ 130 đến 231 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2; và (3) thành phần multime hóa ("Fc Δ C1(a)") bao gồm các axit amin từ 232 đến 457 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 (các axit amin ở đầu tận cùng C của trình tự SEQ ID NO: 2, nghĩa là K458, có thể được đưa vào hoặc không được đưa vào protein dung hợp thụ thể VEGF); bao gồm miền tương tự globin miễn dịch (Ig) 2 của thụ thể VEGF thứ nhất (ví dụ, VEGFR1) và miền Ig 3 của thụ thể VEGF thứ hai (ví dụ, VEGFR2), tùy ý còn bao gồm miền Ig 4 của thụ thể VEGF thứ hai (ví dụ, VEGFR2) và thành phần multime hóa (ví dụ, miền Fc của IgG); là conbercept hoặc là aflibercept.

Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm được chứa protein dung hợp thụ thể VEGF trong chất dẫn thuốc dạng lỏng, trong đó chất dẫn thuốc dạng lỏng này có độ nhớt nằm trong khoảng từ khoảng 10 cP đến khoảng 15 cP ở nhiệt độ 20°C, thông thường hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 10 cP đến khoảng 13 cP ở nhiệt độ 20°C, và thông thường nhất là nằm trong khoảng từ khoảng 11 cP đến khoảng 12 cP ở nhiệt độ 20°C (ví dụ, khoảng 6,0, 7,3, 11,5 hoặc 12,0 cP ở nhiệt độ 20°C). Theo một phương án của sáng chế, độ nhớt nằm trong khoảng từ khoảng 12 cP đến khoảng 15 cP ở nhiệt độ 20°C. Độ pH của chế phẩm có thể nằm trong khoảng từ khoảng 5,8 đến khoảng 6,5 (ví dụ, khoảng 5,8). Trong một số trường hợp, chế phẩm này không chứa chất làm giảm độ nhớt, ví dụ, không chứa arginin hydroclorua, lysin, natri clorua, hoặc magie clorua. Trong các trường hợp khác, chế phẩm này chứa histidin hydroclorua 10mM hoặc histidin-axetat 10mM. Đường có thể là đường

sucroza, manitol, sorbitol hoặc trehaloza, và có thể có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 4% (trọng lượng/thể tích) đến 9% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, khoảng 5%); chất hoạt động bề mặt có thể là chất hoạt động bề mặt không ion, và có thể bao gồm gốc polyoxyetylen, như polysorbat 20, polysorbat 80, poloxame 188, hoặc polyetylen glycol 3350, với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,02% đến khoảng 0,1% trọng lượng theo thể tích (trọng lượng/thể tích), và thông thường hơn là nằm trong khoảng từ 0,02% đến khoảng 0,04% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, 0,03%). Ngoài ra, chế phẩm có thể còn chứa chất ổn định nhiệt được chọn từ taurin hoặc axit propan sulfonic với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25mM đến khoảng 100mM, và thông thường hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 50mM đến khoảng 70mM. Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF, như aflibercept, (ví dụ, với nồng độ nằm trong khoảng 41 đến 275 mg/ml, khoảng 50 mg/ml, khoảng 100 mg/ml, khoảng 115 mg/ml, khoảng 125 mg/ml, khoảng 150 mg/ml, khoảng 200 mg/ml hoặc nồng độ bất kỳ trong số các nồng độ “cao” được bàn luận ở đây), chất đệm trên cơ sở histidin với nồng độ khoảng 10mM, sucroza với nồng độ khoảng 5% (trọng lượng/thể tích), chất hoạt động bề mặt không ion với nồng độ khoảng 0,03% (trọng lượng/thể tích) như polysorbat, ví dụ, polysorbat 20, và arginin, L-arginin hoặc L-arginin monohydroclorua với nồng độ khoảng 50mM, có độ pH bằng khoảng 5,8. Theo một phương án của sáng chế, protein dung hợp thụ thể VEGF được mã hóa bằng trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc các nucleotit từ 79 đến 1374 hoặc từ 79 đến 1371 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1; bao gồm các axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc các axit amin từ 27 đến 457 hoặc từ 27 đến 458 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2; chứa (1) thành phần VEGFR1 bao gồm các axit amin từ 27 đến 129 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2; (2) thành phần VEGFR2 bao gồm các axit amin từ 130 đến 231 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2; và (3) thành phần multime hóa ("FcΔC1(a)") bao gồm các axit amin từ 232 đến 457 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 (các axit amin ở đầu tận cùng C của trình tự SEQ ID NO: 2, nghĩa là K458, có thể được đưa vào hoặc không được đưa vào các protein dung hợp thụ thể VEGF); chứa miền tương tự globin miễn dịch (Ig) 2 của thụ thể VEGF thứ nhất (ví dụ, VEGFR1) và miền Ig 3 của thụ thể VEGF thứ hai (ví dụ, VEGFR2), tùy ý còn bao gồm miền Ig 4 của thụ thể VEGF thứ hai (ví dụ, VEGFR2) và thành phần multime hóa (ví dụ, miền Fc của IgG); là conbercept hoặc là aflibercept.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm được chứa protein dung hợp thụ thể VEGF với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 80 mg/ml đến khoảng 275 mg/ml trong chất đệm được dụng. Trong một số trường hợp, các chế phẩm được ổn định cũng có thể chứa taurin hoặc axit propan sulfonic. Các chế phẩm này có thể ổn định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2°C đến khoảng 8°C trong khoảng thời gian từ 24 đến 36 tháng. Trong một số trường hợp, protein dung hợp thụ thể VEGF có sự tăng lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao ở mức nhỏ hơn khoảng 5%, và thông thường hơn, sự tăng lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao ở mức nhỏ hơn khoảng 4,5%, sự tăng lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao ở mức nhỏ hơn khoảng 4,0%, sự tăng lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao ở mức nhỏ hơn khoảng 3,5%, sự tăng lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao ở mức nhỏ hơn khoảng 3,0%, sự tăng lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao ở mức nhỏ hơn khoảng 2,5%, sự tăng lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao ở mức nhỏ hơn khoảng 2,0 và/hoặc sự tăng lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao ở mức nhỏ hơn khoảng 1,5%, khi được bảo quản ở các nhiệt độ này và trong khoảng thời gian nêu trên. Trong các trường hợp khác, protein dung hợp thụ thể VEGF sự tăng lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao ở mức nhỏ hơn từ 2,0% đến 3,0% khi các chế phẩm được bảo quản ở các nhiệt độ này và trong khoảng thời gian nêu trên.

Các phương án ở đây cũng có thể bao gồm các chế phẩm được của sáng chế chứa aflibercept, dung dịch đệm độ pH, đường và chất hoạt động bề mặt, trong đó aflibercept có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 41 mg/ml đến khoảng 275 mg/ml. Ngoài ra, các phương án có thể là chế phẩm được dạng lỏng ổn định chứa conbercept, dung dịch đệm độ pH, đường và chất hoạt động bề mặt, trong đó conbercept có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 41 mg/ml đến khoảng 275 mg/ml. Các chế phẩm được dạng lỏng ổn định cũng có thể chứa taurin hoặc axit propan sulfonic. Theo một số khía cạnh, aflibercept hoặc conbercept có mặt với nồng độ bằng 80 mg/ml hoặc 150 mg/ml. Theo các khía cạnh khác, các chế phẩm không chứa muối vô cơ, ví dụ, natri clorua.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến bơm tiêm vô khuẩn sao cho các bơm tiêm này được nạp sẵn dung dịch nước có nồng độ aflibercept, conbercept bằng 80 mg/ml, nồng độ histidin hydroclorua, histidin axetat hoặc natri phosphat bằng 10mM, nồng độ sucroza, manitol, sorbitol hoặc trehaloza bằng 5% (trọng lượng/thể

tích), nồng độ polysorbat 20, polysorbat 80, poloxame 188, hoặc polyetylen glycol 3350 bằng 0,03% (trọng lượng/thể tích), và nồng độ natri clorua bằng 40mM. Các khía cạnh ở đây bao gồm việc bổ sung thêm taurin hoặc axit propan sulfonic với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25mM đến khoảng 100mM, và thông thường hơn là từ khoảng 50mM đến khoảng 70mM. Theo một số khía cạnh, các bơm tiêm được nạp sẵn dung dịch nước có nồng độ aflibercept, conbercept bằng 80 mg/ml, nồng độ histidin HCl, histidin axetat hoặc natri phosphat bằng 10mM, nồng độ sucroza, manitol, sorbitol hoặc trehaloza bằng 8% (trọng lượng/thể tích), và nồng độ polysorbat 20, polysorbat 80, poloxame 188, hoặc polyetylen glycol 3350 bằng 0,03% (trọng lượng/thể tích). Các khía cạnh ở đây bao gồm việc bổ sung thêm taurin hoặc axit propan sulfonic với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25mM đến khoảng 100mM, và thông thường hơn là từ khoảng 50mM đến khoảng 70mM. Theo các khía cạnh khác nữa, các bơm tiêm được nạp sẵn dung dịch nước có nồng độ aflibercept, conbercept bằng 150 mg/ml, nồng độ histidin hydroclorua, histidin axetat, hoặc natri phosphat bằng 10mM, nồng độ sucroza, manitol, sorbitol hoặc trehaloza bằng 5% (trọng lượng/thể tích), nồng độ polysorbat 20, polysorbat 80, poloxame 188, hoặc polyetylen glycol 3350 bằng 0,03% (trọng lượng/thể tích) và nồng độ natri clorua bằng 40mM, với độ pH bằng khoảng 6,2. Các khía cạnh ở đây có thể bao gồm việc bổ sung thêm taurin hoặc axit propan sulfonic. Theo các khía cạnh khác nữa, các bơm tiêm được nạp sẵn dung dịch nước có nồng độ aflibercept, conbercept bằng 150 mg/ml, nồng độ histidin hydroclorua, histidin axetat, hoặc natri phosphat bằng 10mM, nồng độ sucroza, manitol, sorbitol hoặc trehaloza bằng 8% (trọng lượng/thể tích), và nồng độ polysorbat 20, polysorbat 80, poloxame 188, hoặc polyetylen glycol 3350 bằng 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH bằng khoảng 6,2 và dung dịch nước này không chứa muối vô cơ. Các khía cạnh có thể còn bao gồm taurin hoặc axit propan sulfonic với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25mM đến khoảng 100mM, và thông thường hơn, từ khoảng 50mM đến khoảng 70mM. Theo các khía cạnh khác nữa, các bơm tiêm được nạp sẵn dung dịch nước có nồng độ aflibercept hoặc conbercept bằng 150 mg/ml, nồng độ natri axetat hoặc axit axetic bằng 10mM, nồng độ glyxerol bằng 5% (trọng lượng/thể tích) và nồng độ polysorbat 20, polysorbat 80, poloxame 188, hoặc polyetylen glycol 3350 bằng 0,03% (trọng lượng/thể tích) và nồng độ natri clorua bằng 40mM, với độ pH bằng khoảng 6,2. Theo các khía cạnh khác nữa, các bơm tiêm được

nap sẵn dung dịch nước có nồng độ aflibercept hoặc conbercept bằng 150 mg/ml, nồng độ natri axetat hoặc axit axetic bằng 10mM, nồng độ glyxerol bằng 8% (trọng lượng/thể tích), và nồng độ polysorbat 20, polysorbat 80, poloxame 188, hoặc polyetylen glycol 3350 bằng 0,03% (trọng lượng/thể tích) và nồng độ natri clorua bằng 40mM, với độ pH bằng khoảng 6,2.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm bất kỳ được nêu ở đây bao gồm bước kết hợp mỗi thành phần của chế phẩm thành một hỗn hợp. Phương pháp này có thể bao gồm bước cho chế phẩm tạo thành vào lọ hoặc dụng cụ tiêm. Hỗn hợp bất kỳ là sản phẩm của phương pháp này cũng tạo thành một phần của sáng chế. Ví dụ, các phương án ở đây cũng bao gồm các phương pháp bào chế chế phẩm bằng cách kết hợp chất đệm trên cơ sở histidin, chất đệm trên cơ sở xitrat, chất đệm trên cơ sở axetat hoặc chất đệm trên cơ sở phosphat, với sucroza, polysorbat 20 và protein dung hợp thụ thể VEGF; và, tùy ý, một hoặc nhiều thành phần bổ sung, ví dụ, như được bàn luận ở đây. Trong một số trường hợp, chế phẩm được bào chế còn chứa taurin hoặc axit propan sulfonic, nhưng nếu không chứa taurin hoặc axit propan sulfonic, chế phẩm này cũng có thể không chứa muối vô cơ. Theo các khía cạnh của sáng chế, sucroza có mặt với nồng độ tính theo trọng lượng/thể tích nằm trong khoảng từ khoảng 4% đến khoảng 10%, polysorbat 20 có mặt với nồng độ tính theo trọng lượng/thể tích nằm trong khoảng từ khoảng 0,02% đến khoảng 0,1%, và protein dung hợp thụ thể có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 41 mg/ml đến khoảng 275 mg/ml. Khi chế phẩm chứa taurin hoặc axit propan sulfonic, thành phần này có mặt với nồng độ, ví dụ, nằm trong khoảng từ khoảng 25mM đến khoảng 100mM, nhưng cũng có thể có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 50mM đến 70mM. Phương pháp này có thể bao gồm bước nạp chế phẩm bào chế được với thể tích định trước vào bơm tiêm vô khuẩn sao cho thể tích này có liều dùng của protein dung hợp thụ thể VEGF nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 10mg.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp sử dụng chế phẩm của sáng chế cho đối tượng (ví dụ, người), bao gồm bước tiêm trong mắt (ví dụ, tiêm trong thủy tinh thể) chế phẩm này vào mắt của đối tượng. Sáng chế cũng mô tả phương pháp sử dụng chế phẩm của sáng chế cho đối tượng (ví dụ, người) bao gồm bước cấy thuốc cấy trong thủy tinh thể chứa chế phẩm của sáng chế vào thủy tinh thể của đối tượng.

Các phương án ở đây còn bao gồm phương pháp điều trị rối loạn ở mắt do sự

tạo mạch, ví dụ, bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (thể ướt), bệnh phù điểm vàng sau khi tắc tĩnh mạch võng mạc, tắc tĩnh mạch võng mạc (retinal vein occlusion: RVO), bệnh tắc tĩnh mạch võng mạc trung tâm (central retinal vein occlusion: CRVO), bệnh tắc tĩnh mạch võng mạc nhánh (branch retinal vein occlusion: BRVO), bệnh phù điểm vàng do đái tháo đường (diabetic macular edema: DME), bệnh tân sinh mạch ở màng mạch (choroidal neovascularization: CNV), bệnh tân sinh mạch ở mống mắt, bệnh tăng nhãn áp tân mạch, tình trạng xơ hóa sau phẫu thuật trong bệnh tăng nhãn áp, bệnh võng mạc thủy tinh thể tăng sinh (proliferative vitreoretinopathy: PVR), bệnh tân sinh mạch ở gai thị, bệnh tân sinh mạch ở giác mạc, bệnh tân sinh mạch ở võng mạc, bệnh tân sinh mạch ở thủy tinh thể, bệnh màng máu, bệnh mộng thịt ở mắt, bệnh võng mạc do mạch máu hoặc bệnh võng mạc do đái tháo đường (ví dụ, bệnh võng mạc do đái tháo đường thể không tăng sinh và/hoặc bệnh võng mạc do đái tháo đường thể tăng sinh) ở đối tượng cần điều trị bằng cách tiêm trong mắt protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept hoặc conbercept) với lượng ít nhất khoảng 2mg (ví dụ, 4mg, 6mg hoặc 8mg) vào mắt của đối tượng cần điều trị, ví dụ, chế phẩm bất kỳ được nêu ở đây. Theo một phương án của sáng chế, thể tích tiêm nhỏ hơn hoặc bằng 100 microlít (ví dụ, 100 microlít, 50 microlít hoặc 57 microlít). Phương pháp này bao gồm bước tiêm qua đường trong thủy tinh thể dung dịch nước đã trộn sẵn chứa protein dung hợp thụ thể VEGF với nồng độ nằm trong khoảng từ 41 mg/ml đến khoảng 275 mg/ml, đường được dụng, chất đệm được dụng, và chất hoạt động bề mặt được dụng. Các phương pháp điều trị bao gồm bước sử dụng dung dịch nước đã trộn sẵn không cần pha loãng. Theo các khía cạnh của sáng chế, dung dịch nước đã trộn sẵn có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 6,0 đến khoảng 6,5, và có độ nhớt nằm trong khoảng từ khoảng 10 cP đến 13 cP.

Theo các khía cạnh của phương pháp điều trị, protein dung hợp thụ thể VEGF chứa VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) được mã hóa bằng trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 1, các axit amin từ 27 đến 129 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, thành phần VEGFR2 bao gồm các axit amin từ 130 đến 231 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc thành phần multime hóa bao gồm các axit amin từ 232 đến 457 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một phương án của sáng chế, protein dung hợp thụ thể VEGF là aflibercept hoặc conbercept.

Các phương án khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng khi xem xét phần mô tả chi

tiết kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các khía cạnh, dấu hiệu và ưu điểm nêu trên và các khía cạnh, dấu hiệu và ưu điểm khác của các phương án được bộc lộ ở đây sẽ trở nên rõ ràng hơn đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa vào các hình vẽ kèm theo.

Fig.1A là biểu đồ xác định tính ổn định của protein dung hợp thụ thể VEGF (aflibercept) trong bốn chế phẩm khác nhau (B, H, D và G) trong khoảng thời gian 36 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Tính ổn định của protein dung hợp thụ thể VEGF được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng loại trừ theo kích cỡ (size-exclusion ultra-performance liquid chromatography: SE-UPLC) để xác định sự tạo ra các hợp chất có trọng lượng phân tử cao (high molecular weight: HMW) (một dấu hiệu của sự thoái biến protein).

Fig.1B cũng là biểu đồ xác định độ ổn định của protein dung hợp thụ thể VEGF (aflibercept) trong bốn chế phẩm (B, H, D và G) trong khoảng thời gian 36 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Tính ổn định của protein dung hợp thụ thể VEGF được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp SE-UPLC để xác định tỷ lệ % của các hợp chất chính trong mỗi chế phẩm.

Fig.1C là biểu đồ cột thể hiện mức độ tạo ra các biến thể mang điện tích của protein dung hợp thụ thể VEGF trong bốn chế phẩm (B, H, D và G) trong khoảng thời gian 36 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Hàm lượng của các hợp chất có tính axit được thử nghiệm khi sản xuất (0,0), 12 tháng, 24 tháng và 36 tháng bằng cách sử dụng phương pháp hội tụ đẳng điện mao quản bằng hình ảnh (imaged capillary isoelectric focusing: iCIEF).

Fig.1D là biểu đồ cột thể hiện mức độ tạo ra các biến thể mang điện tích của protein dung hợp thụ thể VEGF trong bốn chế phẩm (B, H, D và G) trong khoảng thời gian 36 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Việc xác định các hợp chất chính được thử nghiệm ở thời điểm sản xuất (0,0), 12 tháng, 24 tháng và 36 tháng bằng cách sử dụng phương pháp iCIEF.

Fig.2A là biểu đồ thể hiện tính ổn định của protein dung hợp thụ thể VEGF (aflibercept) nồng độ 150 mg/ml trong chế phẩm chứa natri phosphat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích) và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích) có độ pH =

6,2 khi có mặt và không có mặt L-arginin monohydroclorua trong khoảng thời gian 28 ngày ở nhiệt độ 37°C. Tính ổn định của protein dung hợp thụ thể VEGF được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp SE-UPLC để xác định mức độ tạo ra các hợp chất HMW.

Fig.2B là biểu đồ thể hiện tính ổn định của protein dung hợp thụ thể VEGF nồng độ 150 mg/ml trong chế phẩm chứa natri phosphat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích) và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích) có độ pH = 6,2 khi có mặt và không có mặt L-arginin monohydroclorua trong khoảng thời gian 28 ngày ở nhiệt độ 37°C. Tính ổn định của protein dung hợp thụ thể VEGF được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp SE-UPLC để xác định tỷ lệ % của các hợp chất chính trong mỗi chế phẩm.

Fig.3A là biểu đồ cột thể hiện độ nhớt của chế phẩm được đệm natri phosphat 10mM có nồng độ protein dung hợp thụ thể VEGF 155 mg/ml và không chứa muối, arginin 100mM, arginin 200mM, lysin 50mM, lysin 200mM, natri clorua 50mM hoặc natri clorua 100mM. Độ nhớt được xác định theo đơn vị cP ở nhiệt độ 20°C.

Fig.3B là biểu đồ cột thể hiện độ nhớt của các chế phẩm được đệm histidin 10mM có nồng độ protein dung hợp thụ thể VEGF 155 mg/ml và không chứa muối, arginin 100mM, arginin 200mM, lysin 50mM, lysin 200mM, natri clorua 50mM hoặc natri clorua 100mM. Độ nhớt được xác định theo đơn vị cP ở nhiệt độ 20°C.

Fig.3C là biểu đồ thể hiện độ nhớt của protein dung hợp thụ thể VEGF với nồng độ khác nhau trong các điều kiện bào chế khác nhau (khi có mặt hoặc không có mặt arginin hydroclorua 50mM). Độ nhớt được xác định theo đơn vị cP ở nhiệt độ 20°C.

Fig.4A là biểu đồ thể hiện tính ổn định của protein dung hợp thụ thể VEGF nồng độ 150 mg/ml trong natri phosphat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), có độ pH = 6,2 khi có mặt và không có mặt L-arginin monohydroclorua 50mM trong 12 tháng ở nhiệt độ 5°C. Protein dung hợp thụ thể VEGF có mặt với nồng độ 150 mg/ml. Tính ổn định của protein dung hợp thụ thể VEGF được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp SE-UPLC để xác định mức độ tạo ra các hợp chất HMW.

Fig.4B là biểu đồ thể hiện tính ổn định của protein dung hợp thụ thể VEGF nồng độ 150 mg/ml trong natri phosphat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và

polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), độ pH = 6,2 khi có mặt và không có mặt L-arginin monohydroclorua 50mM trong 12 tháng ở nhiệt độ 5°C. Protein dung hợp thụ thể VEGF có mặt với nồng độ 150 mg/ml. Tính ổn định của protein dung hợp thụ thể VEGF được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp SE-UPLC để xác định tỷ lệ % của các hợp chất chính trong mỗi chế phẩm.

Fig.5 là đồ thị thể hiện độ nhớt của các chế phẩm trong hai điều kiện chất đệm ở nhiệt độ 20°C, chất đệm phosphat 10mM hoặc chất đệm histidin 10mM. Nồng độ của protein dung hợp thụ thể VEGF thay đổi trong khoảng từ 10 mg/ml đến 170 mg/ml. Độ nhớt được xác định theo đơn vị mPa·S.

Fig.6 thể hiện màn hình tán xạ ánh sáng động học của một số điều kiện bào chế khác nhau, mỗi điều kiện có nồng độ protein nằm trong khoảng từ 2 đến 10 mg/ml. Thông số tương tác khuếch tán cho thấy rằng taurin và PSA (axit propan sulfonic) có tác dụng cải thiện thông số Kd.

Fig.7 là đồ thị thể hiện kết quả theo dõi tỷ lệ % của các hợp chất có trọng lượng phân tử cao (HMW) trong các chế phẩm từ F1 đến F9 (các chế phẩm từ WW đến EEE) theo thời gian được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng loại trừ theo kích cỡ (SE-UPLC) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 5°C trong 6 tháng. Các chế phẩm từ F1 đến F9 được nêu trong Bảng 7-1 ở đây.

Fig.8 (A-B) thể hiện kết quả xác định tỷ lệ % của các hợp chất có trọng lượng phân tử cao bằng phương pháp SE-UPLC, sau khi bảo quản ở nhiệt độ 5°C trong thời gian 3 tháng (hình A) hoặc ở nhiệt độ 37°C trong 28 ngày (hình B). Các chế phẩm từ F1 đến F4 (EEE, SSS, CCC (140 mg/ml) và TTT) được nêu trong Bảng 8-1 dưới đây.

Fig.9 thể hiện độ nhớt (tính theo cp) của các chế phẩm từ F1 đến F12, ở nhiệt độ 20°C, ở thời điểm ban đầu. Các chế phẩm từ F1 đến F12 được nêu trong Bảng A dưới đây.

Bảng A. Các chế phẩm từ F1 đến F12

Chế phẩm #	VEGF Trap (mg/ml)	Chất đệm	Các tá dược khác	Các tá dược sàng lọc (mM)
F1 (GGG)	140	Histidin 20mM, độ pH = 5,8	Sucroza 5%, Polysorbat 20 0,03%	Natri sulfat 50mM

F2 (HHH)	140	Histidin 20mM, độ pH = 5,8	Sucroza 5%, Polysorbat 20 0,03%	Natri thioxyanat 50mM
F3 (III)	140	Histidin 20mM, độ pH = 5,8	Sucroza 5%, Polysorbat 20 0,03%	Natri xitrat 40mM
F4 (JJJ)	140	Histidin 20mM, độ pH = 5,8	Sucroza 5%, Polysorbat 20 0,03%	Glyxin 50mM
F5 (KKK)	140	Histidin 20mM, độ pH = 5,8	Sucroza 5%, Polysorbat 20 0,03%	Natri clorua 50mM
F6 (LLL)	140	Histidin 20mM, độ pH = 5,8	Sucroza 5%, Polysorbat 20 0,03%	Lysin 50mM
F7 (MMM)	140	Histidin 20mM, độ pH = 5,8	Sucroza 5%, Polysorbat 20 0,03%	Natri aspartat 50mM
F8 (NNN)	140	Histidin 20mM, độ pH = 5,8	Sucroza 5%, Polysorbat 20 0,03%	Natri glutamat 50mM
F9 (OOO)	140	Histidin 20mM, độ pH = 5,8	Sucroza 5%, Polysorbat 20 0,03%	Natri xitrat 50mM + Arginin hydroclorua 50mM
F10 (PPP)	140	Histidin 20mM, độ pH = 5,8	Sucroza 5%, Polysorbat 20 0,03%	Glyxin 50mM + Arginin hydroclorua 50mM
F11 (QQQ)	140	Histidin 20mM, độ pH = 5,8	Sucroza 5%, Polysorbat 20 0,03%	Natri aspartat 50mM + Arginin hydroclorua 50mM
F12 (RRR)	140	Histidin 20mM, độ pH = 5,8	Sucroza 5%, Polysorbat 20 0,03%	Natri glutamat 50mM + Arginin hydroclorua 50mM

Fig.10 thể hiện nồng độ mol/kg nước dung dịch (mmol/kg) của các chế phẩm từ F1 đến F12 (được nêu trong Bảng A ở đây).

Fig.11 (A-B) thể hiện kết quả xác định tỷ lệ % của các hợp chất có trọng lượng phân tử cao trong các chế phẩm từ F1 đến F6 (các chế phẩm GGG, HHH, III, JJJ, LLL

và KKK) theo thời gian, bằng phương pháp SE-UPLC, sau khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong tối đa 28 ngày (hình A) hoặc ở nhiệt độ 5°C trong tối đa 3 tháng (hình B) theo thời gian.

Fig.12 thể hiện kết quả tán xạ ánh sáng động học (hệ số khuếch tán (cm^2/s), bán kính (nm) và tỷ lệ % Pd) ở thời điểm ban đầu của các chế phẩm được thể hiện trong Bảng 9-3 (từ GGG đến RRR).

Fig.13 thể hiện hình ảnh chụp mạch huỳnh quang (FA) và chụp cắt lớp quang học (OCT) ban đầu (thấu kính 30 độ) của hai con thỏ khác nhau (326-OS và 329-OD) trước khi sử dụng aflibercept (OD=*oculus dexter* (mắt phải); OS=*oculus sinister* (mắt trái)). (Hình A) hình ảnh FA của thỏ 326, mắt trái; (hình B) hình ảnh OCT của thỏ 326, mắt trái; (hình C) hình ảnh FA của thỏ 329, mắt phải; (hình D) hình ảnh OCT của thỏ 329, mắt phải.

Fig.14 (từ A đến F) thể hiện quá trình theo thời gian của các hình ảnh FA của thỏ ở thời điểm ngày 1 (hình A), ngày 7 (hình B) và ngày 14 (hình C) và hình ảnh OCT ở thời điểm ngày 1 (hình D), ngày 7 (hình E) và ngày 14 (hình F) của một con thỏ (326-OS) được cho sử dụng chế phẩm được đệm histidin (thấu kính 30 độ) (7 mg/mắt).

Fig.15 (từ A đến H) thể hiện quá trình theo thời gian của các hình ảnh FA của thỏ ở thời điểm 3 tuần (hình A), 4 tuần (hình B), 7 tuần (hình C) và 8 tuần (hình D); và hình ảnh OCT ở thời điểm 3 tuần (hình E), 4 tuần (hình F), 7 tuần (hình G) và 8 tuần (hình H) của một con thỏ (326-OS) được cho sử dụng chế phẩm được đệm histidin (thấu kính 55 độ) (7 mg/mắt).

Fig.16 (từ A đến F) thể hiện quá trình theo thời gian của các hình ảnh FA của thỏ ở thời điểm ngày 1 (hình A), tuần 1 (hình B) và tuần 2 (hình C) và hình ảnh OCT ở thời điểm ngày 1 (hình D), tuần 1 (hình E) và tuần 2 (hình F) của một con thỏ (329-OS) được cho sử dụng chế phẩm được đệm phosphat (thấu kính 30 độ) (7 mg/mắt).

Fig.17 (từ A đến H) thể hiện quá trình theo thời gian của các hình ảnh FA của thỏ ở thời điểm tuần 3 (hình A), tuần 4 (hình B), tuần 7 (hình C) và tuần 8 (hình D) và hình ảnh OCT ở thời điểm tuần 3 (hình E), tuần 4 (hình F), tuần 7 (hình G) và tuần 8 (hình H) của một con thỏ (329-OS) được cho sử dụng chế phẩm được đệm phosphat (thấu kính 55 độ) (7 mg/mắt).

Fig.18 (từ A đến B) thể hiện độ tinh khiết (tỷ lệ % của các hợp chất tự nhiên)

(hình A) và tỷ lệ % của các hợp chất có trọng lượng phân tử cao (HMW) (hình B) trong các chế phẩm từ UUU đến BBBB theo thời gian ở nhiệt độ 37°C (trong tối đa một tháng) (xem Bảng 11-1) khi được phân tích bằng phương pháp SE-UPLC.

Fig.19 (từ A đến E) thể hiện kết quả phân tích tính ổn định và độ tinh khiết của chế phẩm chứa VEGF Trap (aflibercept) nồng độ 114,3 mg/ml được bào chế trong histidin 10mM, độ pH = 5,8, sucroza 5%, polysorbat 20 0,03%, arginin monohydroclorua 50mM bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ để xác định tỷ lệ % của (i) các hợp chất có trọng lượng phân tử cao (HMW) sau khi ủ ở nhiệt độ 5°C hoặc 37°C trong tối đa 2 tháng (hình A) và (ii) các hợp chất chính (đỉnh chính) sau khi ủ ở nhiệt độ 5°C hoặc 37°C trong tối đa 2 tháng (hình B); cũng như bằng phương pháp chụp ảnh dòng tế vi để xác định sự có mặt của chất dạng hạt có kích thước nhỏ hơn mức quan sát được bằng mắt thường sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C trong tối đa 28 ngày (hình C), bằng cách phân tích sự làm mờ ánh sáng của hạt để xác định sự có mặt của chất dạng hạt có kích thước nhỏ hơn mức quan sát được bằng mắt thường sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C trong tối đa 28 ngày (hình D), và bằng kính hiển vi để xác định chất dạng hạt có kích thước nhỏ hơn mức quan sát được bằng mắt thường sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C trong tối đa 28 ngày (hình E).

Fig.20 thể hiện kết quả phân tích tính ổn định và độ tinh khiết của chế phẩm CCC, có nồng độ aflibercept bằng 80, 100, 120 hoặc 140 mg/ml, bằng phương pháp SE-UPLC để xác định tỷ lệ % của các hợp chất có trọng lượng phân tử cao (HMW) sau khi ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C trong tối đa 6 tháng (hình A) hoặc 37°C trong tối đa 28 ngày (hình B).

Fig.21 thể hiện tỷ lệ % mất hoạt tính được thử nghiệm có sự rò rỉ dịch được ức chế hoàn toàn theo thời gian, khi được cho sử dụng 500 microgam hoặc 2mg aflibercept, theo thời gian (thử nghiệm Gehan-Breslow-Wilcoxon ($P = 0,0453$)).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) với nồng độ cao, có các đặc tính chức năng và bảo quản rất tốt được phát triển mặc dù có các rào cản kỹ thuật đáng kể. Ví dụ, phương pháp phổ biến để xác định các tá dược thích hợp cho chế phẩm chứa dược chất polypeptit (như protein dung hợp thụ thể VEGF) là bằng cách đánh giá tính ổn định của polypeptit trong các điều

kiện stress gia tăng, như nhiệt độ cao (ví dụ, 37°C). Các tá dược, không thích hợp trong các điều kiện không có stress (ví dụ, nhiệt độ thấp, như 5°C), sẽ thường gây ra tác dụng không mong muốn, trong một khoảng thời gian ngắn, trong khi ở trong điều kiện stress, ví dụ, sự kết tụ protein. Phương pháp này là phổ biến trong lĩnh vực công nghệ sinh học và dược phẩm do nó xúc tiến việc loại bỏ các tá dược không có khả năng làm ổn định sản phẩm thuốc. Ví dụ, xem tài liệu: Magari, *Assessing Shelf Life Using Real-Time and Accelerated Stability Tests*, Biopharm Intl. 16(11): 36-48 (2003). Trong một số trường hợp, một sản phẩm có thể được giải phóng dựa trên số liệu về tính ổn định được gia tăng, nhưng điều này phải được thực hiện song song với phân tích thời hạn sử dụng trong thời gian thực (không gia tăng). Magari (2003) and FDA, *Guidelines for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics*, Rockville, MD (1987). Tuy nhiên, trong bản mô tả này, ở nhiệt độ 5°C, sự có mặt của arginin trong chế phẩm chứa histidin được làm ổn định, mặc dù sự xuất hiện của arginin có xu hướng làm giảm tính ổn định khi ở trong điều kiện stress nhiệt độ (37°C), xem Fig.8 (A-B). Đặc tính này của các chế phẩm được nêu ở đây sẽ là khó khăn về mặt kỹ thuật trong việc hướng dẫn bác sĩ thực hành không chọn arginin; do đó, không thể chắc chắn rằng bác sĩ thực hành sẽ không chọn arginin làm tá dược. Tuy nhiên, các chế phẩm được nêu ở đây là kết quả thu được từ việc vượt qua các rào cản kỹ thuật như kết quả đạt được với chế phẩm có tính ổn định cao. Chế phẩm chứa VEGF trap trong chất đệm histidin cũng dẫn đến sự giảm độ nhớt có lợi so với kết quả quan sát được với chế phẩm chứa chất đệm phosphat. Do các lỗ kim nhỏ là được ưu tiên để thực hiện việc tiêm trong thủy tinh thể (do cảm giác khó chịu của bệnh nhân và mức độ chấn thương mắt được giảm đi), độ nhớt tương đối thấp sẽ được ưu tiên. Chế phẩm có độ nhớt thấp hơn cần ít lực để đẩy chế phẩm qua kim hơn, do đó làm cho việc tiêm chế phẩm qua kim dễ dàng hơn đối với bác sĩ điều trị. Ngoài ra, chế phẩm chứa histidin và arginin được dung nạp tốt ở mắt thỏ.

Sau đây, các phương án làm đại diện sẽ được mô tả chi tiết. Cần hiểu rằng phần mô tả sau đây không dự định làm giới hạn các phương án cho một phương án được ưu tiên. Ngược lại, chúng được dự định bao gồm các phương án thay thế, cải biến và tương đương khi có thể được bao gồm trong phạm vi của các phương án được mô như được xác định trong phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Nếu không được định nghĩa theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ

thuật được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế này thuộc về. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "khoảng", khi được sử dụng liên quan đến giá trị bằng số được nêu cụ thể, có nghĩa là giá trị này có thể thay đổi so với giá trị được nêu không quá 1%. Ví dụ, khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "khoảng 100" bao gồm cả 99 và 101 và tất cả các giá trị nằm giữa (ví dụ, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, v.v.).

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm được của sáng chế tuân thủ tiêu chuẩn của Dược điển Mỹ USP<789> về việc tiêm thể tích nhỏ (small volume injection: SVP) của dung dịch dùng cho mắt, ví dụ, chứa ít hơn khoảng 50 hạt có đường kính $\geq 10\mu\text{m}$ trong mỗi ml; chứa ít hơn khoảng 5 hạt có đường kính $\geq 25\mu\text{m}$ trong mỗi ml; hoặc chứa ít hơn khoảng 2 hạt có đường kính $\geq 50\mu\text{m}$ trong mỗi ml.

Cần lưu ý rằng đối với các mục đích trong bản mô tả này, thuật ngữ "tiêm trong thủy tinh thể" để chỉ việc tiêm vào thủy tinh thể của mắt (gần võng mạc ở phía sau của mắt). Các cụm từ "thích hợp để sử dụng trong thủy tinh thể", "thích hợp để tiêm trong thủy tinh thể" và cụm từ tương tự có nghĩa là chế phẩm được nêu có thể được tiêm một cách an toàn vào thủy tinh thể của mắt đối tượng mà không gây ra phản ứng có hại bất kỳ, ngoài các phản ứng đã biết là có liên quan đến việc tiêm trong thủy tinh thể của sản phẩm EYLEA.

Thuật ngữ "chế phẩm được" ở đây để chỉ các chế phẩm, ví dụ, chứa chất mang được dụng được dùng để sử dụng các protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept hoặc conbercept) cho đối tượng nhằm mục đích điều trị/y học.

Thuật ngữ "được dụng" để chỉ chế phẩm trong phạm vi đánh giá y học hợp lý là thích hợp để sử dụng cho mắt.

Thuật ngữ "đối tượng" ở đây để chỉ đối tượng là động vật có vú bất kỳ (ví dụ, thỏ, chuột, chuột nhắt hoặc khỉ), cụ thể là người, ví dụ, được chẩn đoán, tiên lượng hoặc điều trị được yêu cầu sử dụng các chế phẩm như được mô tả ở đây.

Thuật ngữ chế phẩm "dạng nước" để chỉ chế phẩm có chứa nước.

Thuật ngữ "điều trị" hoặc "việc điều trị" để chỉ biện pháp điều trị làm đảo ngược, ổn định hoặc loại bỏ bệnh hoặc rối loạn không mong muốn (ví dụ, rối loạn ở mắt do sự tạo mạch hoặc bệnh ung thư), ví dụ, bằng cách gây ra sự thoái triển, làm ổn định hoặc loại bỏ một hoặc nhiều triệu chứng hoặc dấu hiệu phân biệt của bệnh hoặc

rối loạn này ở mức độ xác định được về mặt lâm sàng bất kỳ, ví dụ, đối với rối loạn ở mắt do sự tạo mạch, bằng cách làm giảm hoặc duy trì điểm số về mức độ nặng của bệnh võng mạc do đái tháo đường (diabetic retinopathy severity score: DRSS), bằng cách cải thiện hoặc duy trì thị lực (ví dụ, theo thị lực được điều chỉnh tốt nhất, ví dụ, khi được xác định theo các chữ cái ETDRS), làm gia tăng hoặc duy trì thị trường và/hoặc làm giảm hoặc duy trì độ dày của võng mạc trung tâm và, đối với bệnh ung thư, ngăn chặn hoặc đảo ngược sự phát triển, sự sống và/hoặc sự di căn của các tế bào ung thư ở đối tượng. Thông thường, biện pháp điều trị là cho đối tượng bị bệnh hoặc rối loạn sử dụng một hoặc nhiều liều chứa lượng có hiệu quả điều trị của protein dung hợp thụ thể VEGF.

Thuật ngữ “phòng ngừa” hoặc “sự phòng ngừa” để chỉ biện pháp điều trị dự phòng để làm ngừng sự phát triển của bệnh hoặc rối loạn không mong muốn (ví dụ, rối loạn ở mắt do sự tạo mạch).

Phương pháp SE-UPLC có thể được sử dụng trong sáng chế để định lượng sự có mặt của các hợp chất có trọng lượng phân tử cao trong chế phẩm. SE để chỉ phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ. UPLC để chỉ phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng. Các cột SE thích hợp, có thể được sử dụng trong hệ thống UPLC, để xác định tính chất của các hợp chất HMW trong protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept hoặc conbercept) trong chế phẩm, có khả năng phân giải các phân tử có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10000 đến 450000 Dalton. Ví dụ, xem cột ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 200Å. Theo một phương án của sáng chế, hai trong số các cột này được nối tiếp với nhau khi định lượng các hợp chất HMW trong chế phẩm. Phương pháp UPLC có sự cải tiến so với phương pháp HPLC (phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao) về độ nhạy và độ phân giải. Phương pháp UPLC sử dụng thiết bị vận hành ở áp suất cao và sử dụng các hạt mịn hơn (thường là nhỏ hơn khoảng 2,5µm) so với thiết bị và hạt được sử dụng trong phương pháp HPLC. Ngoài ra, pha động của phương pháp UPLC vận hành ở tốc độ tuyến tính cao hơn so với phương pháp HPLC.

Các phương án của sáng chế bao gồm chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept hoặc conbercept) với nồng độ cao (ví dụ, khoảng 60 mg/ml, khoảng 80 mg/ml, khoảng 90 mg/ml, khoảng 100 mg/ml, khoảng 113,3 mg/ml, khoảng 114,3 mg/ml, khoảng 120 mg/ml, khoảng 133,3 mg/ml, khoảng 140 mg/ml,

khoảng 150 mg/ml, khoảng 200 mg/ml hoặc khoảng 250 mg/ml). Các chế phẩm thích hợp theo sáng chế chứa protein dung hợp thụ thể VEGF với nồng độ cao, chất đệm, chất ổn định nhiệt và chất hoạt động bề mặt. Theo một số khía cạnh, chế phẩm thích hợp còn chứa chất làm giảm độ nhớt. Theo các khía cạnh khác, chế phẩm thích hợp gần như loại trừ toàn bộ các chất làm giảm độ nhớt. Các chế phẩm điển hình có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,8 (ví dụ, 5,8), nhưng có thể bao gồm độ pH bất kỳ hữu ích để sử dụng protein dung hợp thụ thể VEGF cho mắt của đối tượng.

Sáng chế đề xuất các chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept hoặc conbercept) kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị khác (ví dụ, chất ức chế Ang-2 (ví dụ, kháng thể kháng ANG2 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hoặc nesvacumab), chất hoạt hóa thụ thể Tie-2, kháng thể kháng PDGF, thụ thể PDGF hoặc kháng thể beta của thụ thể PDGF hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó và/hoặc chất đối kháng VEGF bổ sung như bevacizumab, ranibizumab, pegaptanib hoặc dạng hòa tan của thụ thể yếu tố sinh trưởng nội mô mạch-3 (vascular endothelial growth factor receptor-3: VEGFR-3) của người chứa các miễn ngoại bào từ 1 đến 3, được thể hiện dưới dạng protein dung hợp Fc) cũng như các phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bao gồm bước sử dụng các chế phẩm như được bàn luận ở đây. Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm của sáng chế chứa protein dung hợp thụ thể VEGF, như aflibercept, nhưng loại trừ chất điều trị khác bất kỳ (ví dụ, chất điều trị là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó).

Thuật ngữ "kết hợp với" thể hiện rằng chế phẩm và chất điều trị khác có thể được bào chế thành một hỗn hợp duy nhất, ví dụ, để cung cấp đồng thời, hoặc được bào chế riêng biệt thành hai hoặc nhiều hỗn hợp (ví dụ, kit). Chính chất điều trị khác này có thể được bào chế trong chế phẩm được của chính nó. Mỗi hỗn hợp có thể được sử dụng cho đối tượng ở cùng thời điểm với hỗn hợp còn lại hoặc ở thời điểm khác với thời điểm mà hỗn hợp còn lại được sử dụng; ví dụ, mỗi lần sử dụng có thể được thực hiện theo cách không đồng thời (ví dụ, theo cách riêng rẽ hoặc lần lượt) ở các thời điểm trong một khoảng thời gian cho trước. Ngoài ra, chế phẩm và chất điều trị khác có thể được sử dụng cho đối tượng qua đường giống nhau hoặc khác nhau.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm của sáng chế chứa một hoặc nhiều thành phần bất kỳ trong số natri sulfat (ví dụ, 50mM); natri thioxyanat (ví dụ, 50mM); natri xitrat (ví dụ, 40mM); glyxin (ví dụ, 50mM); natri clorua (ví dụ, 50mM); lysin (ví

dụ, 50mM); natri aspartat (ví dụ, 50mM); và/hoặc natri glutamat (ví dụ, 50mM). Ví dụ, theo một phương án, chế phẩm này chứa hỗn hợp của natri xitrat (ví dụ, 50mM) và arginin hydroclorua (ví dụ, 50mM); glyxin (ví dụ, 50mM) và arginin hydroclorua (ví dụ, 50mM); natri aspartat (ví dụ, 50mM) và arginin hydroclorua (ví dụ, 50mM); hoặc natri glutamat (ví dụ, 50mM) và arginin hydroclorua (ví dụ, 50mM).

Protein dung hợp thụ thể VEGF và các chất ức chế VEGF khác

Nhằm mục đích của sáng chế, thuật ngữ “protein dung hợp thụ thể VEGF” để chỉ phân tử chứa một hoặc nhiều thụ thể VEGF hoặc miền của nó, được dung hợp với polypeptit khác, để cản trở sự tương tác giữa VEGF và thụ thể VEGF tự nhiên, ví dụ, trong đó hai trong số các polypeptit dung hợp này được kết hợp, nhờ đó tạo ra homodime hoặc multime khác. Các protein dung hợp thụ thể VEGF này có thể được gọi là “VEGF-Trap” hoặc “VEGF Trap”. Các protein dung hợp thụ thể VEGF trong ngữ cảnh của sáng chế nằm trong định nghĩa này bao gồm, các polypeptit thể khảm chứa hai hoặc nhiều miền tương tự globulin miễn dịch (Ig) của thụ thể VEGF như VEGFR1 (còn được gọi là Flt1) và/hoặc VEGFR2 (còn được gọi là Flk1 hoặc KDR), và cũng có thể chứa miền multime hóa (ví dụ, miền Fc).

Protein dung hợp thụ thể VEGF làm ví dụ là phân tử được gọi là VEGF1R2-Fc Δ C1(a) được mã hóa bằng trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc các nucleotit từ 79 đến 1374 hoặc từ 79 đến 1371 của nó.

VEGF1R2-Fc Δ C1(a) chứa ba thành phần:

(1) thành phần VEGFR1 bao gồm các axit amin từ 27 đến 129 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2;

(2) thành phần VEGFR2 bao gồm các axit amin từ 130 đến 231 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2; và

(3) thành phần multime hóa (“Fc Δ C1(a)”) bao gồm các axit amin từ 232 đến 457 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 (các axit amin ở đầu tận cùng C của trình tự SEQ ID NO: 2, nghĩa là K458, có thể được đưa vào hoặc không được đưa vào protein dung hợp thụ thể VEGF, xem các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 7.396.664 hoặc 7.354.579, được kết hợp vào đây cho tất cả các mục đích). Cần lưu ý rằng các axit amin từ 1 đến 26 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 là trình tự tín hiệu.

Theo một phương án của sáng chế, protein dung hợp thụ thể VEGF bao gồm các axit amin từ 27 đến 458 hoặc từ 27 đến 457 có trình tự nêu trong SEQ

ID NO: 2.

Theo một phương án của sáng chế, protein dung hợp thụ thể VEGF chứa

- (1) miền tương tự globin miễn dịch (Ig) 2 của thụ thể VEGF thứ nhất (ví dụ, VEGFR1), và
- (2) miền Ig 3 của thụ thể VEGF thứ hai (ví dụ, VEGFR2),
- (3) và, tùy ý, còn bao gồm miền Ig 4 của thụ thể VEGF thứ hai (ví dụ, VEGFR2) và
- (4) thành phần multime hóa (ví dụ, miền Fc của IgG).

Ví dụ, theo một phương án của sáng chế, protein dung hợp thụ thể VEGF có sự sắp xếp các miền nêu trên như sau:

- [miền Ig 2 của VEGFR1]-[miền Ig 3 của VEGFR2]-[MC] (ví dụ, homodime của nó) hoặc
- [miền Ig 2 của VEGFR1]-[miền Ig 3 của VEGFR2]-[miền Ig 4 của VEGFR2]-[MC] (ví dụ, homodime của nó).

Theo một phương án của sáng chế, protein dung hợp thụ thể VEGF là VEGF minitrap, là phân tử VEGF trap có thành phần multime hóa bị cắt ngắn (ví dụ, Fc), ví dụ, trong đó mini-trap này vẫn chứa vùng bản lề Fc. Ví dụ, xem Công bố đơn quốc tế số WO2005/00895 hoặc Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 7.396.664.

Cần lưu ý rằng sáng chế cũng bao gồm trong phạm vi của nó các chế phẩm chứa các phân tử gắn kết VEGF và kháng thể kháng VEGF và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, thay cho protein dung hợp thụ thể VEGF, với nồng độ cao

bevacizumab (ví dụ, với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 80 đến 90 hoặc 88 mg/ml),

ranibizumab (ví dụ, với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 20 đến 40 mg/ml, ví dụ, từ 21 đến 35, 21 hoặc 35 mg/ml),

aptame kháng VEGF như pegaptanib (ví dụ, pegaptanib natri),

kháng thể kháng VEGF chuỗi đơn (ví dụ, V_L-V_H) như brolucizumab (ví dụ, với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 200 đến 400 hoặc 200, 210, 400 hoặc 420 mg/ml),

DARPin kháng VEGF như DARPin Abicipar Pegol (ví dụ, với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 70 đến 140, 70 hoặc 140 mg/ml), hoặc

kháng thể đặc hiệu kép kháng VEGF, ví dụ, cũng gắn kết với ANG2, như

RG7716 (ví dụ, với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 đến 400, 100, 105, 400 hoặc 420 mg/ml).

Để làm giảm đến mức tối thiểu tính lặp lại của các phương án được bàn luận ở đây, phạm vi của sáng chế được dự định bao gồm các phương án trong đó chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm được bàn luận ở đây chứa kháng thể kháng VEGF hoặc mảnh kháng thể hoặc phân tử gắn kết VEGF khác như được bàn luận ở đây (ví dụ, được thay thế bằng DARPin kháng VEGF), thay cho protein dung hợp thụ thể VEGF, với nồng độ bất kỳ trong số các nồng độ được bàn luận ở đây. Ví dụ, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa ranibizumab với nồng độ 35 hoặc 80 mg/ml, chất đệm, chất ổn định nhiệt, chất làm giảm độ nhớt và chất hoạt động bề mặt.

DARPin là các protein có đoạn lặp ankyrin được thiết kế. Các protein DARPin thường chứa từ ba đến bốn đoạn lặp được đóng gói chặt chẽ của khoảng 33 gốc axit amin, với mỗi lần lặp lại chứa một vòng ngược- β và hai vòng xoắn- α đối song song. Khung cứng này tạo ra tính ổn định của protein trong khi cho phép biểu hiện các vùng biến đổi, thường chứa sáu gốc axit amin cho mỗi đoạn lặp, để nhận biết đích.

Thuật ngữ kháng thể “kháng VEGF” hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể để chỉ kháng thể hoặc mảnh gắn kết đặc hiệu với VEGF.

Các protein dung hợp thụ thể VEGF minh họa bao gồm aflibercept (EYLEA®, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.) hoặc conbercept (được bán trên thị trường bởi công ty Chengdu Kanghong Biotechnology Co., Ltd.). Xem các Công bố đơn quốc tế số WO2005/121176 hoặc WO2007/112675. Các thuật ngữ “aflibercept” và “conbercept” bao gồm cả các phiên bản tương tự về mặt sinh học của chúng. Phiên bản tương tự về mặt sinh học của sản phẩm tham chiếu (ví dụ, aflibercept) thường để chỉ sản phẩm chứa trình tự axit amin giống hệt, nhưng bao gồm các sản phẩm tương tự về mặt sinh học theo Đạo luật về sự đổi mới và cạnh giá trong sinh học (Biologics Price Competition and Innovation Act) của Mỹ.

Các chế phẩm dược của sáng chế là chế phẩm có “nồng độ cao”. Các chế phẩm dược có nồng độ cao của sáng chế chứa protein dung hợp thụ thể VEGF với nồng độ bằng ít nhất 41 mg/ml, ít nhất 80 mg/ml, ít nhất 100 mg/ml, ít nhất 125 mg/ml, ít nhất 140 mg/ml, ít nhất 150 mg/ml, ít nhất 175 mg/ml, ít nhất 200 mg/ml, ít nhất 225 mg/ml, ít nhất 250 mg/ml, hoặc ít nhất 275 mg/ml. Theo phương án khác, thuật ngữ “nồng độ cao” có thể để chỉ các chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF với

nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 140 mg/ml đến khoảng 160 mg/ml, ít nhất khoảng 140 mg/ml nhưng nhỏ hơn 160 mg/ml, nằm trong khoảng từ khoảng 41 mg/ml đến khoảng 275 mg/ml, từ khoảng 70 mg/ml đến khoảng 75 mg/ml hoặc từ khoảng 80 mg/ml đến khoảng 250 mg/ml. Theo một số khía cạnh, nồng độ protein dung hợp thụ thể VEGF trong chế phẩm là nồng độ bất kỳ trong số các nồng độ sau: 41 mg/ml; 42 mg/ml; 43 mg/ml; 44 mg/ml; 45 mg/ml; 46 mg/ml; 47 mg/ml; 48 mg/ml; 49 mg/ml; 50mg/ml; 51 mg/ml; 52 mg/ml; 53 mg/ml; 54 mg/ml; 55 mg/ml; 56 mg/ml; 57 mg/ml; 58 mg/ml; 59 mg/ml; 60 mg/ml; 61 mg/ml; 62 mg/ml; 63 mg/ml; 64 mg/ml; 65 mg/ml; 66 mg/ml; 67 mg/ml; 68 mg/ml; 69 mg/ml; 70 mg/ml; 71 mg/ml; 72 mg/ml; 73 mg/ml; 74 mg/ml; 75 mg/ml; 76 mg/ml; 77 mg/ml; 78 mg/ml; 79 mg/ml; 80 mg/ml; 81 mg/ml; 82 mg/ml; 83 mg/ml; 84 mg/ml; 85 mg/ml; 86 mg/ml; 87mg/ml; 88 mg/ml; 89 mg/ml; 90 mg/ml; 91 mg/ml; 92 mg/ml; 93 mg/ml; 94 mg/ml; 95mg/ml; 96 mg/ml; 97 mg/ml; 98 mg/ml; 99 mg/ml; 100 mg/ml; 101 mg/ml; 102 mg/ml; 103 mg/ml; 104 mg/ml; 105 mg/ml; 106mg/ml; 107 mg/ml; 108 mg/ml; 109 mg/ml; 110 mg/ml; 111 mg/ml; 112 mg/ml; 113 mg/ml; 113,3 mg/ml; 114 mg/ml; 114,1 mg/ml; 114,2 mg/ml; 114,3 mg/ml; 114,4 mg/ml; 114,5 mg/ml; 114,6 mg/ml, 114,7 mg/ml, 114,8 mg/ml; 114,9 mg/ml; 115 mg/ml; 116 mg/ml; 117 mg/ml; 118 mg/ml; 119 mg/ml; 120 mg/ml; 121 mg/ml; 122 mg/ml; 123 mg/ml; 124 mg/ml; 125 mg/ml; 126 mg/ml; 127mg/ml; 128 mg/ml; 129 mg/ml; 130 mg/ml; 131 mg/ml; 132 mg/ml; 133 mg/ml; 133,3 mg/ml; 133,4 mg/ml, 134 mg/ml; 135 mg/ml; 136 mg/ml; 137 mg/ml; 138 mg/ml; 139 mg/ml; 140 mg/ml; 141 mg/ml; 142 mg/ml; 143 mg/ml; 144 mg/ml; 145 mg/ml; 146 mg/ml; 147 mg/ml; 148 mg/ml; 149 mg/ml; 150 mg/ml; 151 mg/ml; 152 mg/ml; 153 mg/ml; 154 mg/ml; 155 mg/ml; 156 mg/ml; 157 mg/ml; 158 mg/ml; 159 mg/ml; 160 mg/ml; 161 mg/ml; 162 mg/ml; 163 mg/ml; 164 mg/ml; 165 mg/ml; 166 mg/ml; 167 mg/ml; 168 mg/ml; 169 mg/ml; 170 mg/ml; 171 mg/ml; 172 mg/ml; 173 mg/ml; 174 mg/ml; 175 mg/ml; 176 mg/ml; 177 mg/ml; 178 mg/ml; 179 mg/ml; 180 mg/ml; 181 mg/ml; 182 mg/ml; 183 mg/ml; 184 mg/ml; 185 mg/ml; 186 mg/ml; 187 mg/ml; 188 mg/ml; 189 mg/ml; 190 mg/ml; 191 mg/ml; 192 mg/ml; 193 mg/ml; 194 mg/ml; 195 mg/ml; 196 mg/ml; 197 mg/ml; 198 mg/ml; 199 mg/ml; 200 mg/ml; 201 mg/ml; 202 mg/ml; 203 mg/ml; 204 mg/ml; 205 mg/ml; 206 mg/ml; 207 mg/ml; 208 mg/ml; 209 mg/ml; 210 mg/ml; 211 mg/ml; 212 mg/ml; 213 mg/ml; 214 mg/ml; 215 mg/ml; 216 mg/ml; 217 mg/ml; 218 mg/ml; 219 mg/ml; 220 mg/ml; 221 mg/ml; 222 mg/ml; 223 mg/ml;

224 mg/ml; 225 mg/ml; 226 mg/ml; 227 mg/ml; 228 mg/ml; 229 mg/ml; 230 mg/ml; 231 mg/ml; 232 mg/ml; 233 mg/ml; 234 mg/ml; 235 mg/ml; 236 mg/ml; 237mg/ml; 238 mg/ml; 239 mg/ml; 240 mg/ml; 241 mg/ml; 242 mg/ml; 243 mg/ml; 244 mg/ml; 245 mg/ml; 246 mg/ml; 247 mg/ml; 248 mg/ml; 249 mg/ml; 250 mg/ml; 251 mg/ml; 252 mg/ml; 253 mg/ml; 254 mg/ml; 255 mg/ml; 256 mg/ml; 257 mg/ml; 258 mg/ml; 259 mg/ml; 260 mg/ml; 261 mg/ml; 262 mg/ml; 263 mg/ml; 264 mg/ml; 265 mg/ml; 266 mg/ml; 267 mg/ml; 268 mg/ml; 269 mg/ml; 270 mg/ml; 271 mg/ml; 272 mg/ml; 273 mg/ml; 274 mg/ml; hoặc 275 mg/ml. Các nồng độ của protein dung hợp thụ thể VEGF khác cũng được dự định ở đây, miễn là nồng độ này có tác dụng theo các phương án ở đây.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm được của sáng chế có nồng độ sao cho chứa khoảng 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 hoặc 20mg protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept), hoặc lượng protein này trong liều bất kỳ trong số các liều chấp nhận được của nó đã được bàn luận ở đây, trong thể tích nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 100µl, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 75µl hoặc nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 70µl, ví dụ, khoảng 50µl; 51µl; 52µl; 53µl; 54µl; 55µl; 56µl; 57µl; 58µl; 59µl; 60µl; 61µl; 62µl; 63µl; 64µl; 65µl; 66µl; 67µl; 68µl; 69µl; 70µl; 71µl; 72µl; 73µl; 74µl; 75µl; 76µl; 77µl; 78µl; 79µl; 80µl; 81µl; 82µl; 83µl; 84µl; 85µl; 86µl; 87µl; 88µl; 89µl; 90µl; 91µl; 92µl; 93µl; 94µl; 95µl; 96µl; 97µl; 98µl; 99µl; hoặc 100µl.

Sáng chế bao gồm chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm được nêu trong cụm từ “*Chế phẩm minh họa*” ở đây, mà trong đó nồng độ của protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) được thay thế bằng nồng độ được nêu trong phần (“Protein dung hợp thụ thể VEGF và các chất ức chế VEGF khác” này).

Chất đệm

Các chất đệm được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ dung dịch có tác dụng chống lại sự thay đổi độ pH bằng cách sử dụng thể liên hợp axit-bazơ. Các chất đệm có khả năng duy trì độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,8, và thông thường hơn, từ khoảng 5,8 đến khoảng 6,5, và thông thường nhất là nằm trong khoảng từ khoảng 6,0 đến khoảng 6,5. Trong một số trường hợp, độ pH của chế phẩm theo sáng chế bằng khoảng 5,0, khoảng 5,1, khoảng 5,2, khoảng 5,3, khoảng 5,4, khoảng 5,5, khoảng 5,6, khoảng 5,7, khoảng 5,8, khoảng 5,9, khoảng 6,0, khoảng 6,1, khoảng 6,2, khoảng 6,3, khoảng 6,4, khoảng 6,5, khoảng 6,6, khoảng 6,7, hoặc khoảng 6,8.

Các chất đệm làm ví dụ để đưa vào các chế phẩm của sáng chế bao gồm các chất đệm trên cơ sở histidin, ví dụ, histidin, histidin hydroclorua, và histidin axetat. Theo phương án khác, các chất đệm để đưa vào các chế phẩm của sáng chế có thể là chất đệm trên cơ sở phosphat, ví dụ, natri phosphat, các chất đệm trên cơ sở axetat, ví dụ, natri axetat hoặc axit axetic, hoặc có thể là chất đệm trên cơ sở xitrat, ví dụ, natri xitrat hoặc axit xitric. Cần hiểu rằng các chất đệm cũng có thể là hỗn hợp của các chất trên đây, miễn là chất đệm này có tác dụng để đệm cho các chế phẩm trong khoảng độ pH đã mô tả trên đây. Trong một số trường hợp, chất đệm có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 5mM đến khoảng 25mM, hoặc thông thường hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 5mM đến khoảng 15mM. Chất đệm có thể có nồng độ bằng khoảng 5mM, khoảng 6mM, khoảng 7mM, khoảng 8mM, khoảng 9mM, khoảng 10mM, khoảng 11mM, khoảng 12mM, khoảng 13mM, khoảng 14mM, khoảng 15mM, khoảng 16mM, khoảng 17mM, khoảng 18mM, khoảng 19mM, khoảng 20mM, khoảng 21mM, khoảng 22mM, khoảng 23mM, khoảng 24mM, hoặc khoảng 25mM.

Theo một phương án của sáng chế, chất đệm trên cơ sở histidin được điều chế bằng cách sử dụng histidin và histidin monohydroclorua.

Chất hoạt động bề mặt

Chất hoạt động bề mặt để sử dụng trong bản mô tả này để chỉ các thành phần có tác dụng bảo vệ protein dung hợp thụ thể VEGF với nồng độ cao khỏi chịu tác động của ứng suất gây ra bởi mặt phân cách và bề mặt khác nhau. Theo đó, các chất hoạt động bề mặt có thể được sử dụng để hạn chế hoặc làm giảm đến mức tối thiểu sự kết tụ của protein dung hợp thụ thể VEGF, và kích thích sự hòa tan của protein. Các chất hoạt động bề mặt thích hợp ở đây đã được chứng minh là chất hoạt động bề mặt không ion, và có thể bao gồm các chất hoạt động bề mặt có gốc polyoxyetylen. Các chất hoạt động bề mặt minh họa trong lĩnh vực này bao gồm: polysorbat 20, polysorbat 80, poloxame 188, polyetylen glycol 3350, và hỗn hợp của chúng. Các chất hoạt động bề mặt trong chế phẩm có thể có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,02% đến khoảng 0,1% trọng lượng theo thể tích (trọng lượng/thể tích), và thông thường hơn, nằm trong khoảng từ khoảng 0,02% đến khoảng 0,04% (trọng lượng/thể tích). Trong một số trường hợp, chất hoạt động bề mặt có nồng độ bằng khoảng 0,02% (trọng lượng/thể tích), khoảng 0,03% (trọng lượng/thể tích), khoảng 0,04% (trọng lượng/thể tích), khoảng 0,05% (trọng lượng/thể tích), khoảng 0,06% (trọng lượng/thể

tích), khoảng 0,07% (trọng lượng/thể tích), khoảng 0,08% (trọng lượng/thể tích), khoảng 0,09% (trọng lượng/thể tích), hoặc khoảng 0,1% (trọng lượng/thể tích).

Chất ổn định nhiệt

Chất ổn định nhiệt để sử dụng trong bản mô tả này để chỉ các thành phần có tác dụng tạo ra tính ổn định nhiệt đối với sự biến tính do nhiệt của protein dung hợp thụ thể VEGF, cũng như bảo vệ đối với sự mất hoạt tính hoặc hiệu lực của protein dung hợp thụ thể VEGF. Các chất ổn định nhiệt thích hợp bao gồm đường, và có thể là sucroza, trehaloza, sorbitol hoặc manitol, hoặc có thể là các axit amin, ví dụ, L-prolin, L-arginin (ví dụ, L-arginin monohydroclorua), hoặc taurin. Ngoài ra, các chất ổn định nhiệt cũng có thể bao gồm các hợp chất acrylamit được thế hoặc axit propan sulfonic, hoặc có thể là các hợp chất tương tự glyxerol.

Trong một số trường hợp, các chế phẩm theo sáng chế chứa cả đường và taurin, đường và axit amin, đường và axit propan sulfonic, đường và taurin, glyxerol và taurin, glyxerol và axit propan sulfonic, axit amin và taurin, hoặc axit amin và axit propan sulfonic. Ngoài ra, chế phẩm có thể chứa đường, taurin và axit propan sulfonic, glyxerol, taurin và axit propan sulfonic, cũng như L-prolin, taurin và axit propan sulfonic.

Các phương án của sáng chế thường có các chất ổn định nhiệt có mặt một mình, mỗi chất này độc lập có mặt với nồng độ, hoặc có mặt trong hỗn hợp với tổng nồng độ, nằm trong khoảng từ khoảng 2% (trọng lượng/thể tích) đến khoảng 10% (trọng lượng/thể tích) hoặc từ 4% (trọng lượng/thể tích) đến khoảng 10% (trọng lượng/thể tích), hoặc từ khoảng 4% (trọng lượng/thể tích) đến khoảng 9% (trọng lượng/thể tích), hoặc từ khoảng 5% (trọng lượng/thể tích) đến khoảng 8% (trọng lượng/thể tích). Các chất ổn định nhiệt trong chế phẩm có thể có nồng độ bằng khoảng 2% (trọng lượng/thể tích), khoảng 2,5% (trọng lượng/thể tích), khoảng 3% (trọng lượng/thể tích), khoảng 4% (trọng lượng/thể tích), khoảng 5% (trọng lượng/thể tích), khoảng 6% (trọng lượng/thể tích), khoảng 7% (trọng lượng/thể tích), khoảng 8% (trọng lượng/thể tích), khoảng 9% (trọng lượng/thể tích), khoảng 10% (trọng lượng/thể tích) hoặc khoảng 20% (trọng lượng/thể tích).

Đối với taurin và axit propan sulfonic, theo một phương án của sáng chế, các chất ổn định nhiệt này có thể có mặt trong chế phẩm với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 25mM đến khoảng 100mM, và thông thường hơn là từ khoảng 50mM đến

khoảng 75mM (so với các chất ổn định nhiệt khác).

Chất làm giảm độ nhớt

Các chất làm giảm độ nhớt thường được sử dụng để làm giảm hoặc ngăn ngừa sự kết tụ của protein. Các chất làm giảm độ nhớt để đưa vào chế phẩm theo sáng chế bao gồm: natri clorua, magie clorua, D- hoặc L-arginin (ví dụ, L-arginin monohydroclorua), lysin, hoặc hỗn hợp của chúng. Khi có mặt trong chế phẩm, các chất làm giảm độ nhớt có thể có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10mM đến khoảng 100mM, và thông thường hơn là từ khoảng 30mM đến khoảng 75mM, và thậm chí thông thường hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 40mM đến khoảng 70mM. Trong một số trường hợp, chất làm giảm độ nhớt có mặt với nồng độ khoảng 10mM, khoảng 15mM, khoảng 20mM, khoảng 25mM, khoảng 30mM, khoảng 35mM, khoảng 40mM, khoảng 45mM, khoảng 50mM, khoảng 55mM, khoảng 60mM, khoảng 65mM, khoảng 70mM, khoảng 75mM, khoảng 80mM, khoảng 85mM, khoảng 90mM, khoảng 95mM hoặc khoảng 100mM.

Độ nhớt của chế phẩm

Các chế phẩm theo các phương án của sáng chế cũng có thể có độ nhớt được dụng để sử dụng cho mắt, ví dụ, tiêm trong thủy tinh thể. Độ nhớt thường để chỉ phép đo sức cản của chất lỏng bị làm biến dạng bởi ứng suất cắt hoặc ứng suất kéo (thường được xác định bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, nhớt kế hoặc lưu biến kế). Độ nhớt điển hình của chế phẩm theo các phương án của sáng chế nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 cP (centipoazơ) đến khoảng 15 cP, từ khoảng 11 cP đến khoảng 14 cP, từ khoảng 12 cP đến khoảng 15 cP hoặc từ khoảng 11 cP đến khoảng 12 cP. Vì vậy, độ nhớt của chế phẩm của sáng chế có thể bằng khoảng 5,0 cP, khoảng 6,0, khoảng 7,1 cP, khoảng 7,2 cP, khoảng 7,3 cP, khoảng 7,4 cP, khoảng 7,5 cP, khoảng 7,6 cP, khoảng 10 cP, khoảng 10,5 cP, khoảng 11,0 cP, khoảng 11,5 cP, khoảng 12,0 cP, khoảng 12,5 cP, khoảng 13,0 cP, khoảng 13,5 cP, khoảng 14,0 cP, khoảng 14,5 cP, hoặc khoảng 15,0 cP (ví dụ, khi được xác định ở nhiệt độ 20°C).

Các phương án khác nhau của sáng chế không cần bổ sung muối vô cơ, hoặc chất làm giảm độ nhớt khác, để duy trì các độ nhớt hữu ích ở mức cao này. Thông thường, dung dịch protein nồng độ cao cần có chất làm giảm độ nhớt để tránh sự kết tụ của protein và độ nhớt cao làm cho khó tiêm chế phẩm này trong thủy tinh thể và làm giảm hiệu lực của protein dung hợp thụ thể VEGF. Vì vậy, các phương án của sáng

chế bao gồm các chế phẩm gần như không chứa, hoặc không bổ sung thêm natri clorua (NaCl), magie clorua ($MgCl_2$), D- hoặc L-arginin hydroclorua, lysin hoặc chất làm giảm độ nhớt khác.

Nồng độ mol/kg nước dung dịch của chế phẩm

Nồng độ mol/kg nước dung dịch là thuộc tính quan trọng của chế phẩm dùng để tiêm. Tốt hơn là có sản phẩm phù hợp với điều kiện thẩm thấu sinh lý. Ngoài ra, nồng độ mol/kg nước dung dịch cung cấp thông tin xác nhận về hàm lượng hòa tan trong dung dịch. Theo một phương án của sáng chế, nồng độ mol/kg nước dung dịch của chế phẩm của sáng chế nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 506 mmol/kg hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 250 đến khoảng 506 mmol/kg, ví dụ, khoảng 250, 260, 270, 280, 290, 299, 300, 310, 314, 315, 316, 324, 343, 346, 349, 369, 384, 403, 426, 430 hoặc 506 mmol/kg. Theo một phương án của sáng chế, nồng độ mol/kg nước dung dịch nhỏ hơn khoảng 250 mmol/kg.

Độ tinh khiết và tính ổn định của chế phẩm

Chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF nồng độ cao được mô tả ở đây ổn định trong quá trình sản xuất và bảo quản. Thuật ngữ "ổn định" trong bản mô tả này để chỉ các chế phẩm chứa protein thụ thể VEGF duy trì được cả tính ổn định hóa học và lý học trong khoảng thời gian sản xuất và bảo quản chế phẩm, ví dụ, duy trì tính toàn vẹn và có mức độ thoái biến, biến tính hoặc không cuộn gập ở mức tối thiểu. Tính ổn định của protein thụ thể VEGF có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật phân tích đã biết trong lĩnh vực này ở các nhiệt độ khác nhau và trong các khoảng thời gian khác nhau. Cụ thể, tính ổn định hóa học (hiệu lực) của thụ thể VEGF có thể được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm sinh học khác nhau (ví dụ, dòng tế bào BAF/3 VEGFR1/EPOR được sử dụng để xác định sự gắn kết VEGF₁₆₅ bởi các protein dung hợp thụ thể VEGF ở đây), và tính ổn định vật lý, bằng cách phân tích sắc ký loại trừ theo kích cỡ (size exclusion: SE), phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng (ultra-performance liquid chromatography: UPLC), phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SE), quan sát bề ngoài bằng mắt thường, mật độ OD, độ pH, sự tạo ra biến thể mang điện tích, và tỷ lệ tạo ra các hợp chất có trọng lượng phân tử cao (HMW). Protein dung hợp thụ thể VEGF ổn định là protein có sự thay đổi về mật độ OD, độ pH, sự tạo ra các biến thể mang điện tích, và sự tạo ra các hợp chất HMW của nó được hạn chế.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ hợp chất “có trọng lượng phân tử cao” (HMW), liên quan đến chế phẩm chứa VEGF Trap cho trước (ví dụ, aflibercept), để chỉ các hợp chất bất kỳ của polypeptit hoặc phức chất polypeptit trong chế phẩm này được rửa giải ra khỏi cột loại trừ theo kích cỡ (ví dụ, SE-UPLC) ở phía trước polypeptit của VEGF Trap (ví dụ, có trọng lượng phân tử cao hơn) và/hoặc homodime của nó. Tỷ lệ % của các hợp chất HMW để chỉ tỷ lệ % của các hợp chất này so với tổng lượng polypeptit trong chế phẩm, ví dụ, bằng cách phân tích bằng phương pháp SE-UPLC.

Theo một phương án của sáng chế, như được bàn luận đầy đủ hơn trong các ví dụ dưới đây, các chế phẩm ổn định có tính ổn định vật lý và hiệu lực của protein dung hợp thụ thể VEGF đáng kể trong khoảng thời gian tối đa là 12 tháng, tối đa là 24 tháng, và/hoặc tối đa là 36 tháng khi được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2°C đến khoảng 8°C.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm của sáng chế là chế phẩm có các đặc điểm sau:

- Sau khoảng 28 ngày ở nhiệt độ khoảng 37°C có lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) tăng lên khoảng 3, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 30, 35 hoặc 37% (hoặc từ 10 đến 15% hoặc từ 15 đến 20% hoặc từ 10 đến 20%)
- Sau khoảng 28 ngày ở nhiệt độ khoảng 37°C có lượng hợp chất chính (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) giảm đi khoảng 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 hoặc 22% (hoặc từ 5 đến 20% hoặc từ 5 đến 10% hoặc từ 10 đến 15% hoặc từ 15 đến 20%)
- Sau khoảng 28 ngày ở nhiệt độ khoảng 37°C, có lượng protein dưới dạng hợp chất chính (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) bằng khoảng 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 hoặc 87% (hoặc từ khoảng 80 đến 85%) hoặc cao hơn
- Sau khoảng 28 ngày ở nhiệt độ khoảng 37°C có lượng hợp chất có trọng lượng phân tử thấp (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) tăng lên khoảng 1 hoặc 1,5 hoặc 2% (hoặc từ 1 đến 2%)
- Sau khoảng một tháng ở nhiệt độ khoảng 37°C có lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao tăng lên khoảng 16%; và/hoặc lượng hợp chất chính giảm đi

khoảng 17% và/hoặc lượng hợp chất có trọng lượng phân tử thấp tăng lên khoảng 0,5% hoặc <1%; và/hoặc sau khoảng hai tháng ở nhiệt độ khoảng 5°C, có lượng hợp chất chính giảm đi khoảng 1%, và/hoặc lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao tăng lên khoảng 1% và/hoặc lượng hợp chất có trọng lượng phân tử thấp (LMW) ở mức không đáng kể hoặc không phát hiện được; và/hoặc sau khoảng 2 tháng ở nhiệt độ khoảng 5°C, có lượng hợp chất chính bằng khoảng 97% (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC)

- Sau khoảng 12 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 8°C có lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) tăng lên khoảng từ 3 đến 3,5%
- Sau khoảng 12 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 8°C có lượng hợp chất chính (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) giảm đi ít hơn khoảng 1% hoặc 1, 2, 3 hoặc 4% (ví dụ, từ 1 đến 4% hoặc từ 3 đến 4%)
- Sau khoảng 12 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 8°C, có lượng protein dưới dạng hợp chất chính (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) bằng khoảng 94 hoặc 95% hoặc cao hơn
- Sau khoảng 3 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 8°C có lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) tăng lên khoảng 1 hoặc 2%
- Sau khoảng 6 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 8°C có lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) tăng lên ở mức khoảng <1 hoặc 1 hoặc 2%
- Sau khoảng 5¹/₂ hoặc 6 tháng ở nhiệt độ khoảng 5°C có tổng lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) bằng khoảng 2,5, 3,0 hoặc 3,5 (hoặc từ khoảng 2,5 đến 3,5%)
- Sau khoảng 6 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 8°C có lượng hợp chất chính (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) giảm đi ít hơn khoảng 1% hoặc 1 hoặc 2% (hoặc khoảng từ 0,5 đến 2% hoặc từ 1 đến 2%)
- Sau khoảng 6 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 8°C, có lượng protein dưới dạng hợp chất chính (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) bằng khoảng 94 hoặc 95% hoặc cao hơn

pháp SE-UPLC hoặc SEC) bằng khoảng 96 hoặc 97 hoặc 98% (hoặc từ 96 đến 98%) hoặc cao hơn

- Sau khoảng 24 tháng hoặc 36 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 8°C, có lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao tăng lên ở mức ít hơn khoảng 5 hoặc 6 hoặc 7% (ví dụ, khoảng 1,5, 2, 3, 4 hoặc 5%) (hoặc từ 1,5 đến 5% hoặc từ 1,5 đến 2,5%); và/hoặc có tổng lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao bằng khoảng 3,0, 3,25, 3,5, 4,0, 4,5 hoặc 5%; và/hoặc lượng hợp chất chính giảm đi khoảng 2 hoặc 3% (hoặc từ 2 đến 3%); và/hoặc tổng lượng hợp chất chính (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) bằng khoảng 95 hoặc 96% hoặc cao hơn (hoặc từ 95 đến 96%)
- Sau khoảng 1 tháng ở nhiệt độ khoảng 37°C, có lượng aflibercept trong chế phẩm có thể thu hồi được bằng phương pháp RP-HPLC bằng khoảng 97, 98, 99 hoặc 100% (hoặc từ 97 đến 100%)
- Ngay sau khi sản xuất và tinh chế, có lượng hợp chất có trọng lượng phân tử cao (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp SE-UPLC hoặc SEC) nhỏ hơn khoảng 1,5, 2, 2,5, 3,0 hoặc 3,5%
- Sau khoảng 6 tháng ở nhiệt độ khoảng 37°C, có lượng aflibercept dưới dạng hợp chất chính/đỉnh chính (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp hội tụ đẳng điện mao quản (cIEF) hoặc phương pháp hội tụ đẳng điện mao quản bằng hình ảnh) (các hợp chất không có tính axit và không có tính bazơ) bằng ít nhất khoảng 70% hoặc 75% (ví dụ, từ 70 đến 75%)
- Sau khoảng 36 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 8°C, có lượng hợp chất có tính axit tăng lên (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp hội tụ đẳng điện mao quản (cIEF) hoặc phương pháp hội tụ đẳng điện mao quản bằng hình ảnh) bằng khoảng 1 hoặc 2% (hoặc từ 1 đến 2%)
- Sau khoảng 36 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 8°C, có lượng hợp chất chính/đỉnh chính (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp hội tụ đẳng điện mao quản (cIEF) hoặc phương pháp hội tụ đẳng điện mao quản bằng hình ảnh) giảm đi khoảng 1% hoặc ít hơn
- Sau khoảng 36 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 8°C, có lượng hợp chất chính/đỉnh chính (ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp hội tụ đẳng điện mao quản (cIEF) hoặc phương pháp hội tụ đẳng điện mao quản

bằng hình ảnh) nằm trong khoảng từ khoảng 78 đến 79%

và/hoặc

- Khi được sử dụng trong thủy tinh thể cho động vật có vú, như người hoặc thỏ hoặc chuột (ví dụ, có rối loạn ở mắt do sự tạo mạch như bệnh AMD thể ướt), không gây ra các trường hợp bất lợi bất kỳ khác biệt trong lâm sàng so với các trường hợp bất lợi quan sát được đối với sản phẩm EYLEA (ví dụ, khi sản phẩm EYLEA được sử dụng trong thủy tinh thể với liều 0,5 hoặc 2,0mg); và không gây ra tình trạng viêm đáng kể trong lâm sàng ở mắt, sự tăng áp lực trong mắt (intraocular pressure: IOP) kéo dài, sự tăng hoặc giảm huyết áp kéo dài và/hoặc sự bong võng mạc.

Ngoài ra, theo một phương án của sáng chế, các protein dung hợp thụ thể VEGF nồng độ cao có tính ổn định do chúng không tạo ra hoặc có lượng biến thể mang điện tích có tính axit rất nhỏ trong quá trình sản xuất và bảo quản, ví dụ, không tạo ra hoặc tạo ra rất ít lượng biến thể mang điện tích khi được thử nghiệm, ví dụ, bằng phương pháp hội tụ đẳng điện mao quản bằng hình ảnh.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm của sáng chế có nồng độ hợp chất có trọng lượng phân tử thấp (LMW) nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 8%.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm của sáng chế có nồng độ nội độc tố nhỏ hơn khoảng 0,2, 0,4 hoặc 0,5 đơn vị nội độc tố (endotoxin unit: EU)/ml;

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm của sáng chế gần như không chứa chất dạng hạt hoặc chứa chất dạng hạt có kích thước khoảng 1, 2, 5, 10, 25 hoặc 50 micromet (hoặc lớn hơn).

Theo một phương án của sáng chế, khi chế phẩm của sáng chế được phân tích bằng phương pháp CE-SDS không khử (phương pháp điện di trên gel mao quản SDS), ít nhất 97% tổng diện tích đỉnh là đỉnh chính.

Theo một phương án của sáng chế, khi chế phẩm của sáng chế được phân tích bằng phương pháp UPLC loại trừ theo kích cỡ (SE-UPLC), ít nhất 93, 94 hoặc 95% tổng diện tích đỉnh là đỉnh chính và lượng chất kết tụ nhỏ hơn hoặc bằng 3,5, 4, 5 hoặc 6%.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm của sáng chế ở nhiệt độ khoảng 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C hoặc 8°C, từ 2 đến 8°C (ví dụ, nhiệt độ trung bình bằng 5°C), 23°C, 25°C, 30°C hoặc 37°C.

Các chế phẩm minh họa

Các chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF nồng độ cao minh họa bao gồm các chế phẩm sau:

Chế phẩm A: aflibercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm B: aflibercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm C: aflibercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm D: aflibercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH = 6,2.

Chế phẩm E: aflibercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm F: aflibercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm G: aflibercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm H: aflibercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm I: aflibercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm J: aflibercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza

8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm K: aflibercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm L: aflibercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm M: aflibercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm N: aflibercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm O: aflibercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm P: aflibercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH = 6,2.

Chế phẩm Q: aflibercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm R: aflibercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm S: aflibercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm T: aflibercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM,

sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2 (ví dụ, 6,2), và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm U: aflibercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm V: aflibercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm W: aflibercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm X: aflibercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm Y: conbercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm Z: conbercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm AA: conbercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm BB: conbercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH = 6,2.

Chế phẩm CC: conbercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm DD: conbercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm EE: conbercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm FF: conbercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm GG: conbercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm HH: conbercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm II: conbercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm JJ: conbercept 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm KK: conbercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm LL: conbercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm MM: conbercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM,

sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm NN: conbercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH = 6,2.

Chế phẩm OO: conbercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm PP: conbercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), và natri clorua 40mM, với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2.

Chế phẩm QQ: conbercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm RR: conbercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm SS: conbercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm TT: conbercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm UU: conbercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở phosphat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm VV: conbercept 150 mg/ml, chất đệm trên cơ sở xitrat 10mM,

sucroza 8% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 80 0,03% (trọng lượng/thể tích), với độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,2, và, tùy ý, loại trừ cụ thể chất làm giảm độ nhớt.

Chế phẩm WW: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và taurin 50mM, với độ pH = 5,8.

Chế phẩm XX: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 20mM, prolin 4% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và arginin hydroclorua 50mM, với độ pH = 5,8.

Chế phẩm YY: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 20mM, sucroza 2,5% (trọng lượng/thể tích), prolin 2,0% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và taurin 50mM, với độ pH = 5,8.

Chế phẩm ZZ: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, sucroza 2,5% (trọng lượng/thể tích), prolin 2,0% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và arginin hydroclorua 50mM, với độ pH = 5,8.

Chế phẩm AAA: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 20mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và PSA 50mM, với độ pH = 5,8.

Chế phẩm BBB: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 20mM, sucroza 2,5% (trọng lượng/thể tích), prolin 2,0% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và PSA 50mM, với độ pH = 5,8.

Chế phẩm CCC: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 80, 100, 120 hoặc 140 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 20mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và arginin hydroclorua 50mM, với độ pH = 5,8.

Chế phẩm DDD: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 10mM, prolin 4% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và PSA 50mM, với độ pH = 5,8.

Chế phẩm EEE: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml,

chất đệm trên cơ sở histidin 20mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), và polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích) và, tùy ý, không chứa chất ổn định nhiệt, với độ pH = 5,8.

Chế phẩm FFF: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml, natri phosphat 10mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích) và polysorbat 20 0,03% với độ pH = 6,2.

Chế phẩm GGG: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; histidin 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%; polysorbat 20 0,03%; natri sulfat 50mM.

Chế phẩm HHH: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; histidin 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%; polysorbat 20 0,03%; natri thioxyanat 50mM.

Chế phẩm III: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; histidin 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%, polysorbat 20 0,03%; natri xitrat 40mM.

Chế phẩm JJJ: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; histidin 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%, polysorbat 20 0,03%; glyxin 50mM.

Chế phẩm KKK: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; histidin 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%, polysorbat 20 0,03%; natri clorua 50mM.

Chế phẩm LLL: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; histidin 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%; polysorbat 20 0,03%; lysin 50mM.

Chế phẩm MMM: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; histidin 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%; polysorbat 20 0,03%; natri aspartat 50mM.

Chế phẩm NNN: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; histidin 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%; polysorbat 20 0,03%; natri glutamat 50mM.

Chế phẩm OOO: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; histidin 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%; polysorbat 20 0,03%; natri xitrat 50mM; arginin hydroclorua 50mM.

Chế phẩm PPP: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; histidin 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%; polysorbat 20 0,03%; glyxin 50mM; arginin

hydroclorua 50mM.

Chế phẩm QQQ: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; histidin 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%; polysorbat 20 0,03%; natri aspartat 50mM; arginin hydroclorua 50mM.

Chế phẩm RRR: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; histidin 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%; polysorbat 20 0,03%; natri glutamat 50mM; arginin hydroclorua 50mM.

Chế phẩm SSS: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; His 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%; polysorbat 20 0,03%; L-arginin hydroclorua 10mM.

Chế phẩm TTT: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140 mg/ml; His 20mM, độ pH = 5,8; sucroza 5%; polysorbat 20 0,03%; L-arginin hydroclorua 100mM.

Chế phẩm UUU: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 30 mg/ml, sucroza 10%, phosphat 10mM, polysorbat 20 0,03%, độ pH = 6,2

Chế phẩm VVV: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 30 mg/ml, sucroza 20%, phosphat 10mM, polysorbat 20 0,03%, độ pH = 6,2

Chế phẩm WWW: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 60 mg/ml, sucroza 10%, phosphat 10mM, polysorbat 20 0,03%, độ pH = 6,2

Chế phẩm XXX: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 60 mg/ml, sucroza 20%, phosphat 10mM, polysorbat 20 0,03%, độ pH = 6,2

Chế phẩm YYY: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 120 mg/ml, sucroza 10%, phosphat 10mM, polysorbat 20 0,03%, độ pH = 6,2

Chế phẩm ZZZ: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 120 mg/ml, sucroza 20%, phosphat 10mM, polysorbat 20 0,03%, độ pH = 6,2

Chế phẩm AAAA: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 120 mg/ml, sucroza 10%, phosphat 10mM, polysorbat 20 0,03%, NaCl 50mM, độ pH = 6,2

Chế phẩm BBBB: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 120 mg/ml, sucroza 20%, phosphat 10mM, polysorbat 20 0,03%, NaCl 50mM, độ pH = 6,2

Chế phẩm CCCC: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 140

mg/ml, natri phosphat 10mM, sucroza 5%, natri clorua 40mM, PS20 0,03%, độ pH = 6,2

Chế phẩm DDDD: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 80 mg/ml, chất đệm trên cơ sở histidin 20mM, sucroza 5% (trọng lượng/thể tích), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích), và L-arginin monohydroclorua 50mM, với độ pH = 5,8.

Chế phẩm EEEE: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 120,0 mg/ml (ví dụ, ± 12 mg/ml), chất đệm trên cơ sở histidin 20mM (ví dụ, ± 2 mM), sucroza 5% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, $\pm 0,5\%$), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, từ 0,02 đến 0,04%), và L-arginin monohydroclorua 50mM (ví dụ, ± 5 mM), với độ pH = 5,8 (ví dụ, từ 5,6 đến 6,0 hoặc từ 5,5 đến 6,1).

Chế phẩm FFFF: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 113,3 mg/ml (ví dụ, từ 102 đến 125 mg/ml), chất đệm trên cơ sở histidin 20mM (ví dụ, ± 2 mM), sucroza 5% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, $\pm 0,5\%$), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, từ 0,02 đến 0,04%), và L-arginin monohydroclorua 50mM (ví dụ, ± 5 mM), với độ pH = 5,8 (ví dụ, từ 5,6 đến 6,0 hoặc từ 5,5 đến 6,1).

Chế phẩm GGGG: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 114,3 mg/ml (ví dụ, từ 103 đến 126 mg/ml), chất đệm trên cơ sở histidin 10mM (ví dụ, ± 1 mM), sucroza 5% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, $\pm 0,5\%$), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, từ 0,02 đến 0,04%), và L-arginin monohydroclorua 50mM (ví dụ, ± 5 mM), với độ pH = 5,8 (ví dụ, từ 5,6 đến 6,0 hoặc từ 5,5 đến 6,1).

Chế phẩm HHHH: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 100,0 mg/ml (ví dụ, ± 10 mg/ml), chất đệm trên cơ sở histidin 20mM (ví dụ, ± 2 mM), sucroza 5% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, $\pm 0,5\%$), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, từ 0,02 đến 0,04%), và L-arginin monohydroclorua 50mM (ví dụ, ± 5 mM), với độ pH = 5,8 (ví dụ, từ 5,6 đến 6,0 hoặc từ 5,5 đến 6,1).

Chế phẩm IIII: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 133,3 mg/ml (ví dụ, ± 13 mg/ml), chất đệm trên cơ sở histidin 20mM (ví dụ, ± 2 mM), sucroza 5% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, $\pm 0,5\%$), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, từ 0,02 đến 0,04%), và L-arginin monohydroclorua 50mM (ví dụ, ± 5 mM), với độ pH = 5,8 (ví dụ, từ 5,6 đến 6,0 hoặc từ 5,5 đến 6,1).

Chế phẩm JJJJ: aflibercept (ví dụ, aflibercept) 150 mg/ml (ví dụ, ± 15 mg/ml),

natri phosphat 10mM, sucroza 8% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, $\pm 0,8\%$), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, từ 0,02 đến 0,04%) và L-arginin hydroclorua 50mM, độ pH = 6,2 (ví dụ, từ 6,0 đến 6,4 hoặc từ 5,9 đến 6,5).

Chế phẩm KKKK: protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) 114,3 mg/ml (ví dụ, ± 14 mg/ml), chất đệm trên cơ sở histidin 20mM (ví dụ, ± 2 mM), sucroza 5% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, $\pm 0,5\%$), polysorbat 20 0,03% (trọng lượng/thể tích) (ví dụ, từ 0,02 đến 0,04%), và L-arginin monohydroclorua 50mM (ví dụ, ± 5 mM), với độ pH = 5,8 (ví dụ, từ 5,6 đến 6,0 hoặc từ 5,5 đến 6,1);

hoặc chế phẩm bất kỳ được nêu ở đây.

Theo một phương án của sáng chế, nồng độ của thành phần trong chế phẩm bất kỳ (ví dụ, tất cả các thành phần) đã liệt kê trên đây (ví dụ, chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm từ A đến KKKK) hoặc được bàn luận ở đây $\pm$ khoảng 3%, 5% hoặc 10% nồng độ được nêu cụ thể.

Phương pháp sản xuất

Các phương án của sáng chế bao gồm các phương pháp sản xuất chế phẩm được theo sáng chế chứa protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm từ A đến KKKK như được nêu ở đây) bao gồm bước kết hợp các thành phần của chế phẩm này thành một hỗn hợp, và, tùy ý, đưa chế phẩm này vào bình chứa hoặc dụng cụ, ví dụ, lọ hoặc dụng cụ phân phối, ví dụ, bơm tiêm đã nạp sẵn thuốc. Các chế phẩm, lọ hoặc dụng cụ là sản phẩm của các phương pháp này là một phần của sáng chế.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp sản xuất chế phẩm được chứa protein dung hợp thụ thể VEGF của sáng chế (ví dụ, chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm từ A đến KKKK như được nêu ở đây) bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ (ví dụ, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc) chứa một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) trong môi trường nuôi cấy và trong các điều kiện mà nhờ đó protein được biểu hiện; và, tinh chế protein này ra khỏi tế bào chủ và/hoặc môi trường nuôi cấy và kết hợp phần protein này với các tá dược của chế phẩm được như được nêu ở đây. Ngoài ra, các chế phẩm, lọ hoặc dụng cụ là sản phẩm của các phương pháp này cũng là một phần của sáng chế.

Theo một phương án của sáng chế, cần xác định lượng và loại protein dung hợp thụ thể VEGF trong chế phẩm để làm cho nó có nồng độ cao và theo mục đích sử dụng

cuối của nó. Cũng cần xác định lượng và loại chất đệm, lượng và loại chất hoạt động bề mặt, lượng và loại chất ổn định nhiệt, và lượng bổ sung hoặc loại trừ cụ thể của chất làm giảm độ nhớt. Các thành phần này được kết hợp và trộn lẫn để đảm bảo rằng độ pH của chế phẩm ở giá trị mong muốn, ví dụ, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,8 (ví dụ, 5,8), và/hoặc độ nhớt ở giá trị mong muốn, ví dụ, khoảng 6,0, 7,3, 11,5 hoặc 12,0 cP ở nhiệt độ 20°C. Theo một phương án của sáng chế, các chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF nồng độ cao có thể được làm ổn định và bảo quản trong điều kiện ổn định, ví dụ, trong tối đa 24 hoặc 36 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C (ví dụ, 5°C).

Ví dụ, xem các tài liệu: Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

Rối loạn ở mắt do sự tạo mạch và bệnh ung thư

Chế phẩm được theo sáng chế chứa protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm được từ A đến KKKK) có thể được sử dụng trong việc điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn ở mắt do sự tạo mạch bất kỳ bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của protein dung hợp thụ thể VEGF trong chế phẩm của sáng chế, ví dụ, bằng cách tiêm trong thủy tinh thể. Các rối loạn ở mắt do sự tạo mạch trong bản mô tả này để chỉ bệnh bất kỳ của mắt do hoặc có liên quan đến sự phát triển hoặc sự tăng sinh của mạch máu và/hoặc do sự rò rỉ mạch máu. Ví dụ không làm giới hạn của các rối loạn ở mắt do sự tạo mạch có thể điều trị hoặc phòng ngừa bằng cách sử dụng chế phẩm và phương pháp của sáng chế bao gồm:

- bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (thể ướt),
- bệnh phù điểm vàng,
- bệnh phù điểm vàng sau khi tắc tĩnh mạch võng mạc,
- bệnh tắc tĩnh mạch võng mạc (RVO),

- bệnh tắc tĩnh mạch võng mạc trung tâm (CRVO),
- bệnh tắc tĩnh mạch võng mạc mạch nhánh (BRVO),
- bệnh phù điểm vàng do đái tháo đường (DME),
- bệnh tân sinh mạch ở màng mạch (CNV),
- bệnh tân sinh mạch ở mống mắt,
- bệnh tăng nhãn áp tân mạch,
- tình trạng xơ hóa sau phẫu thuật trong bệnh tăng nhãn áp,
- bệnh võng mạc thủy tinh thể tăng sinh (PVR),
- bệnh tân sinh mạch ở gai thị,
- bệnh tân sinh mạch ở giác mạc,
- bệnh tân sinh mạch ở võng mạc,
- bệnh tân sinh mạch ở thủy tinh thể,
- bệnh màng máu,
- bệnh mộng thịt ở mắt,
- bệnh võng mạc do mạch máu,
- bệnh võng mạc do đái tháo đường (ví dụ, bệnh võng mạc do đái tháo đường thể không tăng sinh (ví dụ, được đặc trưng bởi thang mức độ nặng của bệnh võng mạc do đái tháo đường (DRSS) bằng khoảng 47 hoặc 53) hoặc bệnh võng mạc do đái tháo đường thể tăng sinh; ví dụ, ở đối tượng không mắc bệnh DME) và
- bệnh võng mạc do đái tháo đường ở bệnh nhân mắc bệnh phù điểm vàng do đái tháo đường (DME).

Chế phẩm được theo sáng chế chứa protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm được từ A đến KKKK) có thể được sử dụng trong việc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư bất kỳ bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của protein dung hợp thụ thể VEGF trong chế phẩm của sáng chế, ví dụ, bằng cách tiêm trong cơ, tiêm trong khối u, tiêm dưới da hoặc tiêm trong tĩnh mạch. Các bệnh ung thư bao gồm các bệnh có sự phát triển, sự tăng sinh, sự sống và/hoặc sự di căn phụ thuộc ở mức độ nhất định vào sự tạo mạch. Theo một phương án của sáng chế, bệnh ung thư là bệnh ung thư kết-trục tràng, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư da, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư não, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư gan hoặc tụy.

Do đó, sáng chế mô tả các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn ở

mắt do sự tạo mạch ở đối tượng cần điều trị bao gồm bước sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) (ví dụ, khoảng 4, 6, hoặc 8,0, 8,1, 8,4 hoặc 8,5mg), ví dụ, trong chế phẩm được theo sáng chế, qua đường trong mắt, ví dụ, vào thủy tinh thể, của mắt đối tượng. Theo một phương án của sáng chế, cả hai mắt được cho sử dụng protein dung hợp thụ thể VEGF. Theo một phương án của sáng chế, liều có hiệu quả điều trị của protein dung hợp thụ thể VEGF được sử dụng trong khoảng thời gian mỗi 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần, 6 tuần, 7 tuần, 8 tuần, 9 tuần, 10 tuần, 11 tuần, 12 tuần, 13 tuần, 14 tuần, 15 tuần, 16 tuần, 17 tuần, 18 tuần, 19 tuần, 20 tuần, 21, tuần, 22 tuần, 23 tuần hoặc 24 tuần. Theo một phương án của sáng chế, các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa này được thực hiện khi không có sự tăng huyết áp (tâm thu và/hoặc tâm trương) đáng kể và/hoặc sự phát triển của chứng tăng huyết áp (ví dụ, mức độ 1, mức độ 2 hoặc mức độ 3) và/hoặc áp lực trong mắt của đối tượng cao bất thường. Theo một phương án của sáng chế, phương pháp nêu trên bao gồm bước, sau khi sử dụng, theo dõi sự tăng huyết áp (tâm thu và/hoặc tâm trương) đáng kể và/hoặc sự phát triển của chứng tăng huyết áp (ví dụ, mức độ 1, mức độ 2 hoặc mức độ 3) và/hoặc áp lực trong mắt cao bất thường của đối tượng.

Chế độ sử dụng

Chế phẩm được theo sáng chế chứa protein dung hợp thụ thể VEGF có thể được sử dụng theo các hệ cung cấp đã được chấp thuận trong y học đã biết. Theo các phương án ở đây, các hệ cung cấp này có thể bao gồm việc sử dụng chế phẩm cho bệnh nhân bằng cách tiêm vào mắt, trong mắt, trong màng mạch, trong thủy tinh thể hoặc dưới kết mạc. Theo cách khác, chế phẩm được của sáng chế cũng có thể được sử dụng cho bệnh nhân qua đường khu trú, ví dụ, thuốc nhỏ mắt, gel bôi mắt, thuốc mỡ tra mắt, và dạng tương tự. Các đường giải phóng khác có thể cung cấp chế phẩm theo sáng chế bao gồm trong chân bì, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi, ngoài màng cứng và đường miệng.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp tiêm trong thủy tinh thể của chế phẩm được theo sáng chế bao gồm bước tiêm vào mắt bằng bơm tiêm và kim tiêm (ví dụ, kim tiêm cỡ 30-gauge) chứa chế phẩm và tiêm chế phẩm này (ví dụ, với thể tích nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 100 microlít; khoảng 40, 50, 55, 56, 57, 57,1, 58, 60, 70 hoặc 75 microlít) vào thủy tinh thể của mắt (ví dụ, với thể tích đủ để cung cấp lượng có hiệu quả điều trị của protein dung hợp thụ thể VEGF, ví dụ, khoảng 4, 5, 6,

7, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 hoặc 8,9, 9, 10, 12, 14, 16, 18 hoặc 20mg protein dung hợp thụ thể VEGF). Tùy ý, phương pháp này bao gồm các bước sử dụng chất gây tê tại chỗ (ví dụ, proparacain, lidocain hoặc tetracain), chất kháng sinh (ví dụ, floquinolon), chất sát khuẩn (ví dụ, povidon-iot) và/hoặc chất làm giãn đồng tử cho mắt cần được tiêm. Theo một phương án của sáng chế, vùng xung quanh mắt cần được tiêm được tạo vô khuẩn trước khi tiêm. Theo một phương án của sáng chế, sau khi tiêm trong thủy tinh thể, đối tượng được theo dõi về sự tăng áp lực trong mắt và/hoặc huyết áp. Theo một phương án của sáng chế, mắt còn lại cũng được tiêm bằng quy trình tương tự.

Lượng protein dung hợp thụ thể VEGF cần được sử dụng

Mỗi liều của protein dung hợp thụ thể VEGF nồng độ cao cho đối tượng trong quá trình điều trị có thể chứa lượng bằng nhau hoặc gần như bằng nhau của protein dung hợp. Theo cách khác, lượng của một liều bất kỳ có thể khác hoặc thay đổi trong quá trình điều trị.

Lượng hữu hiệu hoặc lượng có hiệu quả điều trị của protein dung hợp thụ thể VEGF để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư (ví dụ, bệnh ít nhất một phần do sự tạo mạch làm trung gian gây ra) hoặc rối loạn ở mắt do sự tạo mạch để chỉ lượng protein dung hợp thụ thể VEGF đủ để làm thoái triển, làm ổn định hoặc loại bỏ bệnh ung thư hoặc rối loạn ở mắt do sự tạo mạch, ví dụ, bằng cách làm thoái triển, làm ổn định hoặc loại bỏ một hoặc nhiều triệu chứng hoặc dấu hiệu phân biệt của bệnh ung thư hoặc rối loạn ở mắt do sự tạo mạch ở mức độ xác định được trong lâm sàng bất kỳ, ví dụ, đối với rối loạn ở mắt do sự tạo mạch, bằng cách làm giảm hoặc duy trì điểm số mức độ nặng của bệnh võng mạc do đái tháo đường (DRSS), bằng cách cải thiện hoặc duy trì thị lực (ví dụ, theo thị lực được hiệu chỉnh tốt nhất, ví dụ, khi được xác định bằng phương pháp tăng kích thước chữ cái ETDRS), tăng hoặc duy trì trường nhìn và/hoặc làm giảm hoặc duy trì độ dày của võng mạc trung tâm và, đối với bệnh ung thư, làm ngừng hoặc đảo ngược sự phát triển, sự sống và/hoặc sự di căn của các tế bào ung thư ở đối tượng. Theo một phương án của sáng chế, lượng hữu hiệu hoặc lượng có hiệu quả điều trị của protein dung hợp thụ thể VEGF để điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn ở mắt do sự tạo mạch nằm trong khoảng từ khoảng 0,5mg đến khoảng 10mg hoặc từ 0,5mg đến khoảng 20mg trong mỗi liều, bao gồm: lớn hơn hoặc bằng khoảng 0,5mg; hoặc lớn hơn hoặc bằng khoảng 2mg, ví dụ, khoảng 2,1mg; 2,2mg; 2,3mg;

2,4mg; 2,5mg; 2,6mg; 2,7mg; 2,8mg; 2,9mg; 3,0mg; 3,1mg; 3,2mg; 3,3mg; 3,4mg; 3,5mg; 3,6mg; 3,7mg; 3,8mg; 3,9mg; 4,0mg; 4,1mg; 4,2mg; 4,3mg; 4,4mg; 4,5mg; 4,6mg; 4,7mg; 4,8mg; 4,9mg; 5,0mg; 5,1mg; 5,2mg; 5,3mg; 5,4mg; 5,5mg; 5,6mg; 5,7mg; 5,8mg; 5,9mg; 6,0mg; 6,1mg; 6,2mg; 6,3mg; 6,4mg; 6,5mg; 6,6mg; 6,7mg; 6,8mg; 6,9mg; 7,0mg; 7,1mg; 7,2mg; 7,3mg; 7,4mg; 7,5mg; 7,6mg; 7,7mg; 7,8mg; 7,9mg; 8,0mg; 8,1mg; 8,2mg; 8,3mg; 8,4mg; 8,5mg; 8,6mg; 8,7mg; 8,8mg; 8,9mg; 9mg; 9,1mg; 9,2mg; 9,3mg; 9,4mg; 9,5mg; 9,6mg; 9,7mg; 9,8mg; 9,9mg; 10,0mg; 10,1mg; 10,2mg; 10,3mg; 10,4mg; 10,5mg; 10,6mg; 10,7mg; 10,8mg; 10,9mg; 11mg; 11,1mg; 11,2mg; 11,3mg; 11,4mg; 11,5mg; 11,6mg; 11,7mg; 11,8mg; 11,9mg; 12mg; 12,1mg; 12,2mg; 12,3mg; 12,4mg; 12,5mg; 12,6mg; 12,7mg; 12,8mg; 12,9mg; 13mg; 13,1mg; 13,2mg; 13,3mg; 13,4mg; 13,5mg; 13,6mg; 13,7mg; 13,8mg; 13,9mg; 14mg; 14,1mg; 14,2mg; 14,3mg; 14,4mg; 14,5mg; 14,6mg; 14,7mg; 14,8mg; 14,9mg; 15mg; 15,1mg; 15,2mg; 15,3mg; 15,4mg; 15,5mg; 15,6mg; 15,7mg; 15,8mg; 15,9mg; 16mg; 16,1mg; 16,2mg; 16,3mg; 16,4mg; 16,5mg; 16,6mg; 16,7mg; 16,8mg; 16,9mg; 17mg; 17,1mg; 17,2mg; 17,3mg; 17,4mg; 17,5mg; 17,6mg; 17,7mg; 17,8mg; 17,9mg; 18mg; 18,1mg; 18,2mg; 18,3mg; 18,4mg; 18,5mg; 18,6mg; 18,7mg; 18,8mg; 18,9mg; 19mg; 19,1mg; 19,2mg; 19,3mg; 19,4mg; 19,5mg; 19,6mg; 19,7mg; 19,8mg; 19,9mg; hoặc 20mg. Theo một phương án của sáng chế, lượng hữu hiệu hoặc lượng có hiệu quả điều trị của protein dung hợp thụ thể VEGF để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư bằng khoảng 4 mg/kg (ví dụ, qua đường trong tĩnh mạch). Liều này có thể được sử dụng, ví dụ, mỗi 2 tuần.

Theo một phương án của sáng chế, protein dung hợp thụ thể VEGF được sử dụng trong thể tích đủ để cung cấp liều mong muốn của protein dung hợp, ví dụ, như đã bàn luận trên đây. Theo một phương án của sáng chế, thể tích được cung cấp (ví dụ, để điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn ở mắt do sự tạo mạch, ví dụ, bằng cách tiêm trong thủy tinh thể) là nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 100 microlít (ví dụ, thể tích ở khoảng bất kỳ trong số các thể tích sau: 25 microlít; 26 microlít; 27 microlít; 28 microlít; 29 microlít; 30 microlít; 31 microlít; 32 microlít; 33 microlít; 34 microlít; 35 microlít; 36 microlít; 37 microlít; 38 microlít; 39 microlít; 40 microlít; 41 microlít; 42 microlít; 43 microlít; 44 microlít; 45 microlít; 46 microlít; 47 microlít; 48 microlít; 49 microlít; 50 microlít; 51 microlít; 52 microlít; 53 microlít; 54 microlít; 55 microlít; 56 microlít; 57 microlít; 58 microlít; 59 microlít; 60 microlít; 61 microlít; 62 microlít; 63 microlít; 64

microlít; 65 microlít; 66 microlít; 67 microlít; 68 microlít; 69 microlít; 70 microlít; 71 microlít; 72 microlít; 73 microlít; 74 microlít; 75 microlít; 76 microlít; 77 microlít; 78 microlít; 79 microlít; 80 microlít; 81 microlít; 82 microlít; 83 microlít; 84 microlít; 85 microlít; 86 microlít; 87 microlít; 88 microlít; 89 microlít; 90 microlít; 91 microlít; 92 microlít; 93 microlít; 94 microlít; 95 microlít; 96 microlít; 97 microlít; 98 microlít hoặc 99 microlít).

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm được sử dụng (ví dụ, để điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn ở mắt do sự tạo mạch, ví dụ, bằng cách tiêm trong thủy tinh thể) với thể tích nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 60 microlít, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 70 microlít hoặc nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 75 microlít hoặc nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 100 microlít. Ví dụ, theo một phương án của sáng chế, khoảng 2, 4, 6, 8,0, 8,1, từ 8,0 đến 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 hoặc 8,9, 9,0 hoặc 10mg protein dung hợp thụ thể VEGF được sử dụng với thể tích bằng khoảng 50, 60, 70 hoặc 75 microlít.

Phạm vi của sáng chế cũng bao gồm phương pháp cung cấp 0,5 hoặc 2mg protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, để điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn ở mắt do sự tạo mạch, ví dụ, bằng cách tiêm trong thủy tinh thể) trong chế phẩm được của sáng chế với thể tích nhỏ như nhỏ hơn 50 μ l (ví dụ, khoảng 1, 5, 10, 17, 17,5, 18, 18,5, 20, 30, 40 hoặc 45 μ l).

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm chứa hoặc gồm hoặc chủ yếu bao gồm “thể tích liều dùng đơn” của chế phẩm được theo sáng chế, nghĩa là thể tích chứa liều đơn của protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept) trong chế phẩm được của sáng chế (ví dụ, khoảng 50 μ l hoặc 60 μ l, 70 μ l hoặc 75 μ l hoặc thể tích bất kỳ chứa khoảng 4, 6, 8 hoặc 10mg protein dung hợp thụ thể VEGF). Như được bàn luận dưới đây, đồ chứa (ví dụ, lọ hoặc dụng cụ tiêm) chứa thể tích liều dùng đơn, tùy ý, chứa một lượng nhỏ thể tích vượt liều của chế phẩm, cũng là một phần của sáng chế.

Đồ chứa và dụng cụ tiêm

Chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF với nồng độ cao theo các phương án ở đây (ví dụ, chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm từ A đến KKKK) có thể được bao gói sẵn hoặc nạp sẵn vào các đồ chứa và dụng cụ tiêm hữu ích khác nhau. Do đó, sáng chế bao gồm các đồ chứa và dụng cụ tiêm chứa các chế phẩm này. Theo một phương án ở đây, đồ chứa là lọ có thể được vô khuẩn. Theo phương án khác ở đây, đồ chứa là ống nghiệm có thể được vô khuẩn. Theo một phương án của sáng

chế, dụng cụ tiêm (có thể được vô khuẩn) là bơm tiêm (ví dụ, bơm tiêm được nạp sẵn thuốc hoặc dụng cụ tiêm tự động). Theo một phương án của sáng chế, dụng cụ tiêm là thuốc cấy trong thủy tinh thể, ví dụ, thuốc cấy trong thủy tinh thể có thể nạp lại.

Bơm tiêm “được nạp sẵn thuốc” là bơm tiêm được nạp đầy chế phẩm của sáng chế trước khi bán hoặc sử dụng bởi bác sĩ hoặc bệnh nhân.

Thuật ngữ “vô khuẩn” ở đây để chỉ sự vô khuẩn hoặc không chứa hoặc gần như không chứa tất cả hoặc toàn bộ các vi sinh vật sống và bào tử của chúng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, bơm tiêm bao gồm cả ống được làm bằng, ví dụ, thủy tinh hoặc polyme, ví dụ, xycloolefin như được mô tả trong công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2017/0232199, tài liệu này được kết hợp vào đây cho tất cả các mục đích, pit tông và kim tiêm.

Các đồ chứa và dụng cụ tiêm có thể được phủ bằng silicon (ví dụ, dầu silicon hoặc silicon nung (ví dụ, với lượng $\leq 40\mu\text{g}$ hoặc $\leq 100\mu\text{g}$)).

Theo một phương án của sáng chế, đồ chứa hoặc dụng cụ tiêm gần như không chứa kim loại hoặc gần như không chứa vonfram hoặc chứa hàm lượng vonfram rất nhỏ.

Theo một phương án của sáng chế, bơm tiêm chứa một hoặc nhiều vạch chia liều và/hoặc hệ định lượng liều.

Đồ chứa theo các phương án của sáng chế có thể đựng chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF với nồng độ cao. Theo một số khía cạnh, đồ chứa hoặc dụng cụ tiêm có thể có nhãn ghi rõ chỉ định sử dụng. Trong một số trường hợp, đồ chứa hoặc dụng cụ tiêm ở đây có thể có tờ hướng dẫn sử dụng như được mô tả trong toàn bộ bản mô tả này.

Theo các phương án khác, thể tích chứa một hoặc nhiều liều (ví dụ, 2 hoặc nhiều hơn 2) của protein dung hợp thụ thể VEGF nồng độ cao (ví dụ, trong đó liều này chứa 2mg, 4mg, 6mg, 8mg hoặc 10mg protein dung hợp thụ thể VEGF), như đã mô tả trên đây, có thể được bao gói từ trước vào đồ chứa hoặc dụng cụ tiêm, ví dụ, bơm tiêm vô khuẩn, ví dụ, để bảo quản cho đến khi sử dụng. Theo một ví dụ, thể tích trong đồ chứa liều đơn của protein dung hợp thụ thể VEGF tùy ý còn bao gồm một lượng nhỏ thể tích vượt liều. Các bơm tiêm vô khuẩn đã nạp sẵn thuốc có thể được duy trì trong các điều kiện bảo quản (ví dụ, từ 2°C đến 8°C), ví dụ, trong tối đa 12 tháng, 24 tháng hoặc 36 tháng. Thể tích vượt liều là thể tích dư có nghĩa để đủ để cho phép lấy ra

và/hoặc sử dụng thể tích thích hợp. Theo một phương án của sáng chế, đồ chứa có thể tích liều dùng đơn hoặc nhiều thể tích liều dùng và thể tích vượt liều nằm trong khoảng từ khoảng từ 5% đến 10%.

Kích thước bơm tiêm có thể là, ví dụ, loại 0,3 cc (0,3ml), 0,5 cc (0,5ml) hoặc 1 cc (1ml). Bơm tiêm vô khuẩn thường có kim tiêm hữu ích để tiêm vào mắt, thường có chiều dài khoảng $\frac{1}{2}$ in (1,27cm), hoặc từ 12,5mm đến 16mm, và có thể có kích thước cỡ 29 gauge, 30 gauge, 31 gauge, 32 gauge hoặc 33 gauge, tùy theo sự lựa chọn của bệnh nhân và chuyên gia chăm sóc sức khỏe. Các chiều dài và cỡ kim khác có thể được sử dụng, miễn là kim này hữu ích trong việc tiến hành tiêm trong thủy tinh thể.

Mặc dù sáng chế đã được thể hiện và mô tả cụ thể cùng với nhiều phương án, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng có thể tiến hành các thay đổi về hình thức và chi tiết đối với các phương án khác nhau được bộc lộ ở đây mà vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế và các phương án khác nhau được bộc lộ ở đây không làm giới hạn phạm vi của yêu cầu bảo hộ.

Chế phẩm bổ sung

Sáng chế đề xuất các chế phẩm sau đây chứa protein dung hợp thụ thể VEGF (ví dụ, aflibercept hoặc conbercept) với nồng độ lớn hơn 40 mg/ml và:

(a) chất đệm chứa muối histidin (ví dụ, histidin-HCl hoặc histidin-axetat, ví dụ, từ 10mM đến 50mM) và có độ pH nằm trong khoảng từ 5,7 đến 6,2; đường như sucroza, trehaloza, manitol hoặc glucoza (ví dụ, với nồng độ cao hơn 6%, nhưng không quá 10%); chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm polysorbat 20 và polysorbat 80 (ví dụ, với nồng độ từ 0% đến 0,1%);

(b) chất đệm chứa histidin như L-histidin/histidin hydroclorua (ví dụ, nồng độ 10mM); chất hoạt động bề mặt không ion như polysorbat 20 (ví dụ, nồng độ 0,03%), muối vô cơ như NaCl (ví dụ, nồng độ 40mM), và hydrat cacbon như sucroza (ví dụ, nồng độ 5%), ví dụ, độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,5 (ví dụ, 6,2 hoặc 6,5);

(c) axit xitric (ví dụ, nồng độ 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM hoặc 30mM), sucroza (ví dụ, nồng độ 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% hoặc 10%), arginin (ví dụ, nồng độ 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM, 30mM, 35mM, 40mM, 45mM hoặc 50mM hoặc 100mM), và polysorbat 20 (ví dụ, nồng độ 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09% hoặc 0,10%);

(d) chất đệm như phosphat, histidin, axetat, succinat, xitrat, glutamat, và/hoặc lactat (ví dụ, với nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 20 hoặc từ 5 đến 50mM); chất hoạt động bề mặt không ion như polysorbat (ví dụ, PS20 hoặc PS80), polyetylen glycol dodexyl ete, poloxame, 4-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)phenyl-polyetylen glycol, alkylsacarit hoặc alkylglycosit, chất tạo đẳng trương như polyol hoặc axit amin, ví dụ, sucroza, trehaloza, sorbitol, manitol, glyxerol, prolin, arginin, methionin, glyxin, hoặc lysin, trong đó chế phẩm này có nồng độ mol/kg nước dung dịch cuối bằng khoảng 300 mOsm/kg, và trong đó nồng độ của anion clorua nhỏ hơn khoảng 10mM; độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5; hoặc

(e) natri phosphat 10mM, natri clorua 40mM, polysorbat 20 0,03%, và sucroza 5%, độ pH = 6,2.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các nỗ lực được tiến hành để đảm bảo độ chính xác đối với các chữ số được sử dụng, tuy nhiên cần tính đến một số sai số và độ lệch khi thử nghiệm. Chế phẩm bất kỳ được nêu trong các ví dụ này đều là một phần của sáng chế.

Trong các ví dụ này, khi một thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C, thì nhiệt độ được hướng đích là 5°C với dung sai cho phép là $\pm 3^\circ\text{C}$.

Ví dụ 1: Chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF 80 mg/ml duy trì hiệu lực, tính ổn định lý học và điện tích trong khoảng thời gian 36 tháng

Loạt gồm bốn chế phẩm khác nhau chứa protein dung hợp thụ thể VEGF (aflibercept) 80 mg/ml được thử nghiệm về hiệu lực trong thời gian dài, tính ổn định vật lý và sự phát triển các biến thể mang điện tích. Danh sách thành phần của mỗi chế phẩm trong số bốn chế phẩm này được thể hiện trong Bảng 1-1. Mỗi chế phẩm được đánh giá về tỷ lệ tạo ra các hợp chất HMW của protein dung hợp thụ thể VEGF trong quá trình bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong 36 tháng, cũng như đánh giá về tỷ lệ % của các hợp chất chính bằng phương pháp SE-UPLC. Mỗi chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF cũng được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp hội tụ đẳng điện mao quản bằng hình ảnh trong cùng khoảng thời gian và

nhệt độ. Cuối cùng, hiệu lực của mỗi chế phẩm được thử nghiệm bằng thử nghiệm sinh học trong cùng khoảng thời gian và nhiệt độ.

Bảng 1-1. Các chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF

Chế phẩm	VEGFT (mg/ml)	Natri phosphat (mM)	Histidin (mM)	Sucroza (trọng lượng/thể tích)	Polysorbat 20 (trọng lượng/thể tích)	Natri clorua (mM)	Độ pH
F1 (B)	80	10	NA	5	0,03	40	6,2
F2 (H)	80	10	NA	8	0,03	0	6,2
F3 (D)	80	NA	10	5	0,03	40	6,2
F4 (G)	80	NA	10	8	0,03	0	6,2

Bảng 1-2. Tỷ lệ % của các hợp chất HMW

	Chế phẩm B	Chế phẩm H	Chế phẩm D	Chế phẩm G
	Chế phẩm 1	Chế phẩm 2	Chế phẩm 3	Chế phẩm 4
Số tháng ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C				
0,0	1,7	1,6	1,6	1,3
1	2,1	2,1	1,6	1,7
2,0	2,3	2,2	1,8	1,8
3,0	2,4	2,5	2,0	2,1
6,0	2,9	2,8	2,0	2,3
9,0	3,1	3,0	2,2	2,4
12,0	2,8	3,0		2,4
18,0	3,2	3,2	2,6	2,5
24,0	3,6	3,6	3,1	2,8
36,0	4,2	4,2	3,2	3,2

Bảng 1-3. Tỷ lệ % đỉnh chính

	Chế phẩm B	Chế phẩm H	Chế phẩm D	Chế phẩm G
--	------------	------------	------------	------------

	Chế phẩm 1	Chế phẩm 2	Chế phẩm 3	Chế phẩm 4
Số tháng ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C				
0,0	98,4	98,4	98,4	98,8
1	97,9	98,0	98,4	98,3
2,0	97,7	97,8	98,2	98,2
3,0	97,7	97,5	98,0	98,0
6,0	97,1	97,2	97,9	97,7
9,0	96,9	97,0	97,8	97,6
12,0	97,2	97,0		97,4
18,0	96,8	96,8	97,4	97,5
24,0	96,5	96,4	96,8	97,2
36,0	95,7	95,7	96,8	96,8

Bảng 1-4. Tỷ lệ % hợp chất có tính axit

	Chế phẩm B	Chế phẩm H	Chế phẩm D	Chế phẩm G
	Chế phẩm 1	Chế phẩm 2	Chế phẩm 3	Chế phẩm 4
Số tháng ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C				
0,0	15,8	15,1	16,0	15,2
12	15,6	15,9	NP	16,0
24,0	16,0	17,1	16,2	16,9
36,0	16,9	17,4	17,2	17,6

Bảng 1-5. Tỷ lệ % hợp chất chính

	Chế phẩm B	Chế phẩm H	Chế phẩm D	Chế phẩm G
	Chế phẩm 1	Chế phẩm 2	Chế phẩm 3	Chế phẩm 4
Số tháng ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C				

0,0	78,9	79,1	79,2	79,9
12	79,3	79,3	NP	79,7
24,0	79,3	78,5	79,5	79,3
36,0	78,6	78,1	78,7	78,6

Số liệu được thể hiện trên các hình vẽ Fig.1A, Fig.1B, Fig.1C và Fig.1D. Fig.1A thể hiện tỷ lệ % các hợp chất HMW trong protein dung hợp thụ thể VEGF được tạo ra đối với mỗi chế phẩm trong số bốn chế phẩm. VEGF Trap có tỷ lệ tạo ra các hợp chất HMW chậm hơn một chút khi chế phẩm chứa chất trên cơ sở histidin, so với natri phosphat. Như được thể hiện trên Fig.1A, tỷ lệ % các hợp chất HMW sau khi bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C trong 36 tháng tăng lên 2,6% trong chế phẩm chứa natri phosphat (các chế phẩm 1 và 2), so với tỷ lệ tăng từ 1,6 đến 1,9% trong chất đệm histidin (chế phẩm 3 và 4). Như được thể hiện trên Fig.1B, số liệu này được khẳng định, khi phương pháp SE-UPLC được sử dụng để xác định tỷ lệ % các hợp chất chính có mặt trong protein dung hợp thụ thể VEGF trong cùng khung thời gian và khoảng nhiệt độ. Để làm điểm so sánh, các thử nghiệm được thực hiện đối với chế phẩm hiện có trên thị trường EYLEA® (40 mg/ml) chứa natri phosphat 10mM, có tỷ lệ % các hợp chất HMW tăng lên 1,2% sau khi bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C trong 36 tháng (không được thể hiện trên hình vẽ). Ngoài ra, mỗi chế phẩm trong số bốn chế phẩm VEGF TRAP 80 mg/ml được thử nghiệm về hiệu lực và so sánh với hoạt tính của EYLEA® (không được thể hiện trên hình vẽ). Hiệu lực được duy trì bằng thử nghiệm sinh học đối với cả bốn chế phẩm cũng như EYLEA®. Các số liệu này cho thấy rằng các chế phẩm ở đây có thể duy trì tính ổn định của protein dung hợp thụ thể VEGF tương đương với sản phẩm EYLEA®.

Theo Fig.1C và Fig.1D, tỷ lệ các biến thể mang điện tích của VEGF TRAP được tạo ra sau khi bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C trong 36 tháng cũng được thử nghiệm. Fig.1C cho thấy rằng VEGF TRAP trong các chế phẩm từ 1 đến 4 không có sự thay đổi có ý nghĩa về tỷ lệ % các hợp chất có tính axit trong khoảng thời gian 36 tháng, và Fig.1D thể hiện kết quả phát hiện tương tự về tỷ lệ % các hợp chất chính trong khoảng thời gian 36 tháng. Việc phát hiện được rằng VEGF TRAP vẫn duy trì các hợp chất biến thể mang điện tích trong khi bảo quản cho thấy rằng chất lượng của VEGF TRAP được duy trì và các quá trình như loại nhóm amin,

tạo ra pyroglutamat ở đầu tận cùng N, sự isome hóa, sự kết tụ, v.v. không xảy ra trong quá trình với các thông số bảo quản.

Số liệu trong Ví dụ 1 cho thấy rằng các chế phẩm có nồng độ VEGF TRAP cao gấp đôi được tìm thấy trong sản phẩm EYLEA®, có thể duy trì được tính ổn định vật lý, chất lượng và hiệu lực trong khoảng thời gian 36 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Ngoài ra, mặc dù cả bốn chế phẩm đều có hiệu lực tương tự theo thời gian, các chế phẩm chứa histidin có tỷ lệ tạo ra các hợp chất HMW tăng lên ở mức thấp hơn một chút (dấu hiệu của sự thoái biến protein), điều này cho thấy rằng trong một số trường hợp, histidin có thể là chất đệm được lựa chọn. Tuy nhiên, đã phát hiện được rằng cả chất đệm trên cơ sở histidin và phosphat đều có tính ổn định rất tốt trong suốt quá trình nghiên cứu.

Ví dụ 2: Tính ổn định của VEGF TRAP 150 mg/ml trong chế phẩm chứa chất đệm natri phosphat/sucroza

Hai chế phẩm chứa natri phosphat được thử nghiệm về tính ổn định vật lý của VEGF Trap (aflibercept) 150 mg/ml ở nhiệt độ 37°C trong 28 ngày. Danh sách thành phần của mỗi chế phẩm trong hai chế phẩm này được thể hiện trong Bảng 2-1. Mỗi chế phẩm được đánh giá về tỷ lệ tạo ra các hợp chất HMW trong quá trình bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong 28 ngày cũng như đánh giá về tỷ lệ các hợp chất chính bằng phương pháp SE-UPLC.

Bảng 2-1. Các chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF (aflibercept) dùng cho Ví dụ 2

Chế phẩm	VEGFT (mg/ml)	Natri phosphat (mM)	Sucroza (trọng lượng/thể tích)	Polysorbat 20 (trọng lượng/thể tích)	Arginin- HCl (mM)	Độ pH
F1 (T)	150	10	8%	0,03	N/A	6,2
F2 (JJJJ)	150	10	8%	0,03	50	6,2

Bảng 2-2. Tỷ lệ % hợp chất HMW

Natri phosphat 10mM, sucroza 8%, polysorbat 20	Natri phosphat 10mM, sucroza 8%, polysorbat 20 0,03%, L-arginin
---	--

	0,03%, độ pH = 6,2	monohydroclorua 50mM, độ pH = 6,2
	Phosphat	Phosphat-Arginin
Số ngày ở nhiệt độ 37°C		
0,0	2,4	1,9
7	6,4	6,1
14,0	8,4	8,3
21,0	10,4	10,5
28,0	12,2	12,5

Bảng 2-3. Tỷ lệ % đỉnh chính

	Natri phosphat 10mM, sucroza 8%, polysorbat 20 0,03%, độ pH = 6,2	Natri phosphat 10mM, sucroza 8%, polysorbat 20 0,03%, L-arginin monohydroclorua 50mM, độ pH = 6,2
	Phosphat	Phosphat-Arginin
Số ngày ở nhiệt độ 37 °C		
0,0	97,6	98,1
7	93,6	93,9
14,0	91,0	91,1
21,0	88,9	89,0
28,0	87,1	86,9

Fig.2A cho thấy rằng không có sự khác biệt có ý nghĩa của tỷ lệ % các hợp chất HMW được tạo ra giữa hai chế phẩm trong quá trình bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong 28 ngày, điều này được khẳng định bởi tỷ lệ % các hợp chất chính theo phương pháp SE-UPLC (Fig.2B). Không có sự thay đổi về vẻ bề ngoài, độ đục hoặc độ pH của hai chế phẩm trong suốt 28 ngày (không được thể hiện trên hình vẽ).

Sau đó, các kết quả được so sánh với chế phẩm có bổ sung EYLEA® 40 mg/ml, và chế phẩm 1 của Ví dụ 1 (VEGF TRAP 80 mg/ml trong chất đệm natri phosphat). Như dự đoán, các chế phẩm VEGF TRAP 150 mg/ml có tỷ lệ % tạo ra các hợp chất HMW cao hơn so với chế phẩm EYLEA®, và tỷ lệ % tạo ra các hợp chất HMW cao hơn một chút so với chế phẩm 1 của Ví dụ 1.

Tiến hành thử nghiệm thêm đối với các chế phẩm chứa VEGF TRAP nồng độ cao, và chế phẩm chứa histidin có mức độ bảo vệ các phân tử này tốt hơn so với mức độ bảo vệ của các chế phẩm trên cơ sở natri phosphat. Ngoài ra, trên thực tế, việc bổ sung natri clorua vào mỗi chế phẩm được thử nghiệm gây ra sự mất ổn định của VEGF TRAP ở nhiệt độ 37°C. Các số liệu trong Ví dụ 2 cho thấy rằng ngay cả khi protein dung hợp thụ thể VEGF ở nồng độ cao 150 mg/ml, và bảo quản ở nhiệt độ khá khắc nghiệt, các chế phẩm theo sáng chế vẫn tạo ra sự bảo vệ rất tốt cho tính ổn định vật lý.

Ví dụ 3: Độ nhớt của chế phẩm được dung có thể đạt được với VEGF TRAP 150 mg/ml

Nhiều chế phẩm chứa VEGF Trap (aflibercept) được thử nghiệm về đặc tính độ nhớt của chúng. Các chế phẩm chứa VEGF Trap với nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mg/ml đến 160 mg/ml được thử nghiệm về sự có mặt và không có mặt của các chất làm giảm độ nhớt khác nhau.

Fig.3A cho thấy các chế phẩm chứa VEGF Trap 155 mg/ml trong chất đệm natri phosphat 10mM, sucroza 5% và độ pH = 6,2 kết hợp với, không có mặt muối vô cơ, arginin, lysin, natri clorua và magie clorua có sự khác biệt nhỏ về độ nhớt. Trong mỗi trường hợp, độ nhớt được xác định theo đơn vị cP ở nhiệt độ 20°C. Quan sát được độ nhớt nằm trong khoảng từ khoảng 17cP (không có muối vô cơ) và 15cP (magie clorua 100mM), có sự thay đổi rất nhỏ giữa trường hợp chất làm giảm độ nhớt được sử dụng, hoặc với sự có mặt của tất cả các chất làm giảm độ nhớt. Fig.3B cho thấy loạt các chế phẩm tương tự, ngoại trừ việc chất đệm bazơ là histidin 10mM và độ pH = 5,8. Ở đây, khi không có mặt muối vô cơ bất kỳ, tạo ra chế phẩm có độ nhớt bằng 11,5cP, và khi có mặt lysin 50mM, độ nhớt bằng 14 cP. Chất đệm chứa histidin tạo ra độ nhớt rất tốt, điều này thích hợp với các sản phẩm tiêm sinh học có nồng độ thấp khác.

Fig.3C thể hiện độ nhớt của VEGF Trap ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mg/ml đến 160 mg/ml, với natri phosphat 10mM, sucroza 5% ở độ pH = 6,2 khi không có mặt arginin, và trong arginin hydroclorua 50mM. Việc bổ sung chất làm giảm độ nhớt tạo ra độ nhớt tương tự đối với tất cả các nồng độ VEGF Trap được thử nghiệm. Như được thể hiện trên Fig.3A và Fig.3B, chất làm giảm độ nhớt có ít ảnh hưởng tích cực đối với độ nhớt của chế phẩm, ngay cả với nồng độ protein cao hơn. Đây là kết quả bất ngờ, do arginin và các chất làm giảm độ nhớt khác đã được chứng minh trước đây là có các đặc tính có lợi đối với độ nhớt của protein nồng độ cao.

Bảng 3-1. Chế phẩm chứa phosphat –độ nhớt (tính theo cP ở nhiệt độ 20°C)

Hỗn hợp chất đậm	Natri phosphat 10mM, sucroza 5%, độ pH = 6,2
Không có chất làm giảm độ nhớt	17,3
Arginin 100mM	16,2
Arginin 200mM	15,8
Lysin 50mM	16,2
Natri clorua 100mM	16,5
Magie clorua 50mM	16,3
Magie clorua 100mM	15,3

Bảng 3-2. Chế phẩm chứa histidin-độ nhớt (tính theo cP ở nhiệt độ 20°C)

Hỗn hợp chất đậm	Histidin 10mM, độ pH = 5,8
Không có chất làm giảm độ nhớt	11,5
Arginin 100mM	12,0
Arginin 200mM	12,7
Lysin 50mM	14,0
Lysin 200mM	14,1
Natri clorua 50mM	13,1
Natri clorua 100mM	12,1
Magie clorua 50mM	12,6
Magie clorua 100mM	11,4

Ví dụ 4: Arginin hydroclorua cải thiện tính ổn định của VEGF TRAP 150 mg/ml trong chế phẩm chứa chất đậm natri phosphat/sucroza.

Hai chế phẩm chứa natri phosphat được thử nghiệm về tính ổn định vật lý của VEGF Trap 150 mg/ml (aflibercept) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C trong 12 tháng. Danh sách thành phần của mỗi chế phẩm trong số hai chế phẩm này được thể hiện trong Bảng 4-1. Chế phẩm 2 còn chứa arginin hydroclorua 50mM. Mỗi chế phẩm được đánh giá về tỷ lệ tạo ra hợp chất HMW trong quá trình bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong 12 tháng cũng như tỷ lệ hợp chất chính bằng phương pháp SE-UPLC.

Bảng 4-1. Chế phẩm chứa protein dung hợp thụ thể VEGF (aflibercept) của Ví

dự 3

Chế phẩm	VEGFT (mg/ml)	Natri phosphat (mM)	Sucroza (trọng lượng/thể tích)	Polysorbat 20 (trọng lượng/thể tích)	Độ pH	Arginin hydroclorua (mM)
F1 (T)	150	10	8%	0,03	6,2	0
F2 (JJJJ)	150	10	8%	0,03	6,2	50

Fig.4A cho thấy rằng việc bổ sung arginin hydroclorua 50mM vào chế phẩm cải thiện tính ổn định vật lý của VEGF TRAP. Thuộc tính làm ổn định đối với VEGF TRAP này được khẳng định trên Fig.4B, trong đó tỷ lệ % hợp chất chính vẫn cao hơn đối với VEGF TRAP khi có mặt arginin hydroclorua 50mM. Số liệu này cho thấy rằng các trường hợp mà trong đó việc bổ sung arginin hydroclorua tạo ra hiệu quả làm ổn định cho VEGF TRAP được bảo quản. Số liệu sắc ký loại trừ theo kích cỡ được thể hiện ở dạng bảng trong Bảng 4-2 và 4-3.

Bảng 4-2. Tỷ lệ % các hợp chất HMW

	Natri phosphat 10mM, sucroza 8%, polysorbat 20 0,03%, độ pH = 6,2	Natri phosphat 10mM, sucroza 8%, polysorbat 20 0,03%, L-arginin monohydroclorua 50mM, độ pH = 6,2
Số tháng ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C		
0,0	2,4	1,9
1	3,3	2,8
2,0	3,8	3,2
3,0	4,1	3,5
6,0	4,9	4,1
9,0	5,5	4,7
12,0	5,9	5,0

Bảng 4-3. Tỷ lệ % đỉnh chính

	Natri phosphat 10mM, sucroza 8%, polysorbat 20 0,03%, độ pH = 6,2	Natri phosphat 10mM, sucroza 8%, polysorbat 20 0,03%, L-arginin monohydroclorua 50mM, độ pH = 6,2
Số tháng ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C		
0,0	97,6	98,1
1	96,8	97,2
2,0	96,2	96,8
3,0	95,9	96,5
6,0	95,1	95,8
9,0	94,5	95,3
12,0	94,1	94,5

Ví dụ 5: Độ nhớt của VEGF TRAP ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mg/ml đến 170 mg/ml trong các chất đệm histidin và phosphat

Fig.5 cho thấy rằng cả chất đệm phosphat 10mM và chất đệm 10mM histidin đều có độ nhớt hữu ích ở mức cao trong khoảng nồng độ của VEGF Trap (aflibercept). Với nồng độ VEGF Trap cao hơn, chất đệm histidin có sự cải thiện về độ nhớt (so với phosphat). Độ nhớt được xác định ở nhiệt độ 20°C.

Ví dụ 6: Taurin và axit propan sulfonic tạo ra tính ổn định được cải thiện cho các chế phẩm chứa VEGF Trap (aflibercept) nồng độ cao

Thử nghiệm được tiến hành để xác định sự tác động đến tính ổn định của protein với một số tổ hợp chế phẩm. Fig.6 thể hiện biểu đồ tán xạ ánh sáng động học của các chế phẩm bất kỳ có nồng độ protein (aflibercept) nằm trong khoảng từ 2 mg/ml đến 10 mg/ml. Các chế phẩm được bổ sung taurin 70mM hoặc PSA 70mM có khả năng tự tương tác giảm đi ở nồng độ cao hơn. Các số liệu này cho thấy rằng taurin và PSA có thể là chất bổ sung hữu ích vào chế phẩm chứa protein nồng độ cao, giống như các chất được đề cập trong trường hợp này.

Ví dụ 7: Nghiên cứu về tính ổn định trong thời gian dài của các chế phẩm chứa histidin khác nhau

Tổng cộng có 9 chế phẩm aflibercept khác nhau được thử nghiệm với nồng độ chất đệm khác nhau, chất ổn định nhiệt và muối kỵ nước. 9 chế phẩm từ F1 đến F9 được tóm tắt trong Bảng 7-1 dưới đây.

Bảng 7-1. Các chế phẩm từ F1 đến F9

Chế phẩm	VEGFT (mg/ml)	Loại chất đệm	Nồng độ chất đệm (mM)	Sucroza (% trọng lượng/thể tích)	Prolin (%) trọng lượng/thể tích	Polysorbat 20 (trọng lượng/thể tích)	Chất ổn định (mM)	Nồng độ chất ổn định (mM)	Độ pH
F1 (WW)	140	His	10	5	0	0,03	Taurin	50	5,8
F2 (XX)	140	His	20	0	4	0,03	Arginin HCl	50	5,8
F3 (YY)	140	His	20	2,5	2	0,03	Taurin	50	5,8
F4 (ZZ)	140	His	10	2,5	2	0,03	Arginin HCl	50	5,8
F5 (AAA)	140	His	20	5	0	0,03	PSA	50	5,8
F6 (BBB)	140	His	20	2,5	2	0,03	PSA	50	5,8
F7 (CCC)	140	His	20	5	0	0,03	Arginin HCl	50	5,8
F8 (DDD)	140	His	10	0	4	0,03	PSA	50	5,8
F9 (EEE)	140	His	20	5	0	0,03	NA	NA	5,8

VEGFT=VEGF Trap (aflibercept)

Mười bốn (14) ml của mỗi chế phẩm được trộn lẫn trong ống Falcon có dung tích 15ml. Sau đó, chế phẩm này được lọc khử khuẩn bằng cách sử dụng bộ lọc kiểu

bơm tiêm cỡ 0,22 μ M và được nạp vào các lọ thủy tinh loại 1 vô khuẩn có dung tích 2ml. Tám (8) lọ này được nạp mỗi chế phẩm với thể tích 0,4ml trong tủ hút kiểu dòng chảy tầng.

Phương pháp SE-UPLC (hợp chất theo trọng lượng phân tử) được thực hiện đối với tất cả các mẫu để xác định tính ổn định hóa học của mỗi chế phẩm.

Tỷ lệ % của các hợp chất HMW trong mỗi chế phẩm từ F1 đến F9 theo thời gian được thể hiện trên Fig.7 (cũng xem Bảng 7-2). Các chế phẩm F4 và F7 có tỷ lệ % các hợp chất HMW thấp nhất sau 4 tháng ở nhiệt độ 5°C. Các kết quả này cho thấy rằng việc bổ sung các tá dược như arginin và prolin làm giảm đáng kể tỷ lệ % tạo ra các hợp chất HMW trong chế phẩm chứa VEGF Trap.

Bảng 7-2. Phân tích bằng phương pháp SE-UPLC (ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C)

	F1 (WW)		F2 (XX)		F3 (YY)	
Số tháng ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính
0,0	1,53	98,46	1,48	98,52	1,39	98,61
0,5	1,87	98,13	1,87	98,13	1,92	98,08
1,0	2,19	97,81	2,16	97,84	2,19	96,15
2,0	2,64	97,36	2,63	97,37	2,71	97,29
3,0	2,83	97,17	2,76	97,24	2,87	97,13
4,0	3,07	96,93	3,00	97,00	3,11	96,89
5,0	3,24	96,76	3,11	96,89	3,28	96,72
6,0	3,35	96,65	3,24	96,76	3,38	96,62

F4 (ZZ)		F5 (AAA)		F6 (BBB)	
Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính
1,31	98,69	1,55	98,45	1,45	98,55
1,69	98,31	1,79	98,21	1,96	98,04
1,95	98,05	2,31	97,69	2,26	97,74

2,37	97,63	2,80	97,20	2,72	97,28
2,61	97,39	2,99	97,01	2,91	97,09
2,84	97,16	3,26	96,74	3,17	96,83
3,03	96,97	3,44	96,56	3,35	96,65
3,13	96,87	3,52	96,48	3,41	96,59

F7 (CCC)		F8 (DDD)		F9 (EEE)	
Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính
1,20	98,80	1,56	98,44	1,53	98,47
1,74	98,26	1,87	98,13	2,05	97,95
2,08	97,92	2,16	97,84	2,39	97,61
2,52	97,48	2,59	97,41	2,89	97,11
2,76	97,24	2,80	97,20	3,07	96,93
2,97	97,03	3,06	96,94	3,34	96,66
3,14	96,86	3,21	96,79	3,51	96,49
3,26	96,74	3,28	96,72	3,69	96,31

Ví dụ 8: Nghiên cứu tính ổn định của VEGF Trap 140 mg/ml với nồng độ arginin khác nhau.

Sự ảnh hưởng của nồng độ arginin-HCl khác nhau đối với tính ổn định của bốn sản phẩm được là thuốc mắt VEGF Trap (aflibercept) 140 mg/ml được nghiên cứu. Việc đánh giá tính ổn định được thực hiện với điều kiện bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C. Sản phẩm thuốc (drug product: DP) cũng được ủ trong điều kiện stress (37°C). Bốn chế phẩm được đánh giá trong nghiên cứu về tính ổn định này (từ F1 đến F4) được mô tả trong Bảng 8-1 được thể hiện dưới đây.

Bảng 8-1. Các chế phẩm từ F1 đến F4

Chế phẩm số	Thành phần						
	VEGFT	Histidin	Sucroza	(trọng	Polysorbat	L-	Độ

	(mg/ml)	(mM)	lượng/thể tích)	20	arginin	pH
F1	140	20	5	0,03	0	5,8
F2					10	
F3					50	
F4					100	

Khoảng 145ml chế phẩm histidin chứa VEGF Trap 187 mg/ml được rửa đông. Ba mươi sáu (36) ml của mỗi chế phẩm, ngoại trừ chế phẩm F3, được trộn lẫn; 39ml chế phẩm F3 làm thành phần chính được trộn lẫn. Mỗi chế phẩm được lọc khử khuẩn bằng tủ hút kiểu dòng chảy tầng (laminar flow hood: LFH) bằng cách sử dụng bộ lọc khử khuẩn PVDF Durapore cỡ 0,22µm trước khi nạp đầy. Lọ thủy tinh sạch Schott loại I có dung tích 2ml đã được loại bỏ chất gây sốt được đầy bằng nắp đầy huyết thanh loại 13mm (S2-F451 4432/50B2-40) được sử dụng để thực hiện nghiên cứu về tính ổn định.

Tiến hành phân tích các chế phẩm bằng phương pháp SE-UPLC như đã nêu trên đây. Kết quả xác định tỷ lệ % HMW, bằng cách sử dụng phương pháp SE-UPLC, trong mỗi chế phẩm theo thời gian được thể hiện trên Fig.8 (A-B). Xem thêm các Bảng 8-2 và 8-3.

Khi được bảo quản ở nhiệt độ 5°C, các chế phẩm này có sự giảm tỷ lệ % tạo ra các hợp chất HMW tương ứng với nồng độ arginin-HCl. Tuy nhiên, trong điều kiện stress, hiệu quả này bị đảo ngược. Các chế phẩm ở nhiệt độ 37°C, có sự tăng lên rõ ràng về tỷ lệ % các hợp chất HMW tương ứng với nồng độ arginin-HCl. Đặc tính này làm cho rất khó phát hiện các tác dụng có lợi của arginin đối với aflibercept khi có mặt chất đệm histidin. Thông thường, để phát triển chế phẩm trong ngành công nghệ sinh học, tác dụng của các tá dược khác nhau đối với dược chất được sàng lọc ban đầu trong điều kiện stress (ví dụ, ở nhiệt độ cao như 37°C) trong một khoảng thời gian ngắn. Mục đích của phương pháp này là để loại bỏ nhanh chóng các tá dược không có khả năng hoạt động tốt khi không có mặt điều kiện stress (ví dụ, ở nhiệt độ thấp như 5°C) trong khoảng thời gian dài hơn. Ở đây, arginin được xác định là tá dược hữu ích bất kể tác dụng của nó đối với tính ổn định ở nhiệt độ 37°C. Do sản phẩm thuốc được bảo chế thường được bảo quản trong nhiều tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4 đến 5°C sau khi sản xuất, aflibercept trong chất đệm arginin và histidin sẽ là chế phẩm

có giá trị cao để bảo quản sản phẩm thuốc ổn định trong thời gian dài.

Bảng 8-2. Phân tích bằng phương pháp SE-UPLC (ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C)

	F1 (EEE)		F2 (SSS)	
Số tháng ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW
0,0	97,79	2,21	97,78	2,22
0,5	97,56	2,43	97,59	2,41
1,0	97,30	2,70	97,34	2,66
1,5	97,21	2,79	97,26	2,74
2,0	97,05	2,95	97,08	2,92
2,5	96,96	3,04	97,02	2,98
3,0	96,82	3,18	96,88	3,12
6,0	96,35	3,65	96,40	3,60

F3 (CCC)		F4 (TTT)	
Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW
97,85	2,15	97,81	2,19
97,67	2,33	97,73	2,27
97,47	2,53	97,59	2,41
97,37	2,63	97,50	2,50
97,22	2,78	97,36	2,64
97,14	2,86	97,31	2,69
97,04	2,96	97,16	2,84
96,60	3,40	96,77	3,23

Bảng 8-3. Phân tích SE-UPLC (ở nhiệt độ 37°C)

	F1 (EEE)		F2 (SSS)	
Số ngày ở nhiệt độ	Tỷ lệ % đỉnh	Tỷ lệ %	Tỷ lệ % đỉnh	Tỷ lệ %

37°C	chính	HMW	chính	HMW
0,0	97,79	2,21	97,78	2,22
7	93,66	6,34	93,32	6,68
14,0	89,48	10,35	88,79	10,98
21,0	86,64	13,08	85,69	13,82
28,0	83,90	15,85	82,66	16,90

F3 (CCC)		F4 (TTT)	
Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW
97,85	2,15	97,81	2,19
92,38	7,61	91,32	8,68
86,90	12,91	84,61	15,21
83,11	16,65	80,11	19,47
79,44	20,29	75,80	23,91

Ví dụ 9: Tính ổn định của VEGF Trap khi có mặt các ion đối từ dãy Hofmeister và các tá dược khác

Tác dụng của các ion đối khác nhau và các tá dược khác đối với tính ổn định của một số chế phẩm được xác định.

A. Sàng lọc ion đối

Các ion đối (ví dụ, sulfat, thioxyanat và xitrat) được thử nghiệm ở dạng các muối natri với chế phẩm VEGF Trap (aflibercept) nồng độ cao (140 mg/ml). Ngoài ra, các tá dược bổ sung amino khác (ví dụ, glyxin và lysin) cũng được thử nghiệm.

Khoảng 42ml được chất dùng cho mắt VEGF Trap 187 mg/ml được rã đông. 50ml được chất được bào chế làm sản phẩm trung gian (155,56 mg/ml), có nồng độ của dược chất được bào chế 140 mg/ml là 110% và nồng độ tá dược đích (loại trừ các ion đối, glyxin và lysin), được tạo ra.

Dược chất được bào chế làm sản phẩm trung gian được pha loãng thêm bằng dung dịch tá dược gốc 0,5M (các ion đối, glyxin hoặc lysin) để tạo ra chế phẩm chứa dược chất được bào chế 140 mg/ml được liệt kê trong Bảng 9-1 dưới đây. Mỗi chế phẩm cuối được lọc khử khuẩn bằng bộ lọc kiểu bơm tiêm PVDF cỡ 0,22µm trong tủ

hút kiểu dòng chảy tăng trước khi nạp vào các lọ thủy tinh sạch Schott loại I có dung tích 2ml đã được loại bỏ chất gây sốt được đậy bằng nắp đậy huyết thanh loại 13mm S2-F451 4432/50 82-40 (ELN item# 19700004 Wash# 0 000078949). Sáu mươi (60) lọ được nạp 0,5 ml của mỗi chế phẩm. Sáu (6) lọ được nạp 1,5ml.

Bảng 9-1. Các chế phẩm dùng để sàng lọc ion đổi

Tá dược (mM)	Chế phẩm	Nồng độ VEGF Trap
Natri sulfat 50mM	Histidin 20mM, PS20 0,03%/Sucroza 5%/ Natri sulfat 50mM	140
Natri thioxyanat 50mM	Histidin 20mM, PS20 0,03%/Sucroza 5%/ Natri thioxyanat 50mM	140
Natri xitrat 50mM	Histidin 20mM, PS20 0,03%/Sucroza 5%/ Natri xitrat 50mM	140
Glyxerin 50mM	Histidin 20mM, PS20 0,03%/Sucroza 5%/ Glyxerin 50mM	140
Natri clorua 50mM	Histidin 20mM, PS20 0,03%/Sucroza 5%/ Natri clorua 50mM	140
Lysin 50mM	Histidin 20mM, PS20 0,03%/Sucroza 5%/ Lysin 50mM	140

B. Sàng lọc glutamat và aspartat

Tính ổn định của các chế phẩm chứa VEGF Trap (aflibercept) nồng độ cao (140 mg/ml) khi có mặt các ion đổi kết hợp với arginin hydroclorua được thử nghiệm. Ngoài ra, hai ion đổi mới (glutamat và aspartat) được thử nghiệm về tính tương hợp với VEGF Trap nồng độ cao (khi kết hợp với arginin hydroclorua và khi không có mặt arginin hydroclorua). Các chế phẩm được thử nghiệm được tóm tắt trong Bảng 9-2 dưới đây.

Khoảng 50ml dược chất VEGF Trap 187 mg/ml được rã đông. 60ml dược chất được bào chế làm sản phẩm trung gian (155,56 mg/ml) với dược chất được bào chế 140 mg/ml nồng độ 110% và nồng độ tá dược đích (loại trừ các ion đổi, xitrat, glyxin, glutamat và aspartat) được tạo ra. Dược chất được bào chế làm sản phẩm trung gian được pha loãng thêm bằng các dung dịch tá dược gốc 1M (arginin hydroclorua, natri

xitrat, glyxin, natri glutamat và natri aspartat) để tạo ra các chế phẩm chứa được chất được bào chế nồng độ 140 mg/ml được liệt kê trong bảng dưới đây. Mỗi chế phẩm cuối được lọc khử khuẩn bằng bộ lọc kiểu bơm tiêm PVDF loại 0,22 μ m trong tủ hút kiểu dòng chảy tầng trước khi nạp vào các lọ thủy tinh sạch Schott loại I có dung tích 2ml đã được loại bỏ chất gây sốt được đậy bằng nắp đậy huyết thanh loại 13mm S2-F451 4432/50 B2-40 (ELN item# 19700004 Wash# 0000078949). Sáu mươi (60) lọ được nạp 0,5ml của mỗi chế phẩm. Sáu (6) lọ được nạp 1,5 ml.

Bảng 9-2. Các chế phẩm dùng để sàng lọc glutamat và aspartat

Tá dược (mM)	Chế phẩm	Nồng độ VEGF Trap
Natri xitrat 50mM + Arginin hydroclorua 50mM	Histidin 20mM, PS20 0,03%/Sucroza 5%/Natri xitrat 50mM/Arginin hydroclorua 50mM	140
Glyxin 50mM + Arginin hydroclorua 50mM	Histidin 20mM, PS20 0,03%/Sucroza 5%/Glyxin 50mM/Arginin hydroclorua 50mM	140
Natri aspartat 50mM + Arginin hydroclorua 50mM	Histidin 20mM, PS20 0,03%/Sucroza 5%/Natri aspartat 50mM/Arginin hydroclorua 50mM	140
Natri glutamat 50mM + Arginin hydroclorua 50mM	Histidin 20mM, PS20 0,03%/Sucroza 5%/Natri glutamat 50mM/Arginin hydroclorua 50mM	140
Natri aspartat 50mM	Histidin 20mM, PS20 0,03%/Sucroza 5%/Natri aspartat 50mM	140
Natri glutamat 50mM	Histidin 20mM, PS20 0,03%/Sucroza 5%/Natri glutamat 50mM	140

Việc thử nghiệm độ nhớt được thực hiện bằng cách sử dụng nhớt kế RHEOSENSE m-VROC®. Khoảng 0,5ml mẫu không pha loãng được nạp vào bơm tiêm bằng thủy tinh. Mẫu này được làm cân bằng đến nhiệt độ mong muốn và được tiêm vào chip hoặc khoang đo. Độ nhớt được tính toán bằng cách đo sự giảm áp suất từ đầu vào đến đầu ra, sự giảm này có tương quan với ứng suất cắt ở thành của chip.

Các kết quả được thể hiện theo đơn vị mPas-1 hoặc cp. Xem Fig.9 và Bảng 9-3.

Việc thử nghiệm nồng độ mol/kg nước dung dịch được thực hiện bằng cách sử dụng thăm áp kế của áp suất hơi VAPRO. Khoảng 10 μ l mẫu không pha loãng được cấy vào đĩa giấy. Sự giảm nhiệt độ điểm sương, hàm số của áp suất hơi của dung dịch, được xác định bằng cặp nhiệt độ nhạy và được thể hiện dưới dạng nồng độ mol/kg nước dung dịch của dung dịch này. Các kết quả được thể hiện theo đơn vị mmol/kg hoặc mOsm. Xem Fig.10 và Bảng 9-3.

Lượng các hợp chất có trọng lượng phân tử cao trong một số chế phẩm theo thời gian, sau khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C hoặc 5°C, cũng được đánh giá bằng phương pháp SE-UPLC. Xem Fig.11 (A-B) và các Bảng 9-4 và 9-5.

Các thử nghiệm tán xạ ánh sáng động học được thực hiện bằng cách sử dụng đầu đọc đĩa II của thiết bị DynaPro®. Khoảng 100 μ l mẫu không pha loãng được nạp vào đĩa có 96 lỗ. Thu được ba mươi lăm kết quả đối với mỗi lỗ ở nhiệt độ 25°C. Tiến hành phân tích chức năng tự tương quan bằng cách sử dụng áp dụng quy tắc trên phần mềm DYNAMICS v7.1. Các biểu đồ thể hiện bán kính (nm) so với tỷ lệ % cường độ và tỷ lệ % khối lượng so với bán kính (nm) được tạo ra để thu được bán kính phân tử trung bình và tỷ lệ % tính đa phân tán (tỷ lệ % Pd) của mỗi mẫu. Xem Fig.12.

Bảng 9-3. Độ nhớt và nồng độ mol/kg nước dung dịch của các chế phẩm khác nhau

Thông số được thử nghiệm	Natri sulfat 50mM (GGG)	Natri thioxyanat 50mM (HHH)	Natri xitrat 40mM (III)	Glyxin 50mM (JJJ)	Natri clorua 50mM (KKK)	Lysin 50mM (LLL)
Độ nhớt (cp)	11,9	12,4	14,8	12,2	11,6	11,8
Nồng độ mol/kg nước dung dịch (mOsmol/kg)	384	324	403	299	349	349

Natri aspartat	Natri glutamat	Natri xitrat 50mM	+	Glyxin 50mM	+	Natri Aspartat 50mM	+	Natri glutamat 50mM	+
----------------	----------------	-------------------	---	-------------	---	---------------------	---	---------------------	---

50mM (MMM)	50mM (NNN)	Arginin HCl 50mM (OOO)	Arginin HCl 50mM (PPP)	Arginin HCl 50mM (QQQ)	Arginin HCl 50mM (RRR)
13,0	13,1	14,8	12,5	13,1	13,3
343	346	506	369	426	430

Bảng 9-4. Phân tích bằng phương pháp SE-UPLC; tỷ lệ % HMW (ở nhiệt độ 37°C)

Tỷ lệ % HMW (số ngày ở nhiệt độ 37°C)	Natri sulfat 50mM (GGG)	Natri thioxyanat 50mM (HHH)	Natri xitrat 40mM (III)	Glyxin 50mM (JJJ)	Natri clorua 50mM (KKK)	Lysin 50mM (LLL)
0	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,2
7	8,6	15,5	8,2	6,3	8,1	7,7
14	13,5	24,8	12,1	9,5	12,4	11,7
28	22,0	39,2	19,1	15,3	20,4	19,3

Bảng 9-5. Phân tích bằng phương pháp SE-UPLC; tỷ lệ % HMW (ở nhiệt độ 5°C)

Tỷ lệ % HMW (số tháng ở nhiệt độ 5°C)	Natri sulfat 50mM (GGG)	Natri thioxyanat 50mM (HHH)	Natri xitrat 40mM (III)	Glyxin 50mM (JJJ)	Natri clorua 50mM (KKK)	Lysin 50mM (LLL)
0	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,2
0,25	2,3	2,4	2,4	2,3	2,3	2,3
0,5	2,4	2,5	2,5	2,4	2,4	2,3
1	2,5	2,8	2,7	2,6	2,6	2,5
2	2,8	2,9	2,9	2,8	2,8	2,8
3	3,1	3,3	3,2	3,1	3,2	3,0

Ví dụ 10: Khả năng dung nạp của sự giải phóng VEGF Trap liều cao (140mg/ml) bằng cách tiêm IVT ở thỏ bình thường.

Các chất điều trị kháng VEGF, được sử dụng bằng cách tiêm trong thủy tinh thể, là tiêu chuẩn chăm sóc hiện nay để điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già thể tân mạch, bệnh phù điểm vàng do đái tháo đường, và bệnh tắc mạch võng mạc. Tuy nhiên, việc tiêm trong thủy tinh thể mỗi tháng một lần hoặc hai tháng một lần là gánh nặng điều trị đáng kể đối với bệnh nhân, người chăm sóc, và bác sĩ. Rất cần có các liệu pháp điều trị hiệu quả và lâu dài hơn trong thực hành lâm sàng. Nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng dung nạp của VEGF Trap dạng liều cao được bào chế ổn định (140 mg/ml, tương đương với liều cao gấp 14 lần liều lâm sàng) ở mắt thỏ trắng New Zealand bình thường.

Hai chế phẩm chứa VEGF-Trap liều cao (aflibercept) trong chất đệm histidin hoặc trong chất đệm phosphat được thử nghiệm. Ba con thỏ trong mỗi nhóm được cho sử dụng 7mg VEGF Trap trong 50ul bằng cách tiêm trong thủy tinh thể, mỗi bên một chế phẩm. Các dấu hiệu viêm mắt được theo dõi bằng đèn khe, tiến hành chụp cắt lớp quang học (optical coherence tomography: OCT) và chụp mạch đáy mắt vào ngày 1, ngày 4, tuần 1, sau đó chụp hàng tuần cho đến 12 tuần sau khi sử dụng trong thủy tinh thể. Áp lực trong mắt được đo bằng bút đo nhãn áp Tonopen trước và sau khi tiêm trong thủy tinh thể 10 phút và 30 phút, sau đó đo ở mọi thời điểm tiếp theo. Các con thỏ được gây chết êm ái ở thời điểm tuần 12.

Mắt thỏ được cho sử dụng một trong hai liều:

(1) aflibercept 140 mg/ml, histidin 20mM, sucroza 5%, arginin HCl 50mM, PS20 0,03%, độ pH = 5,8;

hoặc

(2) aflibercept 140 mg/ml, natri phosphat 10mM, sucroza 5%, natri clorua 40mM, PS20 0,03%, độ pH = 6,2.

Hai trong số sáu mắt từ nhóm sử dụng chất đệm histidin có bóng tối trong thủy tinh thể cho đến 8 tuần sau khi tiêm IVT, điều này được khẳng định khi kiểm tra bằng đèn khe dưới dạng bệnh đục thủy tinh thể cục bộ do sự tổn thương thể thủy tinh sau (thủ thuật liên quan). Một trong 6 mắt từ nhóm sử dụng chất đệm phosphat có bóng tối trong thủy tinh thể cho đến 8 tuần sau khi tiêm IVT, điều này được khẳng định khi kiểm tra bằng đèn khe dưới dạng bệnh đục thủy tinh thể cục bộ do sự tổn thương thể

thủy tinh sau (thủ thuật liên quan).

Các chế phẩm chứa VEGF Trap liều cao (140 mg/ml) được thử nghiệm được dung nạp tốt ở mắt thỏ trắng New Zealand bình thường trong vòng 12 tuần sau khi sử dụng trong thủy tinh thể một lần. Sau khi tiêm trong thủy tinh thể một lần với lượng 7mg VEGF Trap, không quan sát thấy dấu hiệu bất thường ở đáy mắt. Thủy tinh thể trong suốt và kiểu mạch của võng mạc xuất hiện bình thường. Không quan sát thấy sự bong võng mạc, sự xuất huyết hoặc sự thay đổi về đầu dây thần kinh thị giác. Không có sự thay đổi về áp lực trong mắt so với mức ban đầu. Hình ảnh chụp mạch huỳnh quang (fluorescein angiography: FA) và OCT ban đầu của mắt thỏ được thể hiện trên Fig.13 (A-D). Hình ảnh FA và OCT theo thời gian của mắt thỏ ở mỗi nhóm điều trị trong 8 tuần được thể hiện trên các hình vẽ Fig.14, Fig.15, Fig.16 và Fig.17. Số liệu thu được từ mắt trái (OS) hoặc mắt phải (OD) của thỏ 326 và 329 được thể hiện.

Ví dụ 11: Đánh giá tính ổn định của các chế phẩm từ UUU đến BBBB

Nghiên cứu này đánh giá tính ổn định của VEGF Trap (aflibercept) 60 mg/ml và 120 mg/ml trong phosphat 10mM, sucroza (Suc.) 10% hoặc 20%, NaCl 0 hoặc 50mM, polysorbat 20 0,03%, độ pH = 6,2 khi được ủ ở nhiệt độ 37°C trong tối đa 6 tháng. Các chế phẩm dùng cho nghiên cứu về tính ổn định này được thể hiện trong Bảng 11-1 dưới đây.

Bảng 11-1. Các chế phẩm từ UUU đến BBBB

Ký hiệu chế phẩm	VEGF Trap (mg/ml)	Sucroza (%)	NaCl (mM)
F1 (UUU)	30	10	-
F2 (VVV)	30	20	-
F3 (WWW)	60	10	-
F4 (XXX)	60	20	-
F5 (YYY)	120	10	-
F6 (ZZZ)	120	20	-
F7 (AAAA)	120	10	50
F8 (BBBB)	120	20	50

Chế phẩm cơ bản: phosphat 10mM, polysorbat 20 0,03%, độ pH = 6,2

VEGF Trap=aflibercept

Các chế phẩm được lọc khử khuẩn bằng bộ lọc PVDF cỡ 0,2µm trong tủ hút

kiểu dòng chảy tầng trước khi phân phối.

Các lọ chứa mỗi chế phẩm được bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong 1 tháng.

Bảng 11-2. Kết quả sắc ký lỏng hiệu năng cao đảo pha (RP-HPLC)

Chế phẩm	Điều kiện bảo quản	Thời gian ủ thực tế (tháng)	Tỷ lệ % VEGFT thu hồi được	VGFT (mg/ml)
Nồng độ 30 mg/ml sucroza 10% (UUU)	37°C	0,0	100,0	29,99
		1,0	97,9	29,37
Nồng độ 30 mg/ml sucroza 20% (VVV)	37°C	0,0	100,0	29,97
		1,0	98,2	29,44
Nồng độ 60 mg/ml sucroza 10% (WWW)	37°C	0,0	100,0	58,90
		1,0	98,3	57,89
Nồng độ 60 mg/ml sucroza 20% (XXX)	37°C	0,0	100,0	58,80
		1,0	98,9	58,18
Nồng độ 120 mg/ml sucroza 10% (YYY)	37°C	0,0	100,0	120,80
		1,0	97,4	117,63
Nồng độ 120 mg/ml sucroza 20% (ZZZ)	37°C	0,0	100,0	117,85
		1,0	98,9	116,51
Nồng độ 120 mg/ml sucroza 10% NaCl 50mM (AAAA)	37°C	0,0	100,0	120,14
		1,0	97,9	117,64
Nồng độ 120 mg/ml sucroza 20% 50mM NaCl (BBBB)	37°C	0,0	100,0	120,55
		1,0	97,0	116,94

VGFT=VEGF Trap, aflibercept

Bảng 11-3. Kết quả sắc ký lỏng siêu hiệu năng loại trừ theo kích cỡ (SE-UPLC)

Chế phẩm	Điều kiện bảo quản	Thời gian ủ thực tế (tháng)	Tổng tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % tự nhiên	Tổng tỷ lệ % LMW
VGFT 30 mg/ml sucroza 10%	37°C	0	0,8	99,0	0,1
		1,0	4,1	94,0	1,9

(UUU)					
VGFT 30 mg/ml		0	0,8	99,0	0,2
sucroza 20% (VVV)	37°C	1,0	2,4	95,6	2,0
VGFT 60 mg/ml		0	1,0	98,8	0,2
sucroza 10% (WWW)	37°C	1,0	7,8	89,5	2,7
VGFT 60 mg/ml		0	1,0	98,8	0,2
sucroza 20% (XXX)	37°C	1,0	4,4	92,8	2,7
VGFT 120 mg/ml		0	1,3	98,5	0,2
sucroza 10% (YYY)	37°C	1,0	18,3	79,5	2,2
VGFT 120 mg/ml		0	1,2	98,5	0,2
sucroza 20% (ZZZ)	37°C	1,0	10,7	87,1	2,2
VGFT 120 mg/ml		0	1,3	98,5	0,2
sucroza 10% NaCl 50mM (AAAA)	37°C	1,0	20,8	77,1	2,2
VGFT 120 mg/ml		0	1,2	98,5	0,3
sucroza 20% NaCl 50mM (BBBB)	37°C	1,0	13,0	84,8	2,2

VGFT=VEGF Trap, aflibercept

Tất cả các chế phẩm đều gần như không chứa hạt khi quan sát bằng mắt thường và khi đo mật độ quang học. Không có sự hao hụt protein đáng kể khi thu hồi bằng phương pháp RP-HPLC sau 1 tháng ở nhiệt độ 37°C (Bảng 11-2) và xu hướng này tiếp tục kéo dài đến 6 tháng.

Con đường thoái biến chính của VEGF Trap là sự kết tụ trong các điều kiện này (Fig.18 (A-B); Bảng 11-3). Tính ổn định của VEGF phụ thuộc vào nồng độ protein và sucroza. Các chế phẩm chứa nồng độ VEGF Trap thấp hơn và nồng độ sucroza cao hơn có tính ổn định hơn. Việc duy trì tỷ lệ protein:sucroza giống nhau không tạo ra tỷ

lệ thoái biến giống nhau. Ví dụ, chế phẩm F1 và F4 có cùng tỷ lệ protein:sucroza bằng 3:1 nhưng chế phẩm F4 có tính ổn định kém hơn so với chế phẩm F1 do nồng độ protein của nó cao hơn. Cũng quan sát được xu hướng tương tự trong vòng 6 tháng.

Ví dụ 12: Nghiên cứu độc chất học trong thủy tinh thể với liều dùng lặp lại ở khỉ với các chế phẩm Aflibercept khác nhau.

Độ an toàn của các chế phẩm khác nhau khi sử dụng ở khỉ cynomolgus được đánh giá trong ví dụ này. Tổng cộng có 7 liều dùng trong thủy tinh thể được sử dụng cho cả hai mắt khoảng 4 tuần một lần (Q4W) cho các nhóm từ 1 đến 3; tổng cộng có 3 liều dùng trong thủy tinh thể được sử dụng cho cả hai mắt khoảng Q4W cho các nhóm từ 4 đến 9. Việc mổ xác khi kết thúc điều trị được thực hiện ở thời điểm khoảng một tuần sau khi sử dụng liều cuối cùng (N=3 con/giới tính/nhóm) cùng với việc mổ xác khi khỏi bệnh (2 con/giới tính/nhóm) ở thời điểm khoảng 12 tuần sau khi sử dụng liều cuối cùng.

Các đánh giá sau đây được thực hiện:

- Đánh giá độ an toàn dựa trên các dấu hiệu lâm sàng, trọng lượng cơ thể, dấu hiệu sinh tồn, số liệu điện tâm đồ (trước khi dùng liều kết thúc việc điều trị và khi khỏi bệnh), đo huyết áp (bằng băng quấn đuôi), bệnh lý lâm sàng và giải phẫu
- Khám mắt toàn diện theo định kỳ trong khoảng thời gian dùng liều và khi phục hồi bao gồm soi đáy mắt gián tiếp bằng kính hiển vi có đèn khe và đo áp lực trong mắt
- Chụp ảnh đáy mắt, chụp mạch huỳnh quang và đo điện võng mạc ký ở thời điểm trước khi điều trị, trong khi nghiên cứu ở tuần 9 (tất cả các nhóm), tuần 26 (chỉ các nhóm từ 1 đến 3) và cuối giai đoạn phục hồi
- Lấy mẫu máu và thủy tinh thể (khi kết thúc) để phân tích sinh học, phân tích ADA và đánh giá động học độc tố

Bảng 13. Tóm tắt về nhóm nghiên cứu*

Nhóm	Chất thử nghiệm	Thể tích liều tiêm IVT (µl/liều)	mg aflibercept/mắt	Số con/giới tính	Số con/giới tính để mổ xác khi kết thúc điều trị	Số con/giới tính để mổ xác khi khỏi bệnh
------	-----------------	----------------------------------	--------------------	------------------	--	--

		dùng/ mắt)				
1	Histidin 20mM, arginin 50mM, sucroza 5%, PS20 0,03%	50	0 (đối chứng)	5	3	2
2	Aflibercept 80 mg/ml trong histidin 20mM, arginin 50mM, sucroza 5%, PS20 0,03%	50	4	5	3	2
3	Aflibercept ~140 mg/ml trong histidin 20mM, arginin 50mM, sucroza 5%, PS20 0,03%	50	~7	5	3	2
4	Histidin 20mM, sucroza 5%, PS20 0,03%	50	0 (đối chứng)	5	3	2
5	Aflibercept 80 mg/ml trong histidin 20mM, sucroza 5%, PS20 0,03%	50	4	5	3	2
6	Aflibercept ~140 mg/ml trong histidin 20mM, sucroza 5%, PS20	50	~7	5	3	2

	0,03%					
7	Histidin 20mM, glyxin 50mM, sucroza 5%, PS20 0,03%	50	0 (đối chứng)	5	3	2
8	Aflibercept 80 mg/ml trong histidin 20mM, glyxin 50mM, sucroza 5%, PS20 0,03%	50	4	5	3	2
9	Aflibercept ~140 mg/ml trong histidin 20mM, glyxin 50mM, sucroza 5%, PS20 0,03%	50	~7	5	3	2

*mỗi chế phẩm trong số các chế phẩm nêu trên là một phần của sáng chế

Dự kiến rằng các chế phẩm được thử nghiệm ở một hoặc nhiều nhóm bất kỳ trong số các nhóm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 và/hoặc 9 sẽ được xác định là có profin độ an toàn tương đương với sản phẩm EYLEA ở khỉ cynomolgous khi được xác định theo các đánh giá đã bàn luận trên đây.

Ví dụ 13: Nghiên cứu về tính ổn định với sản phẩm VEGF Trap

Chế phẩm chứa VEGF Trap (aflibercept) 114,3 mg/ml và histidin 10mM, độ pH = 5,8, sucroza 5%, polysorbat 20 0,03%, arginin monohydroclorua 50mM được tạo ra trong tủ hút kiểu dòng chảy tầng (LFH) bằng cách sử dụng bộ lọc khử khuẩn PVDF Durapore cỡ 0,22µm trước khi nạp đầy. Các lọ thủy tinh sạch Schott, loại I, có dung tích 3ml đã được loại bỏ chất gây sốt được nạp 0,3ml sản phẩm thuốc và được đậy bằng nắp đậy huyết thanh loại 13mm (S2-F451 4432/50B2-40). Các mẫu được phân tích ở các thời điểm khác nhau sau khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C hoặc 5°C về độ tinh khiết bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC) để xác định sự có mặt (theo

tỷ lệ %) của các hợp chất có trọng lượng phân tử cao (HMW), các hợp chất có trọng lượng phân tử thấp (LMW) và đỉnh chính (hợp chất chính); cũng như chụp ảnh dòng tế bào, đếm hạt chất lỏng HIAC (theo mức độ làm mờ ánh sáng) và phương pháp kính hiển vi để xác định sự có mặt của các hạt với kích thước khác nhau.

Số liệu về tính ổn định và độ tinh khiết sau khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C, 25°C và từ 2 đến 8°C được thể hiện trên Fig.19 (A-E). Xem thêm các Bảng từ 13-1 đến 13-4.

Bảng 13-1. Phân tích độ tinh khiết bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC)

37°C			
Số tháng	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % LMW
0	98,23	1,77	0
0,229	92,88	7,07	0,05
0,459	88,59	11,18	0,23
0,688	84,67	15,03	0,3
0,918	81,84	17,59	0,57
5°C			
Số tháng	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % LMW
0	98,23	1,77	0
1	97,73	2,27	0
2	97,4	2,59	0

Bảng 13-2. Chụp ảnh dòng tế vi/các hạt có kích thước nhỏ hơn mức quan sát được bằng mắt thường

37°C					
Số tháng	≥1μm	≥2μm	≥5μm	≥10μm	≥25μm
T=0	1125	234	42	9	0
28 ngày	1128	184	17	0	0

Bảng 13-3. Chất dạng hạt có kích thước nhỏ hơn mức quan sát được bằng mắt

thường khi được xác định bằng phương pháp làm mờ ánh sáng (HIAC)/hạt có kích thước nhỏ hơn mức quan sát được bằng mắt thường

37°C			
Số tháng	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$	$\geq 50\mu\text{m}$
T=0	15	0	0
28 ngày	23	1	1

Bảng 13-4. Phân tích các hạt có kích thước nhỏ hơn mức quan sát được bằng mắt thường bằng phương pháp kính hiển vi

37°C			
Số tháng	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$	$\geq 50\mu\text{m}$
T=0	8	1	1
28 ngày	6	2	1

Ví dụ 14: Nghiên cứu tính ổn định với nồng độ VEGF Trap thay đổi

Sự ảnh hưởng của nồng độ VEGF Trap khác nhau đối với tính ổn định của bốn sản phẩm thuốc mắt VEGF Trap (aflibercept) được nghiên cứu. Nồng độ nằm trong khoảng từ 80 đến 140 mg/ml. Tiến hành đánh giá tính ổn định trong điều kiện bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C. Sản phẩm thuốc (DP) cũng được ủ trong điều kiện stress (37°C). Bốn chế phẩm (mỗi chế phẩm được gọi tên là “CCC” ở đây) được đánh giá trong nghiên cứu về tính ổn định này được mô tả trong Bảng 14-1 được nêu dưới đây.

Khoảng 27ml mỗi chế phẩm được tạo ra trong tủ hút kiểu dòng chảy tầng (LFH) bằng cách sử dụng bộ lọc khử khuẩn PVDF Durapore loại 0,22 μm trước khi nạp. Các lọ thủy tinh sạch Schott loại I có dung tích 2ml đã được loại bỏ chất gây sốt được nạp đầy và đậy bằng nắp đậy huyết thanh loại 13mm (S2-F451 4432/50B2-40). Các mẫu được phân tích ở các thời điểm khác nhau sau khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C hoặc từ 2 đến 8°C về độ tinh khiết bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng loại trừ theo kích cỡ (SE-UPLC) để xác định sự có mặt (tỷ lệ %) của các hợp chất có trọng lượng phân tử cao (HMW) và đỉnh chính (hợp chất chính).

Số liệu cho thấy tỷ lệ % HMW sau khi ủ ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C hoặc 37°C trong tối đa 6 tháng được thể hiện trên Fig.20 (A-B). Xem thêm các Bảng 14-2 và 14-

3. Khi được bảo quản ở nhiệt độ 37°C và 5°C, các chế phẩm này có mối tương quan tích cực giữa tỷ lệ tạo ra HMW với nồng độ VEGF Trap. Chế phẩm nồng độ 140 mg/ml có tỷ lệ % tạo ra các hợp chất HMW cao nhất.

Bảng 14-1. Các chế phẩm được thử nghiệm

Chế phẩm số	Thành phần					
	L-Arginin (mM)	Histidin (mM)	Sucroza (trọng lượng/ thể tích)	Polysorbat 20 (trọng lượng/ thể tích)	VEGFT (mg/ml)	Độ pH
F1 (CCC)	50	20	5	0,03	80	5,8
F2 (CCC)					100	
F3 (CCC)					120	
F4 (CCC)					140	

Bảng 14-2. Phân tích bằng phương pháp SE-UPLC (ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C)

	F1 (CCC): 80 mg/ml		F2 (CCC): 100 mg/ml		F4 (CCC): 120 mg/ml		F3 (CCC): 140 mg/ml	
Số tháng ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW	Tỷ lệ % đỉnh chính	Tỷ lệ % HMW
0,0	97,90	2,10	97,86	2,14	97,83	2,17	97,85	2,15
1	97,91	2,09	97,79	2,21	97,65	2,35	97,47	2,53
2,0	97,78	2,22	97,56	2,44	97,38	2,62	97,22	2,78
3,0	97,61	2,39	97,38	2,62	97,17	2,83	97,04	2,96
5,5	97,39	2,61	97,10	2,90	96,79	3,21		
6,0	97,36	2,64	97,04	2,96	96,74	3,26	96,60	3,40

Bảng 14-3. Phân tích bằng phương pháp SE-UPLC (ở nhiệt độ 37°C)

	F1 (CCC): 80 mg/ml		F2 (CCC): 100 mg/ml		F4 (CCC): 120 mg/ml		F3 (CCC): 140 mg/ml	
Số ngày ở nhiệt	Tỷ lệ % đỉnh	Tỷ lệ %	Tỷ lệ % đỉnh	Tỷ lệ %	Tỷ lệ % đỉnh	Tỷ lệ %	Tỷ lệ % đỉnh	Tỷ lệ %

độ 37°C	chính	HMW	chính	HMW	chính	HMW	chính	HMW
0,0	97,90	2,10	97,86	2,14	97,83	2,17	97,85	2,15
7	94,83	5,15	93,82	6,17	92,81	7,18	92,38	7,61
14,0	92,00	7,77	90,31	9,39	88,67	11,13	86,90	12,91
21,0	89,47	10,31	87,00	12,58	85,04	14,85	83,11	16,65
28,0	86,76	12,71	83,98	15,55	81,19	18,46	79,44	20,29

Ví dụ 15: Sản phẩm Eylea liều cao có thời gian tác dụng kéo dài trong mô hình D,L-AAA về tình trạng rò rỉ dịch ở tân mạch kéo dài

Hiệu quả của việc tăng liều gấp bốn lần đối với thời gian tác dụng của aflibercept để ức chế tình trạng rò rỉ dịch ở mạch võng mạc mạn tính trong mô hình D,L-AAA được xác định trong ví dụ này.

Các động vật được sử dụng là thỏ trắng New Zealand sau khi gây bệnh bằng DL-AAA (DL- α -axit aminadipic) 3 tháng. Các nhóm điều trị bao gồm:

- Plaxebo (chất đệm của chế phẩm) 50 mcl/mắt; n= 6 mắt
- Aflibercept 500 mcg/mắt trong 50 mcl; n= 7 mắt
- Aflibercept 2 mg/mắt trong 50 mcl; n= 8 mắt

Chế phẩm được sử dụng trong mỗi nhóm điều trị là: histidin 10mM, sucroza 8%, PS20 0,03%, độ pH = 5,8. Các lần khám mắt được thực hiện lúc ban đầu và ở thời điểm 1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 13 và 18 tuần, bao gồm đo áp lực trong mắt (IOP), hình ảnh không đỏ (red-free: RF) (để xác định hình thái mạch máu), chụp mạch huỳnh quang (FA); để xác định tình trạng rò rỉ dịch ở mạch), chụp cắt lớp quang học (OCT); để xác định tình trạng viêm thủy tinh thể). Mẫu huyết thanh (ADA) và huyết tương (nồng độ dược chất) được lấy ở thời điểm ban đầu và ở các thời điểm 1, 2, 4, 6 và 9 tuần.

Số liệu thu được từ các lần kiểm tra FA của mỗi nhóm được thể hiện trên Fig.21. Các số liệu này chứng minh rằng tác dụng ức chế sự rò rỉ dịch ở mạch võng mạc của các động vật được cho sử dụng aflibercept liều cao hơn kéo dài hơn ở các động vật được cho sử dụng liều thấp hơn. Số lượng mắt được điều trị trong đó tính thấm qua mạch được ức chế hoàn toàn ở nhóm sử dụng liều 2mg là cao hơn đáng kể ở tất cả các thời điểm lấy mẫu cho đến 18 tuần sau khi dùng liều.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm được chứa nước chứa:

aflibercept ở nồng độ ít nhất khoảng 100 mg/ml;
khoảng 5% sucroza;
L-arginin;
dung dịch đệm dựa trên histidin; và
khoảng 0,03% chất hoạt động bề mặt;
trong đó chế phẩm được này có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,8.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này thích hợp để sử dụng trong thủy tinh thể.

3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa natri sulfat, natri thioxyanat, glyxin, NaCl, natri aspartat và/hoặc natri glutamat.

4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó aflibercept ở nồng độ:

- khoảng 100 mg/ml;
- khoảng 111,5 mg/ml;
- khoảng 112,0 mg/ml;
- khoảng 113,3 mg/ml;
- khoảng 114,3 mg/ml;
- khoảng 115,6 mg/ml;
- khoảng 116,3 mg/ml;
- khoảng 120 mg/ml;
- khoảng 133 mg/ml;
- khoảng 140 mg/ml;
- khoảng 150 mg/ml;
- khoảng 200 mg/ml; hoặc
- khoảng 250 mg/ml.

5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó:

(i) nồng độ mol/kg nước dung dịch nằm trong khoảng từ khoảng 299 đến khoảng 506mmol/kg; và/hoặc

(ii) độ nhớt nằm trong khoảng từ khoảng 6 đến 15cP ở nhiệt độ 20°C.

6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 6,5.

7. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó độ pH bằng khoảng 5,8.

8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt không ion.

9. Chế phẩm theo điểm 8, trong đó chất hoạt động bề mặt không ion chọn từ nhóm bao gồm polysorbat 20, polysorbat 80, poloxame 188, polyetylen glycol 3350 và hỗn hợp của chúng.

10. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó dung dịch đệm dựa trên histidin là histidin hydroclorua.

11. Chế phẩm theo điểm 10, trong đó chế phẩm này chứa dung dịch đệm dựa trên histidin với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10mM đến 20mM.

12. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó L-arginin là L-arginin monohydroclorua.

13. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó aflibercept có ít hơn khoảng 3,5% các loại có trọng lượng phân tử cao ngay sau khi sản xuất, và tinh chế và/hoặc ít hơn hoặc bằng khoảng 6% các loại có trọng lượng phân tử cao sau khi bảo quản khoảng 24 tháng ở khoảng 2-8°C.

14. Chế phẩm được chứa nước chứa:

aflibercept ở nồng độ ít nhất khoảng 100 mg/ml;

khoảng 10-100 nM L-arginin;

sucroza;

dung dịch đệm dựa trên histidin; và

chất hoạt động bề mặt;

trong đó chế phẩm được này có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,8;

trong đó aflibercept có ít hơn khoảng 3,5% các loại có trọng lượng phân tử cao ngay sau khi sản xuất, và tinh chế và/hoặc ít hơn hoặc bằng khoảng 6% các loại có trọng lượng phân tử cao sau khi bảo quản khoảng 24 tháng ở khoảng 2-8°C.

15. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó chế phẩm này được nạp vào vật chứa hoặc thiết bị tiêm.

16. Chế phẩm theo điểm 15, trong đó thiết bị tiêm này là xy lanh nạp sẵn thuốc.

17. Phương pháp bào chế chế phẩm theo điểm 14 bao gồm bước kết hợp aflibercept, L-arginin, sucroza, dung dịch đệm dựa trên histidin và chất hoạt động bề mặt thành một chế phẩm chứa nước duy nhất.

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước nạp một thể tích chế phẩm nêu trên vào trong xy lanh.

19. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó aflibercept ở nồng độ:

- khoảng 100 mg/ml;
- khoảng 111,5 mg/ml;
- khoảng 112,0 mg/ml;
- khoảng 113,3 mg/ml;
- khoảng 114,3 mg/ml;
- khoảng 115,6 mg/ml;
- khoảng 116,3 mg/ml;
- khoảng 120 mg/ml;
- khoảng 133 mg/ml;
- khoảng 140 mg/ml;
- khoảng 150 mg/ml;
- khoảng 200 mg/ml; hoặc

- khoảng 250 mg/ml.

20. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó chế phẩm này bao gồm 103 - 126 mg/ml aflibercept, 10 ± 1 mM dung dịch đệm dựa trên histidin, $5 \pm 0,5\%$ (trọng lượng/thể tích) sucroza, 0,02-0,04% (trọng lượng/thể tích) polysorbate 20 và 50 ± 5 mM L-arginin monohydroclorua, với độ pH khoảng từ 5,5 đến 6,1.

21. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó chế phẩm này bao gồm 114,3 mg/ml aflibercept, 10 mM dung dịch đệm dựa trên histidin, 5% (trọng lượng/thể tích) sucroza, 0,03% (trọng lượng/thể tích) polysorbate 20 và 50 mM L-arginin monohydroclorua, với độ pH là 5,8.

22. Xy lanh nạp sẵn thuốc chứa chế phẩm theo điểm 20.

23. Chế phẩm theo điểm 14, trong đó chế phẩm này gồm có 114,3 mg/ml aflibercept, 10 mM dung dịch đệm dựa trên histidin, 5% (trọng lượng/thể tích) sucroza, 0,03% (trọng lượng/thể tích) polysorbate 20 và 50 mM L-arginin monohydroclorua, với độ pH là 5,8.

1/37

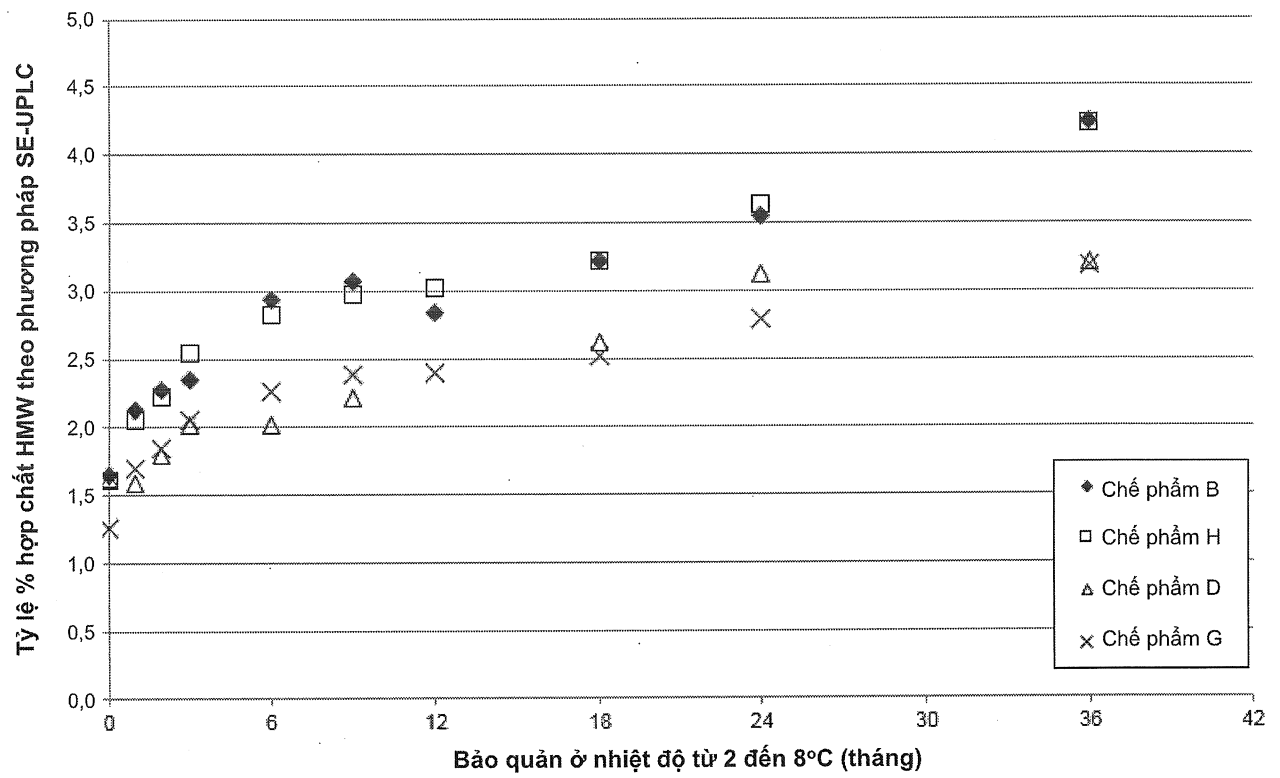


FIG. 1A

2/37

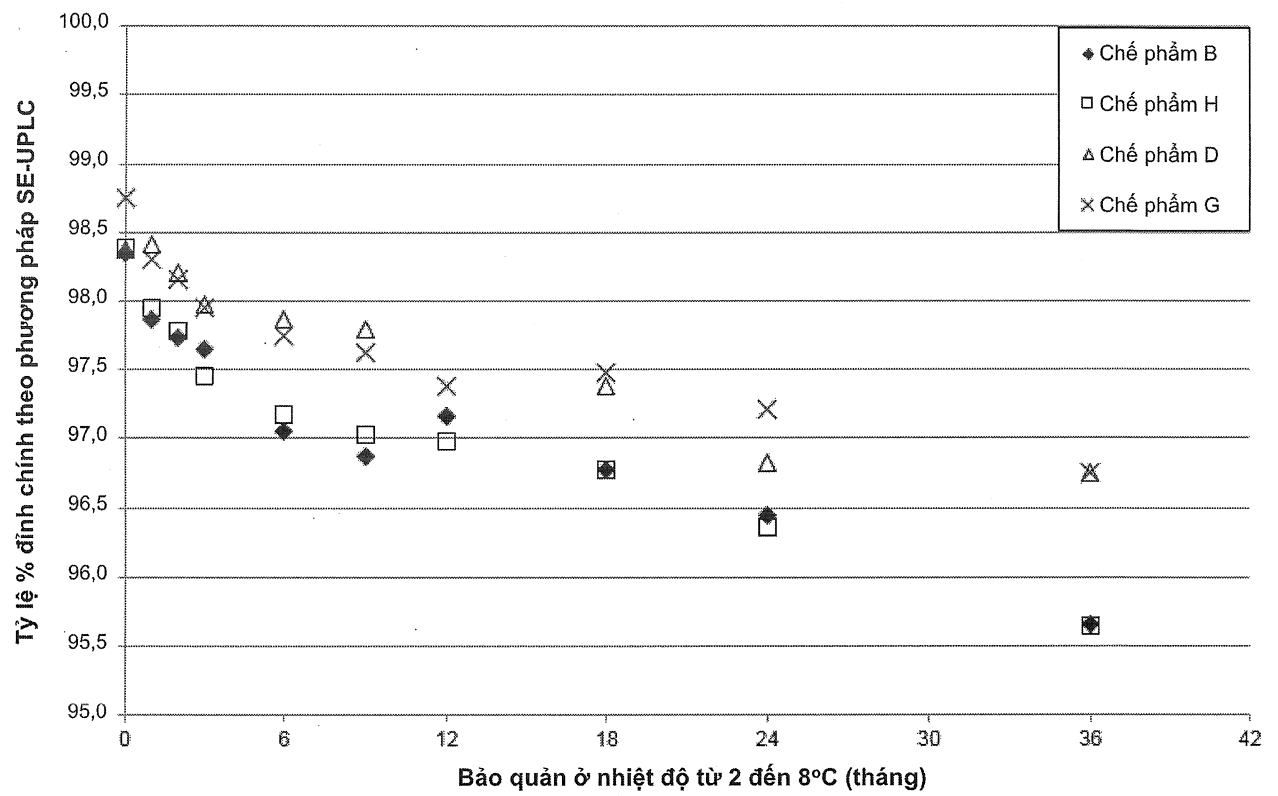


FIG. 1B

3/37

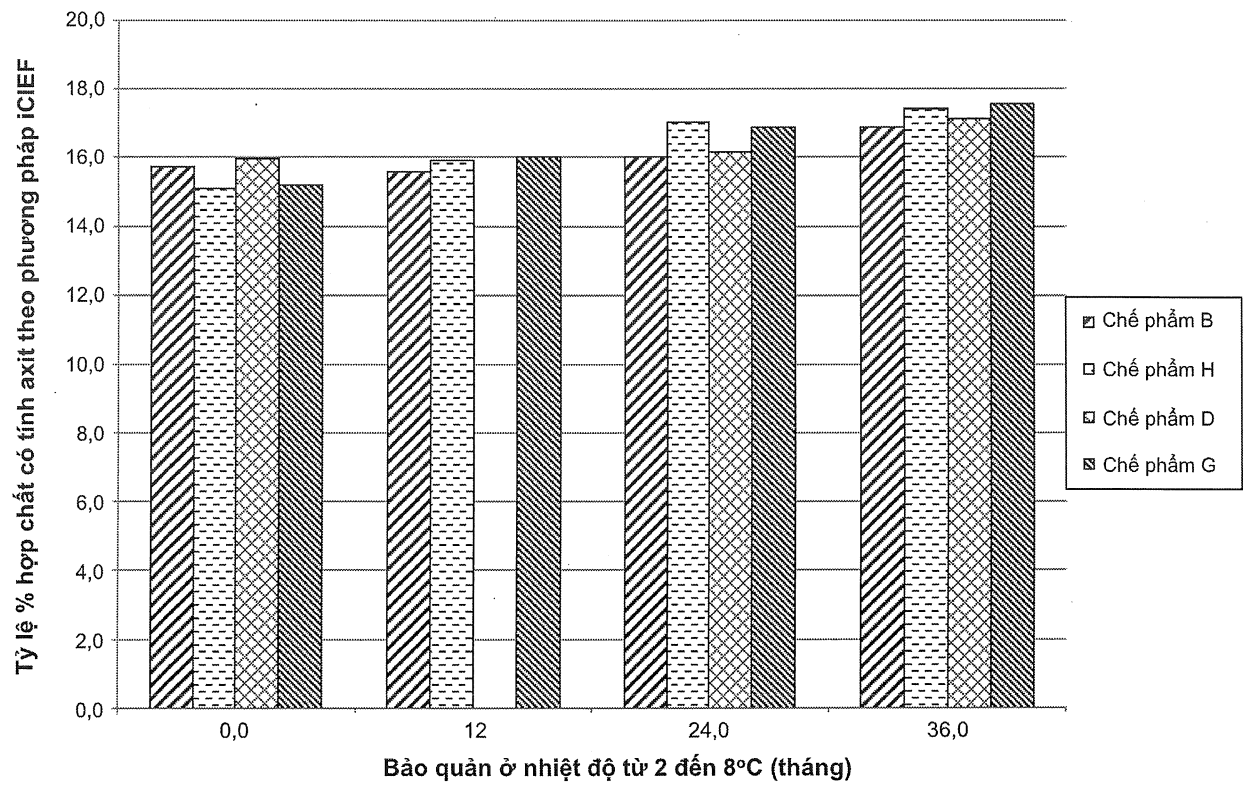


FIG. 1C

4/37

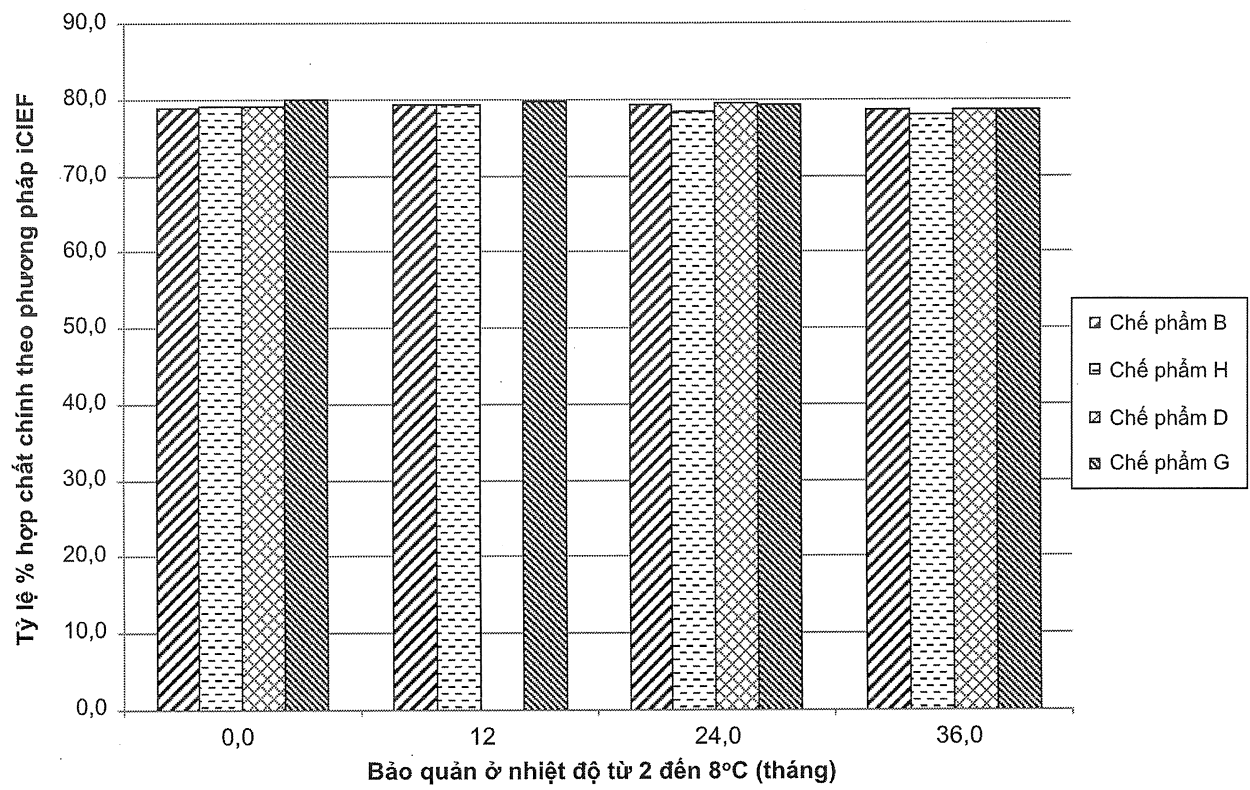


FIG. 1D

5/37

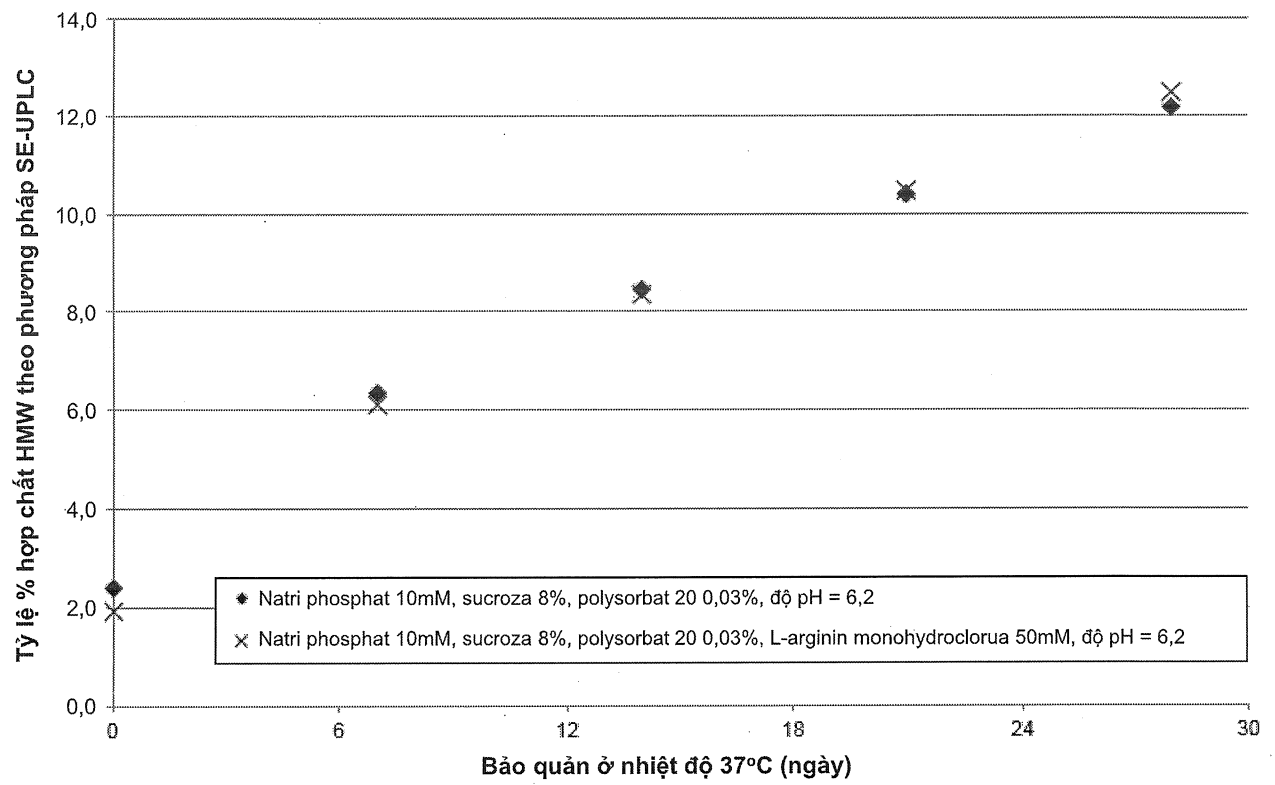


FIG. 2A

6/37

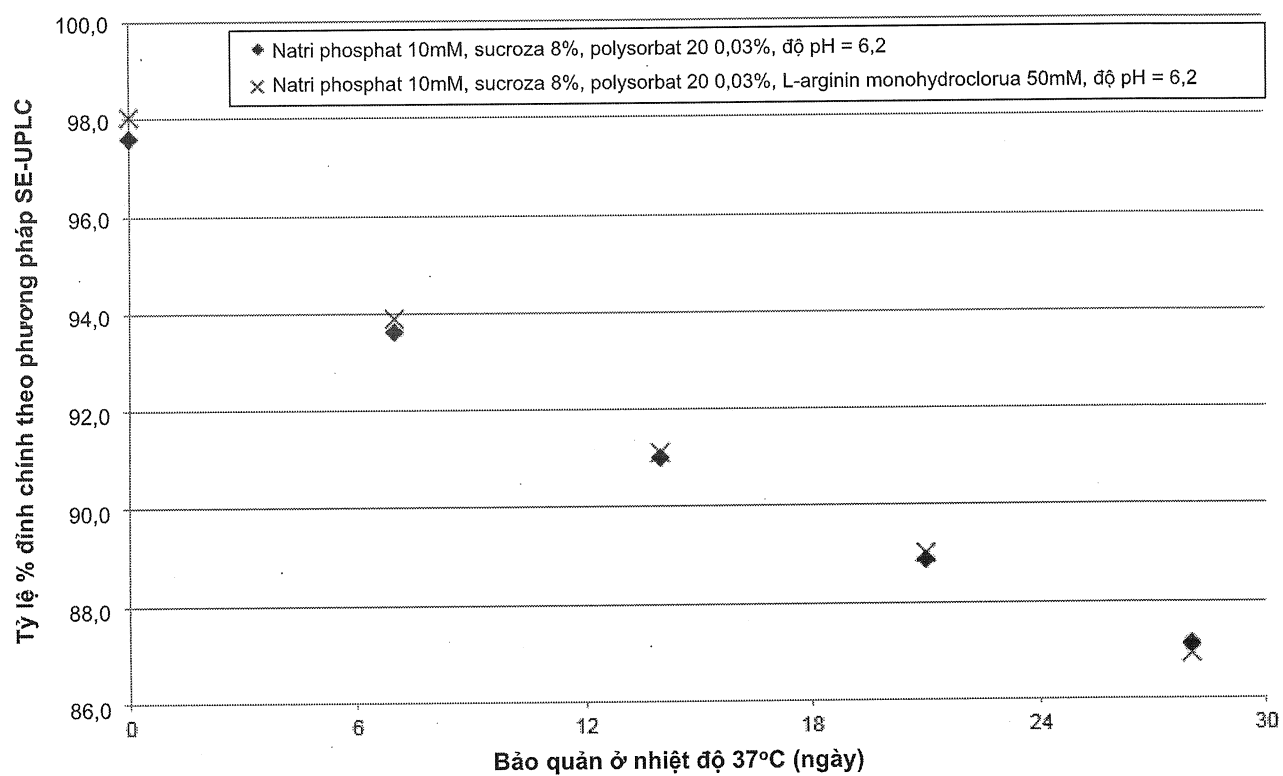


FIG. 2B

7/37

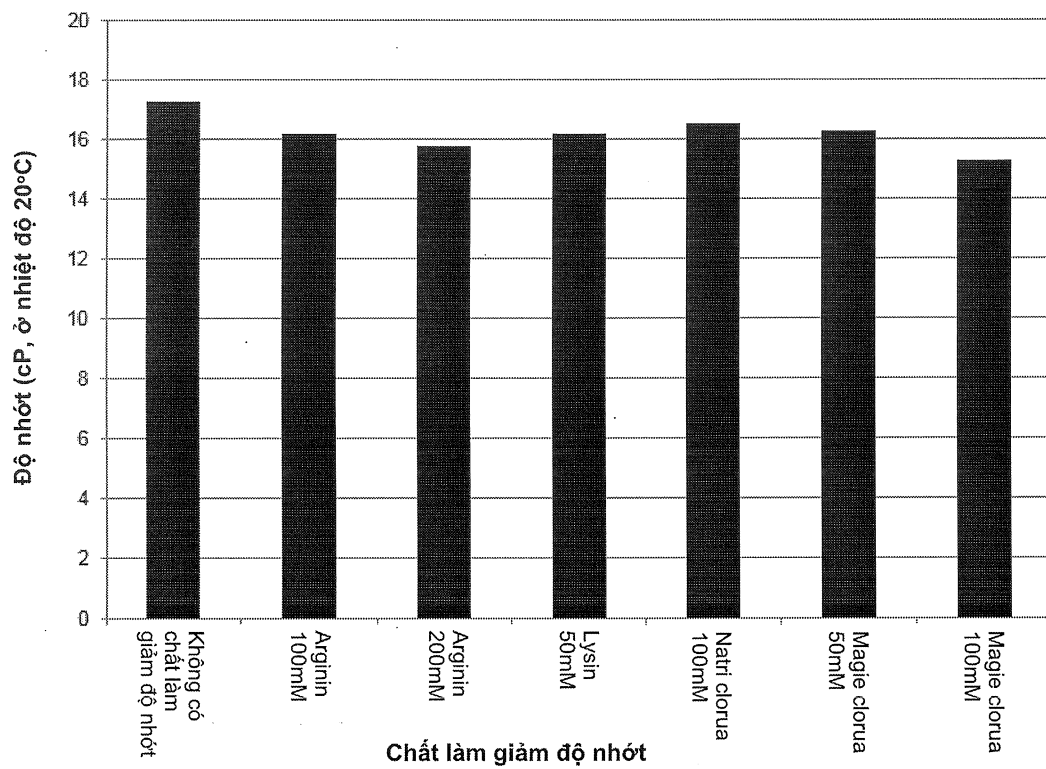


FIG. 3A

8/37

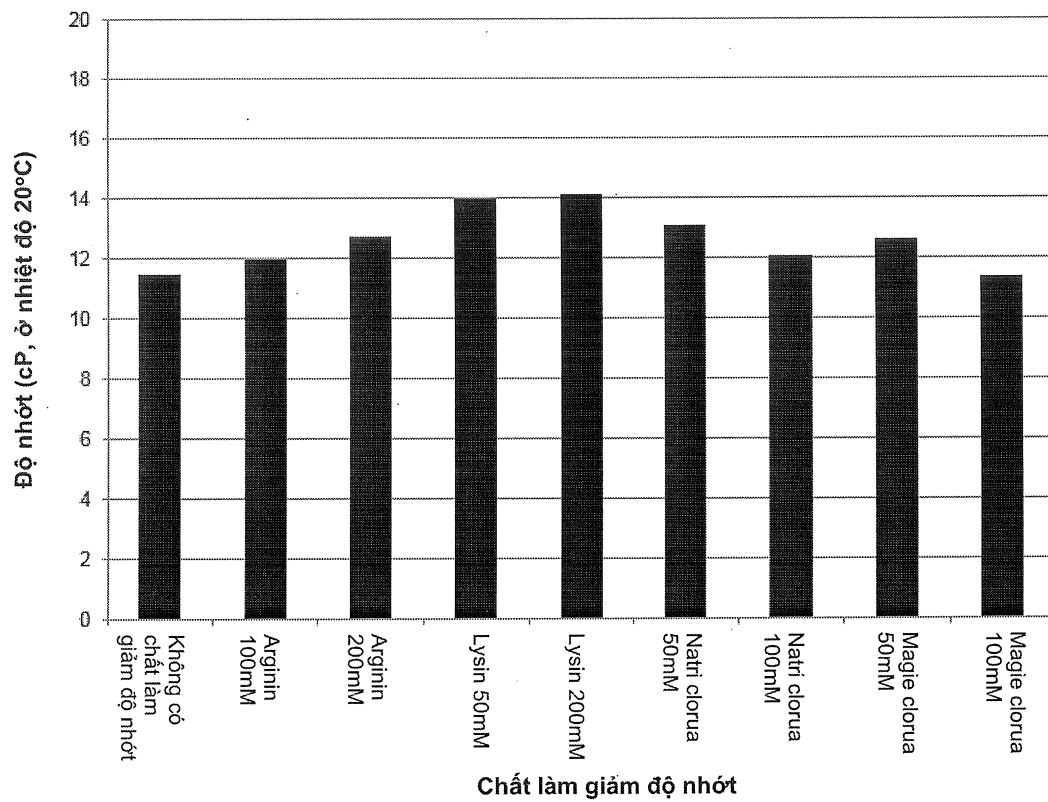


FIG. 3B

9/37

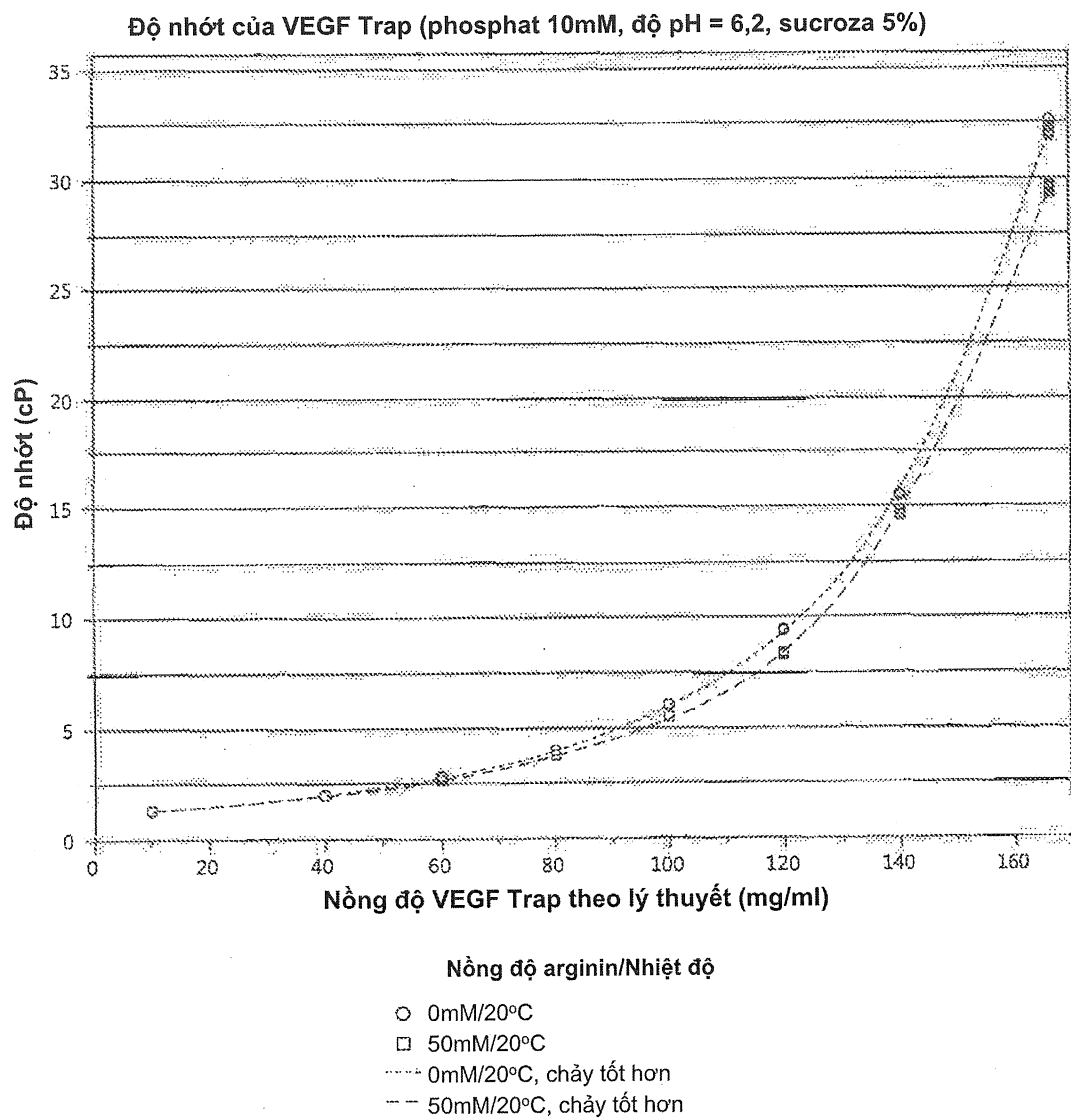


FIG. 3C

10/37

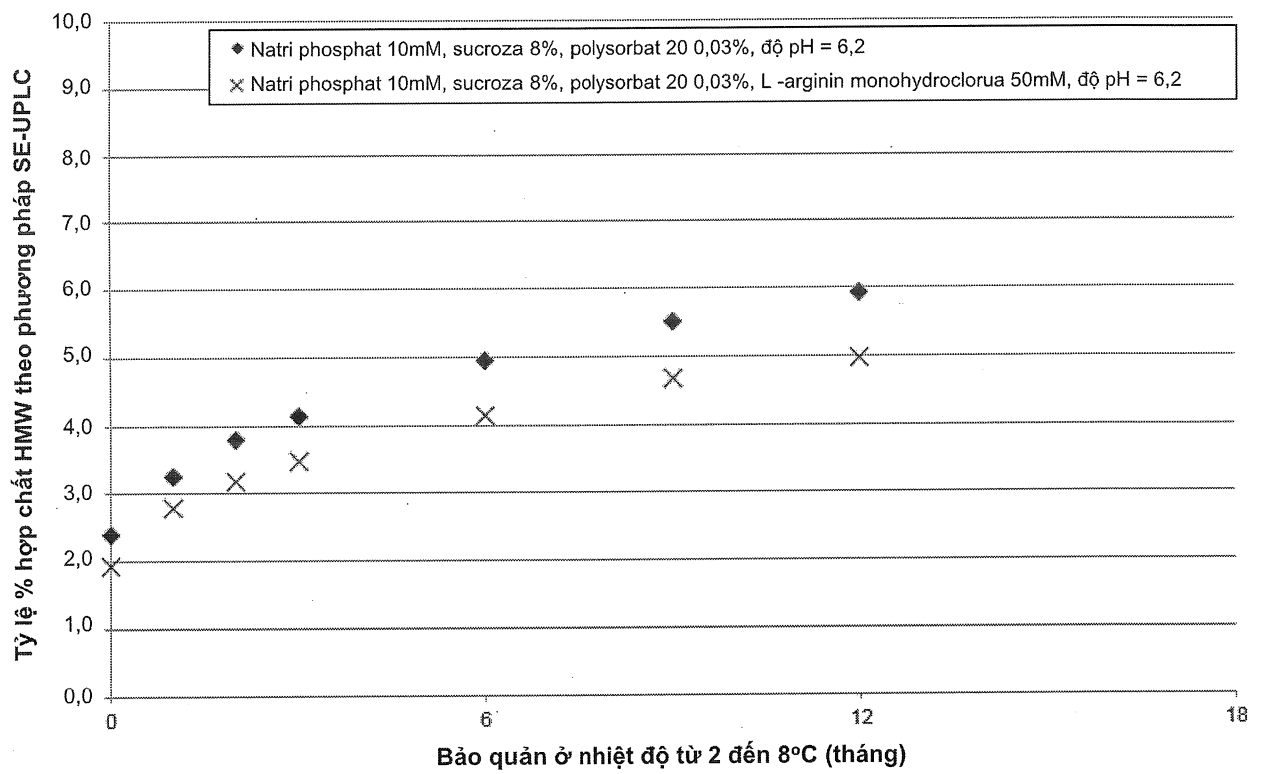


FIG. 4A

11/37

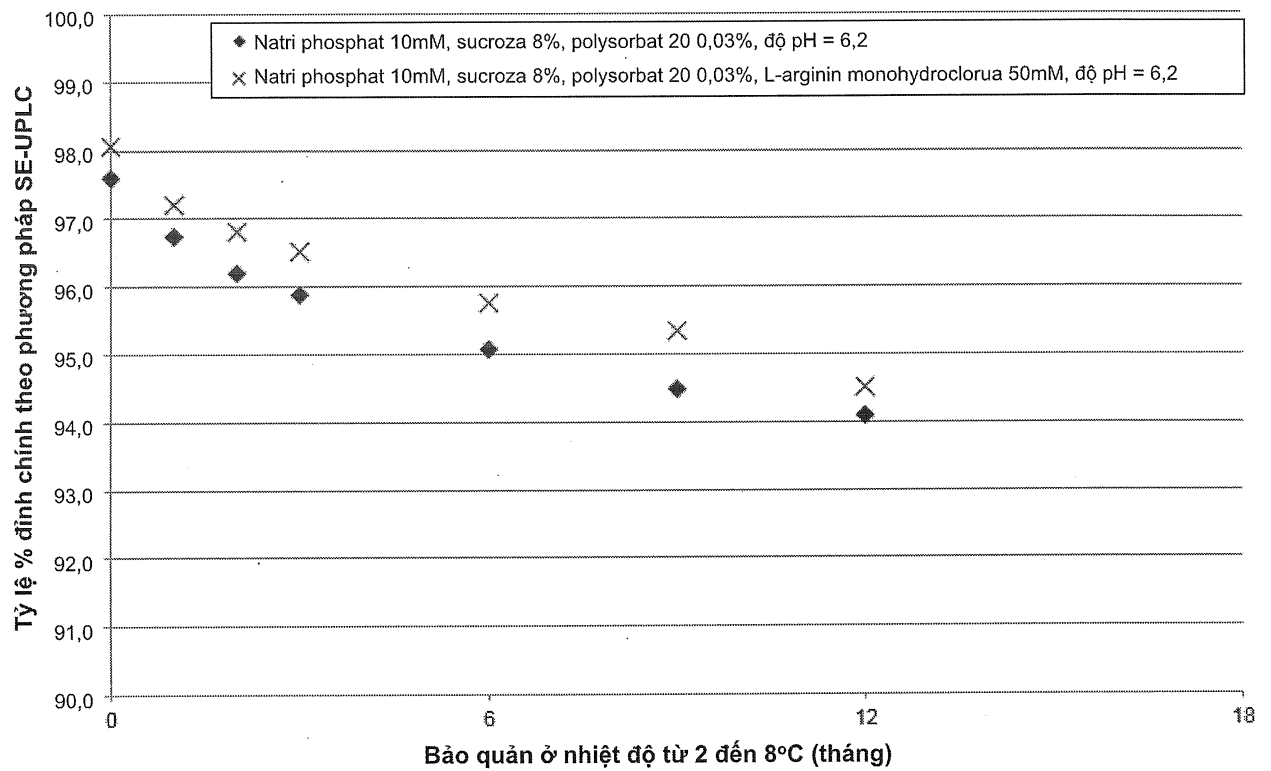


FIG. 4B

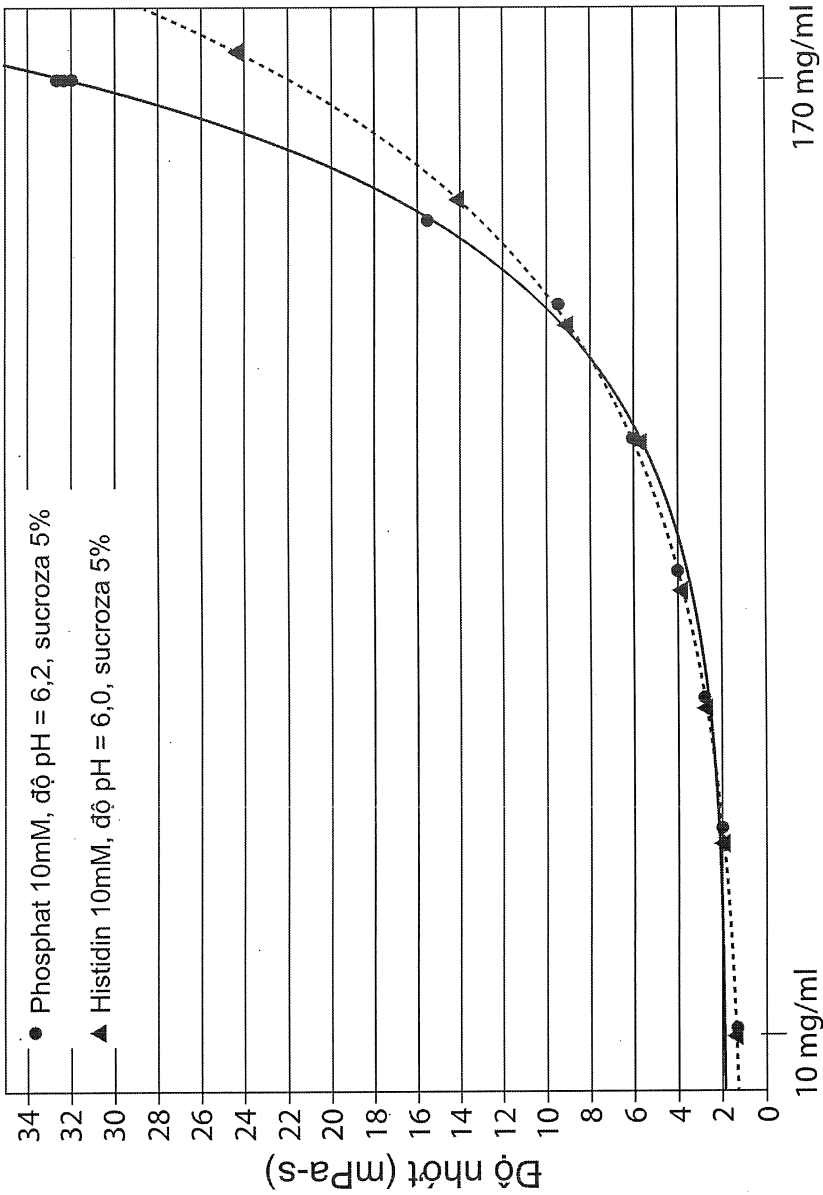


FIG. 5

13/37

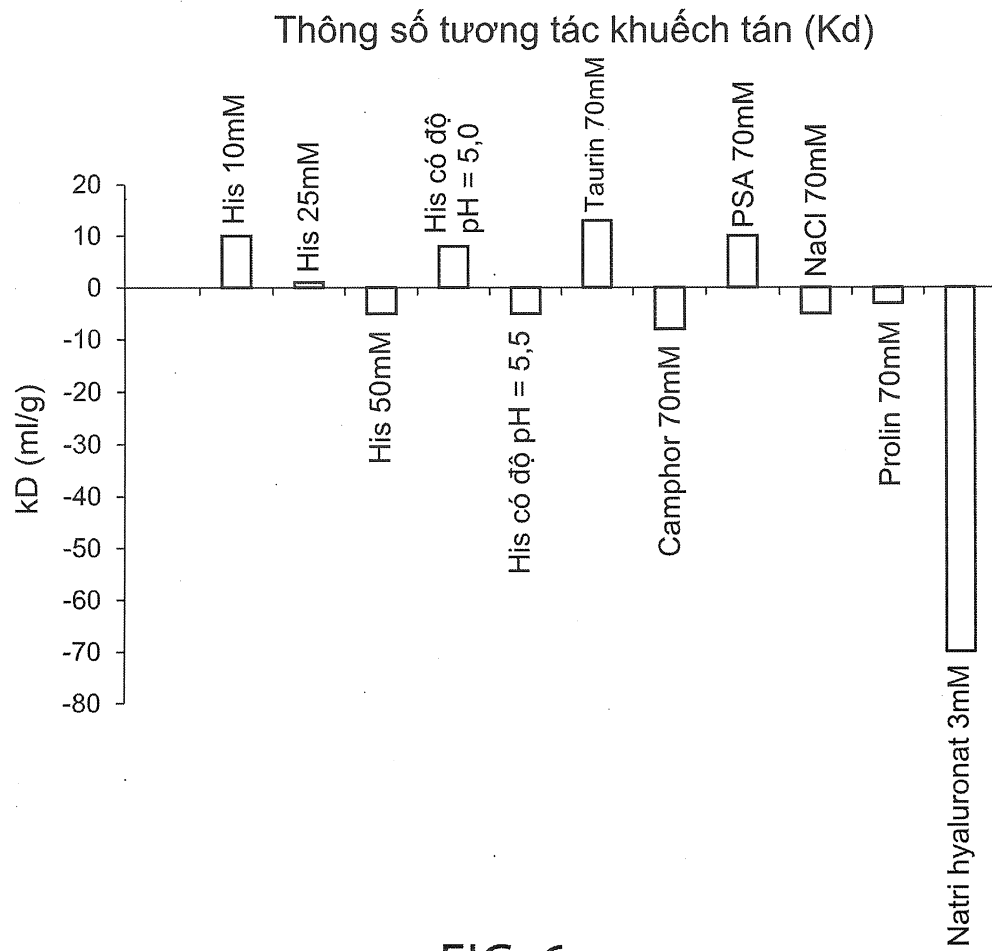


FIG. 6

14/37

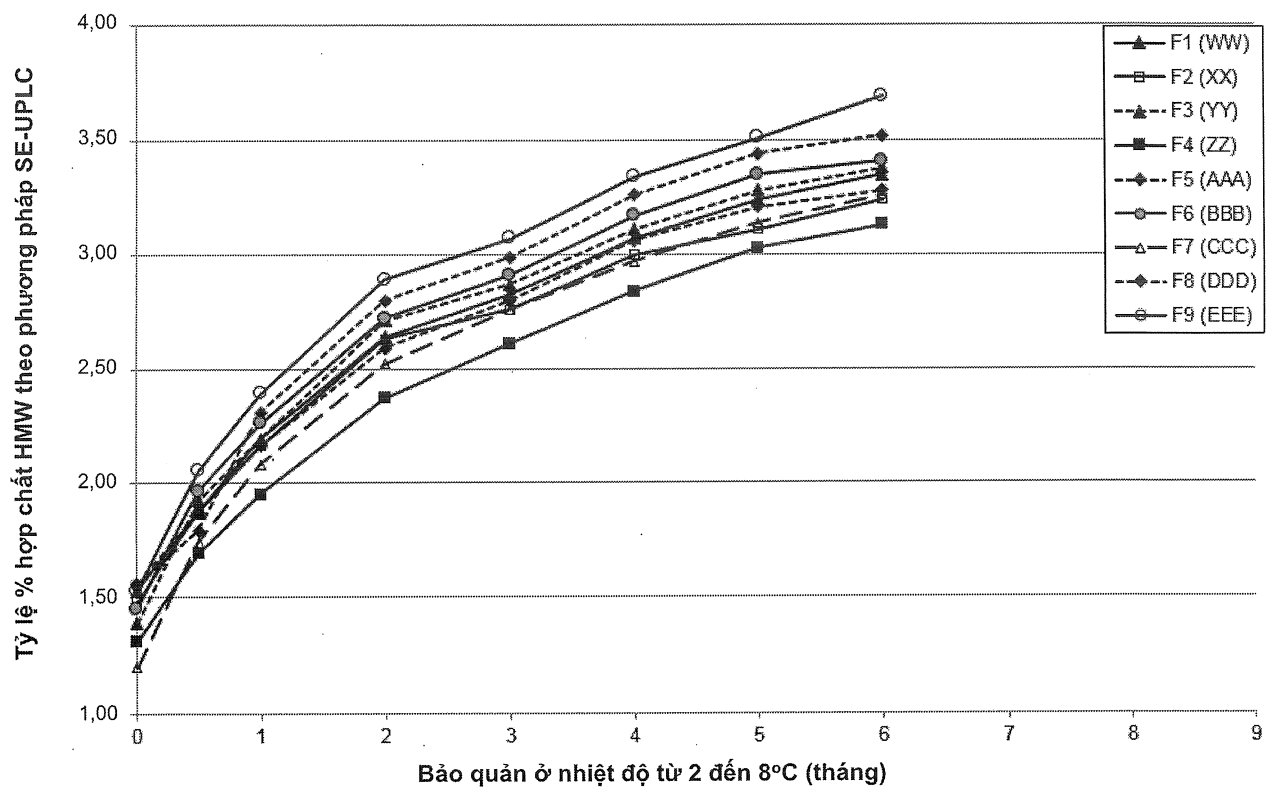


FIG. 7

15/37

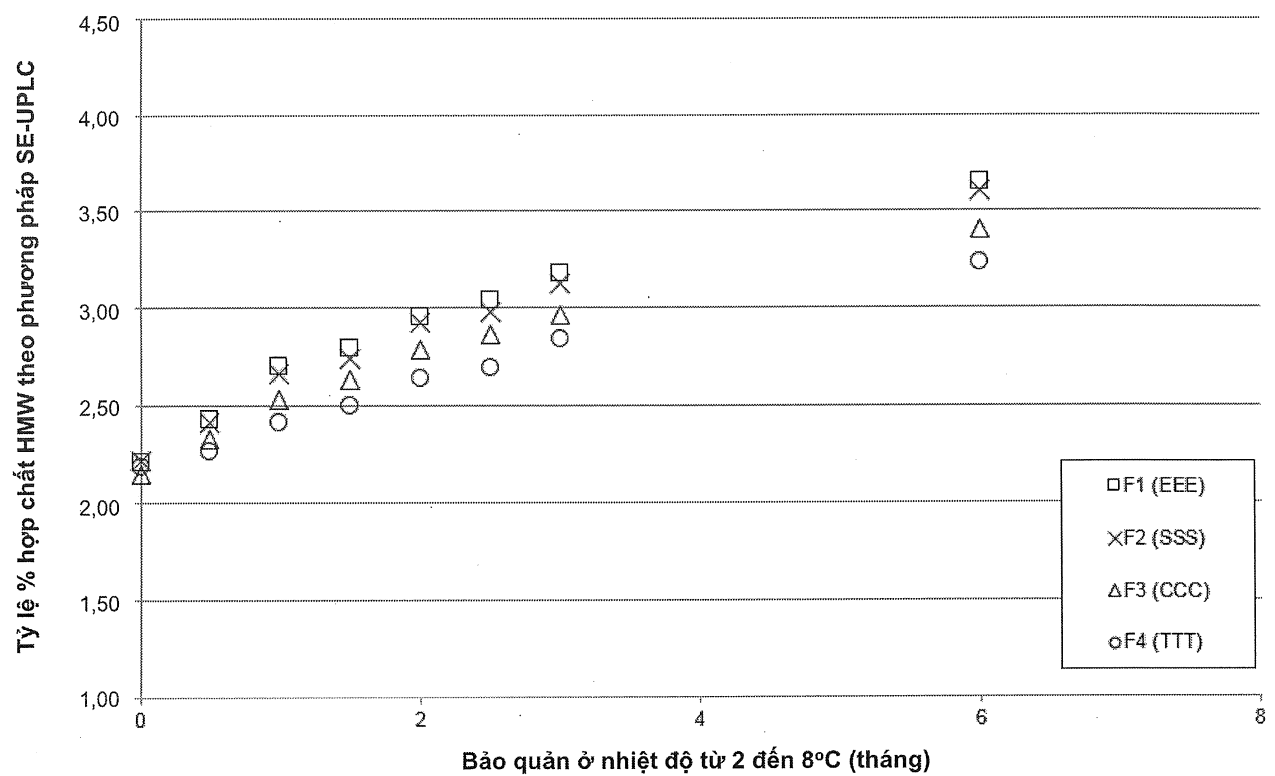


FIG. 8A

16/37

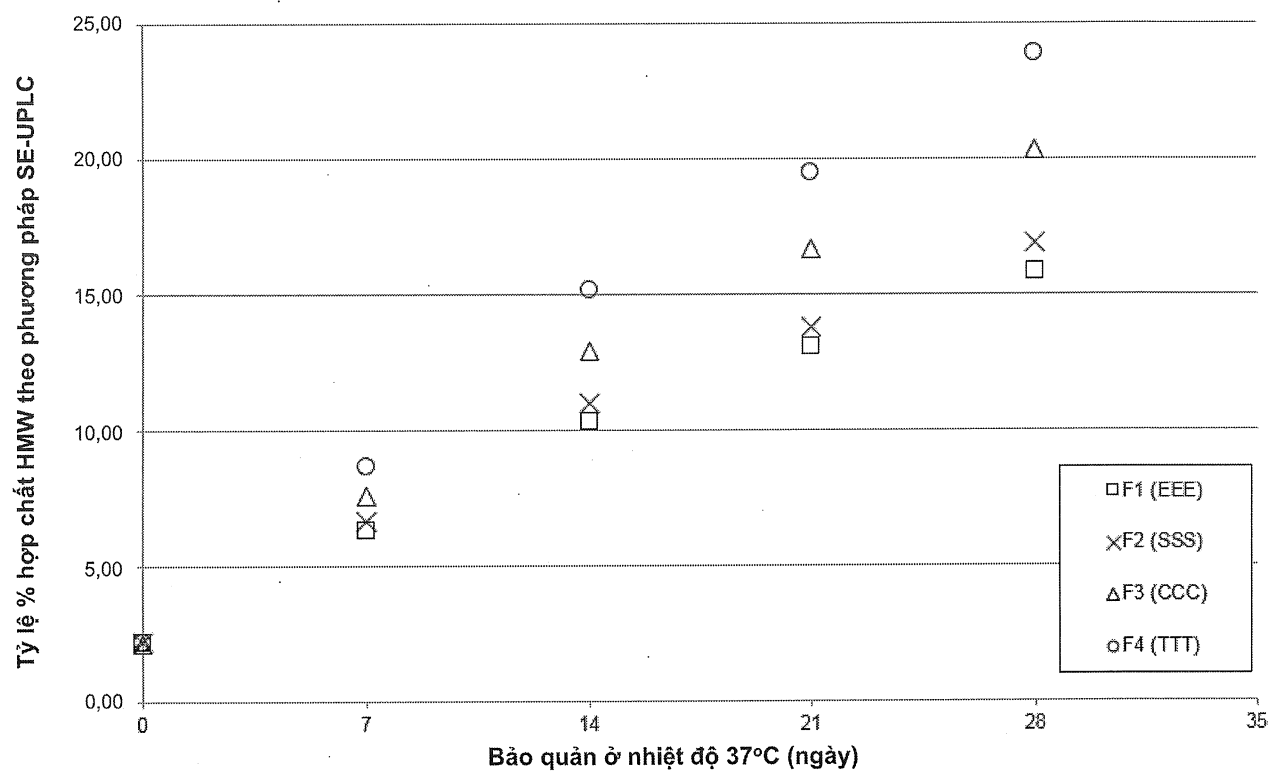


FIG. 8B

17/37

Độ nhớt của VEGF Trap 140mg/ml được bảo chế trong histidin 20mM, độ pH = 5,8, sucroza 5%, polysorbat 20 0,03% với các ion đối khác nhau

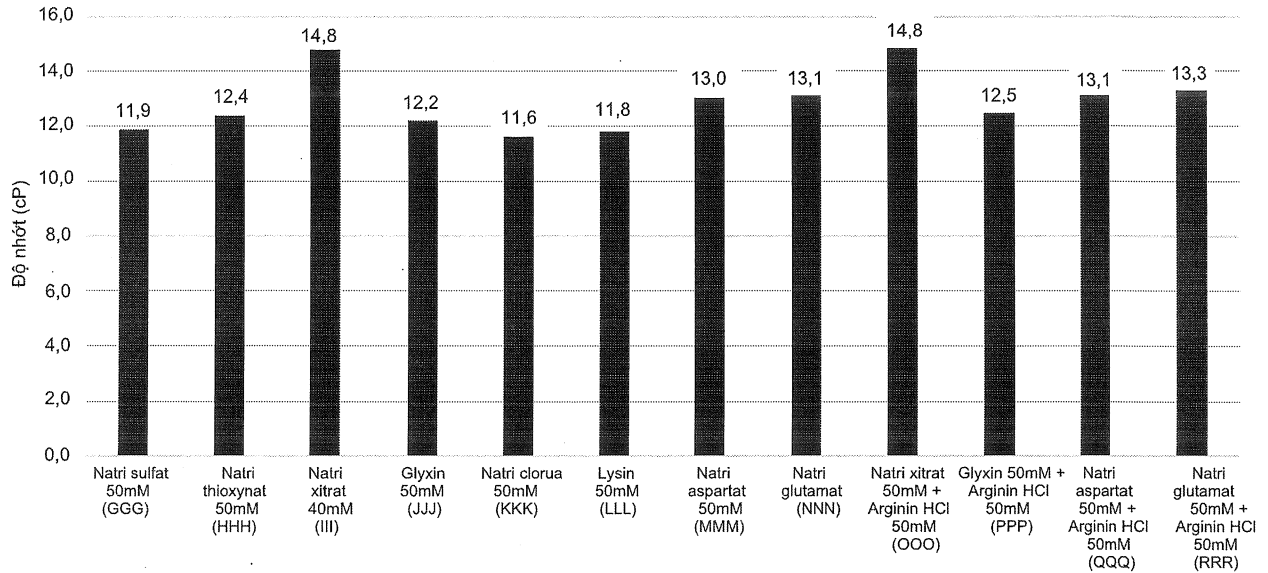


FIG. 9

Nồng độ mol của VEGF Trap 140mg/ml được bảo chế trong histidin 20mM, độ pH = 5,8, sucroza 5%, polysorbat 20 0,03% với các ion đối khác nhau

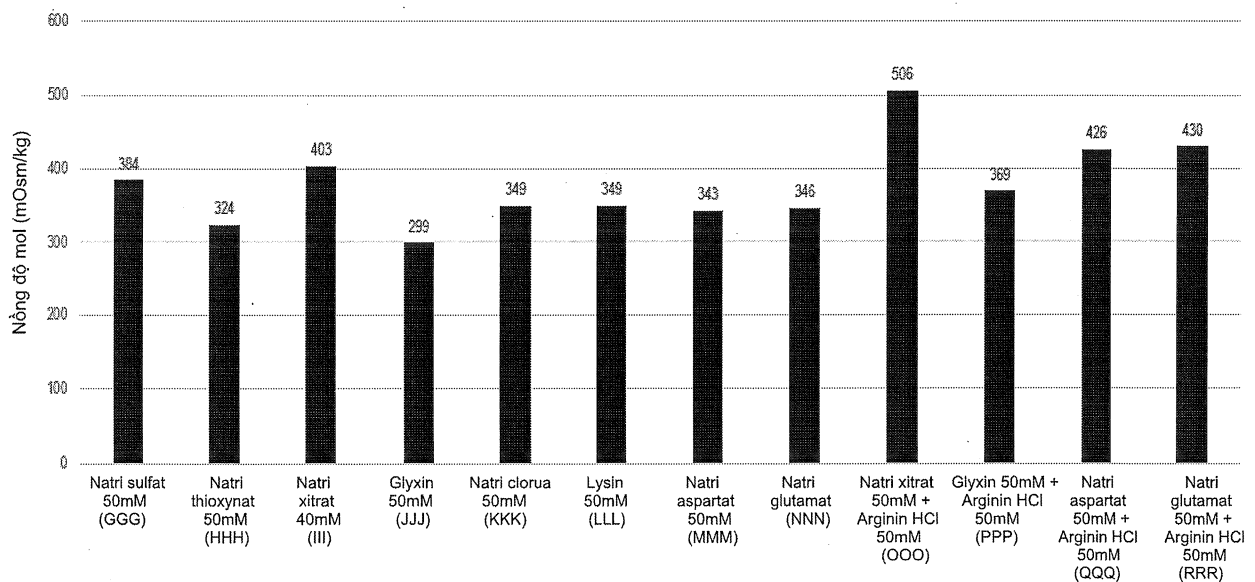


FIG. 10

18/37

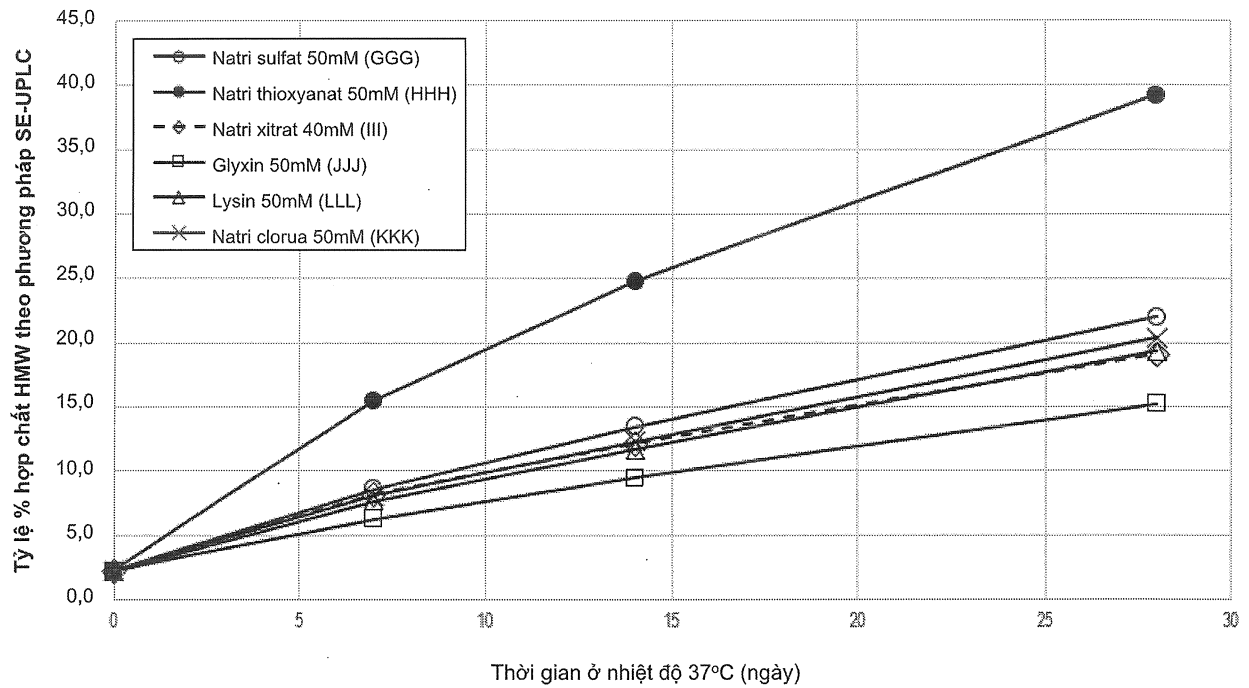


FIG. 11A

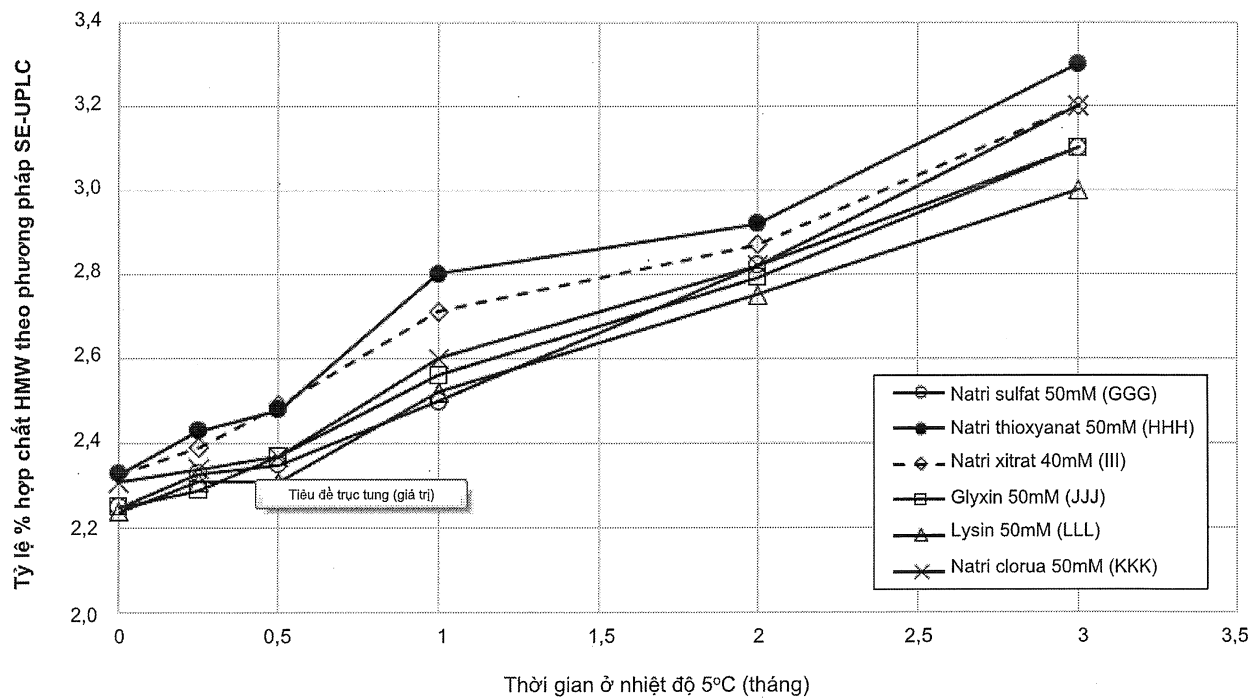


FIG. 11B

Các chế phẩm	Hệ số khuếch tán (cm ² /s)	Bán kính (nm)	Pd (%)
F1 (Natri sulfat 50mM)	3,32E-07	7,4	15,3
F2 (Natri thioxyanat 50mM)	2,98E-07	8,2	14,7
F3 (Natri xitrat 50mM)	3,20E-07	7,7	16,3
F4 (Glyxin 50mM)	3,89E-07	6,3	18,9
F5 (Natri clorua 50mM)	3,24E-07	7,6	13,8
F6 (Lysin 50mM)	3,17E-07	7,7	13,5
F7 (Natri aspartat 50mM)	3,32E-07	7,4	18,2
F8 (Natri glutamat 50mM)	3,32E-07	7,4	15,0
F9 (Natri xitrat 50mM + Arginin HCl 50mM)	3,31E-07	7,4	14,4
F10 (Glyxin 50mM + Arginin HCl 50mM)	3,31E-07	7,4	14,3
F11 (Natri aspartat 50mM + Arginin HCl 50mM)	3,24E-07	7,6	14,8
F12 (Natri glutamat 50mM+ Arginin HCl 50mM)	3,22E-07	7,6	13,3

20/37

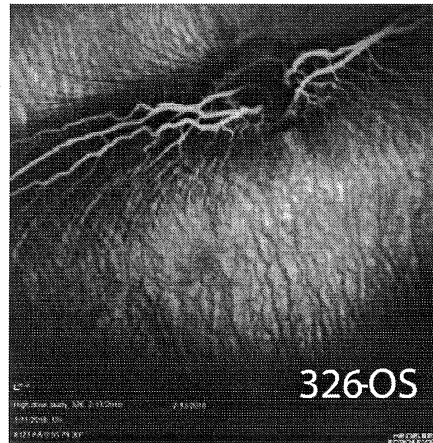


FIG. 13A



FIG. 13B

21/37

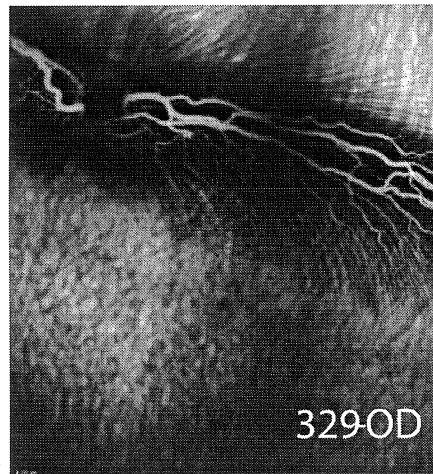


FIG. 13C

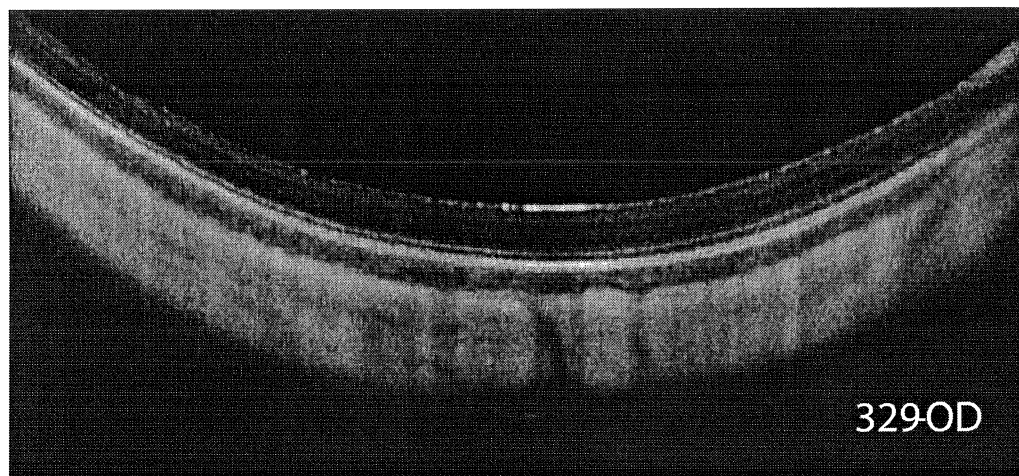


FIG. 13D

22/37

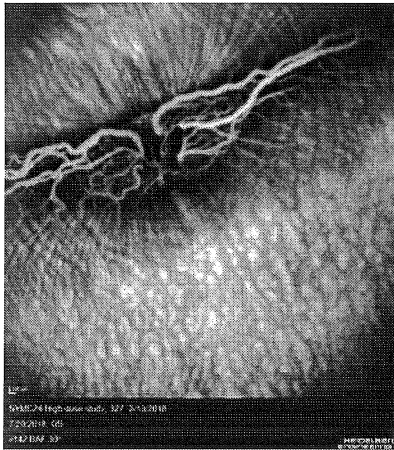


FIG. 14A



FIG. 14B

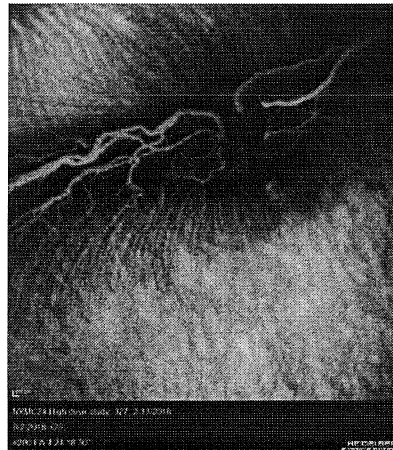


FIG. 14C

23/37

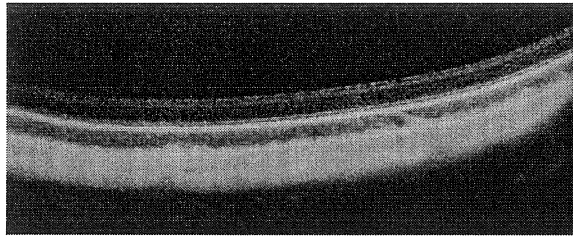


FIG. 14D

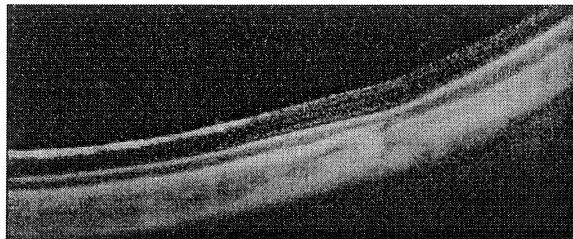


FIG. 14E

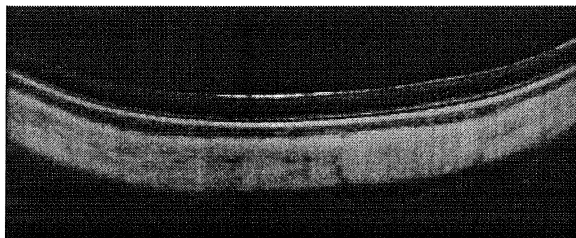


FIG. 14F

24/37

Chụp mạch huỳnh quang (FA)

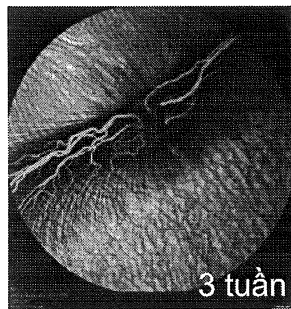


FIG. 15A

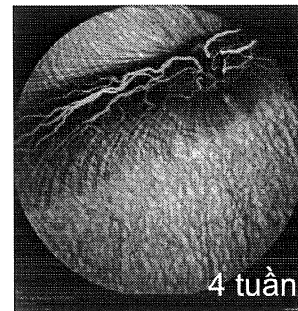


FIG. 15B

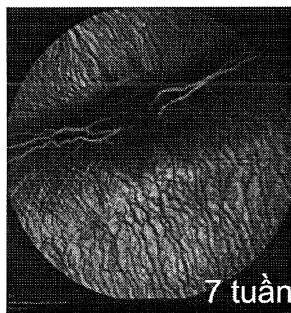


FIG. 15C

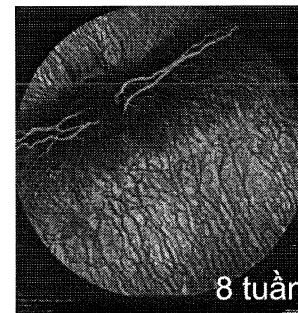


FIG. 15D

25/37

Chụp cắt lớp quang học (OCT)



FIG. 15E

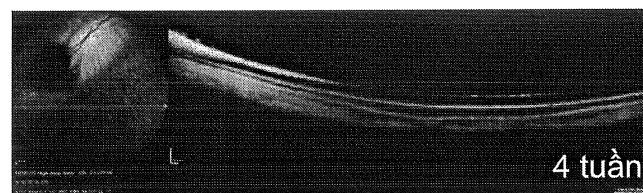


FIG. 15F

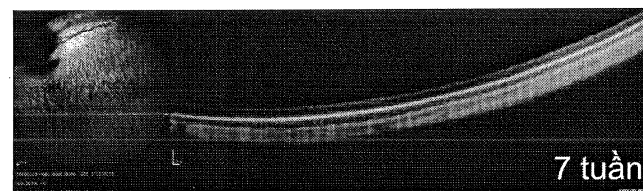


FIG. 15G



FIG. 15H

26/37

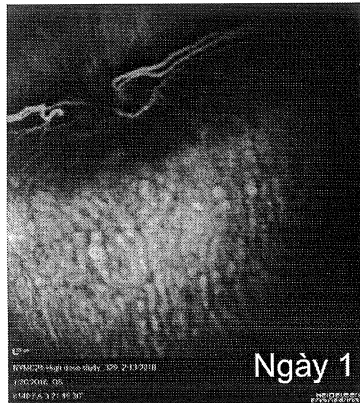


FIG. 16A



FIG. 16B



FIG. 16C

27/37

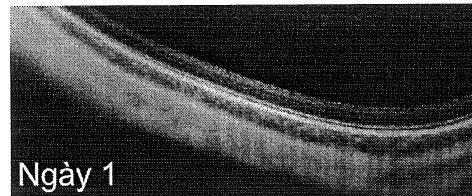


FIG. 16D

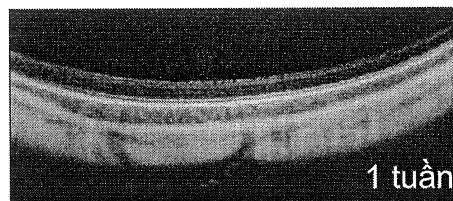


FIG. 16E

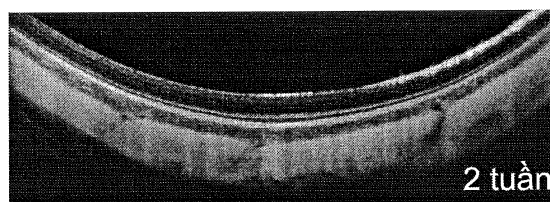


FIG. 16F

28/37

FA

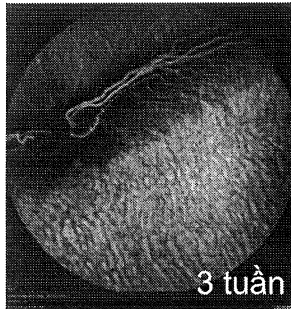


FIG. 17A

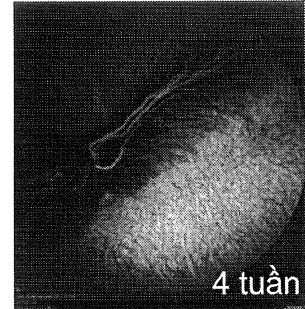


FIG. 17B

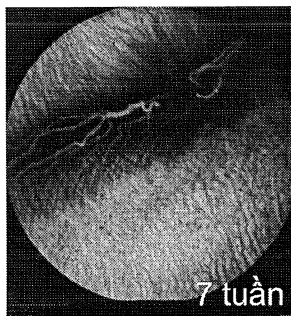


FIG. 17C

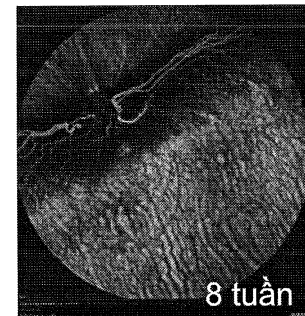


FIG. 17D

29/37

OCT

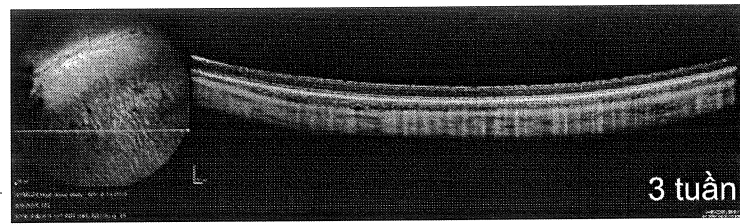


FIG. 17E

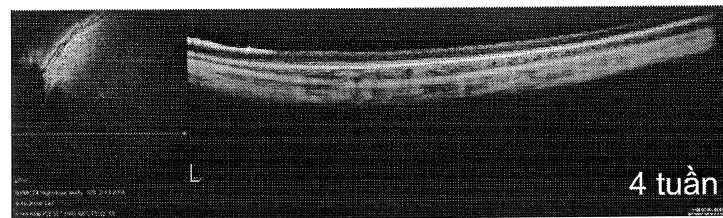


FIG. 17F

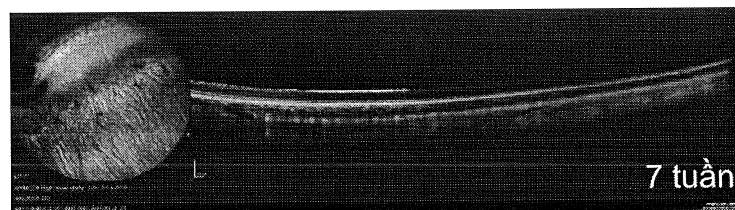


FIG. 17G

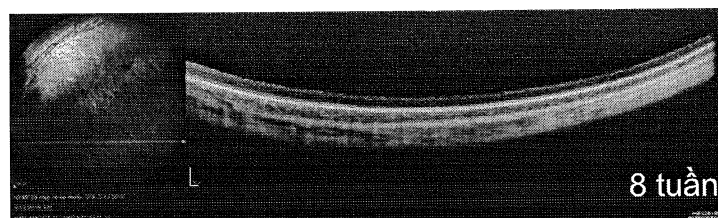


FIG. 17H

30/37

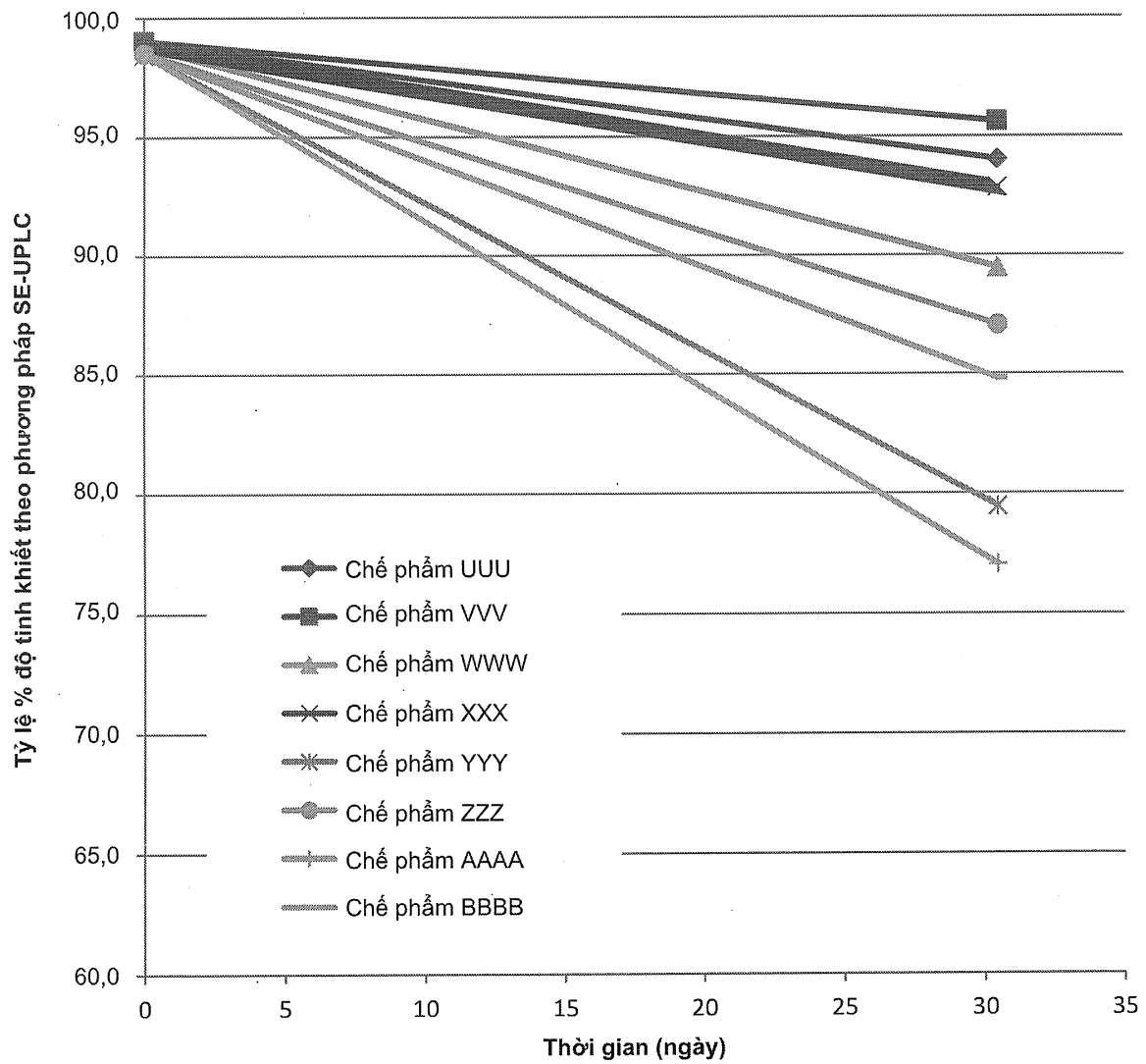


FIG. 18A

31/37

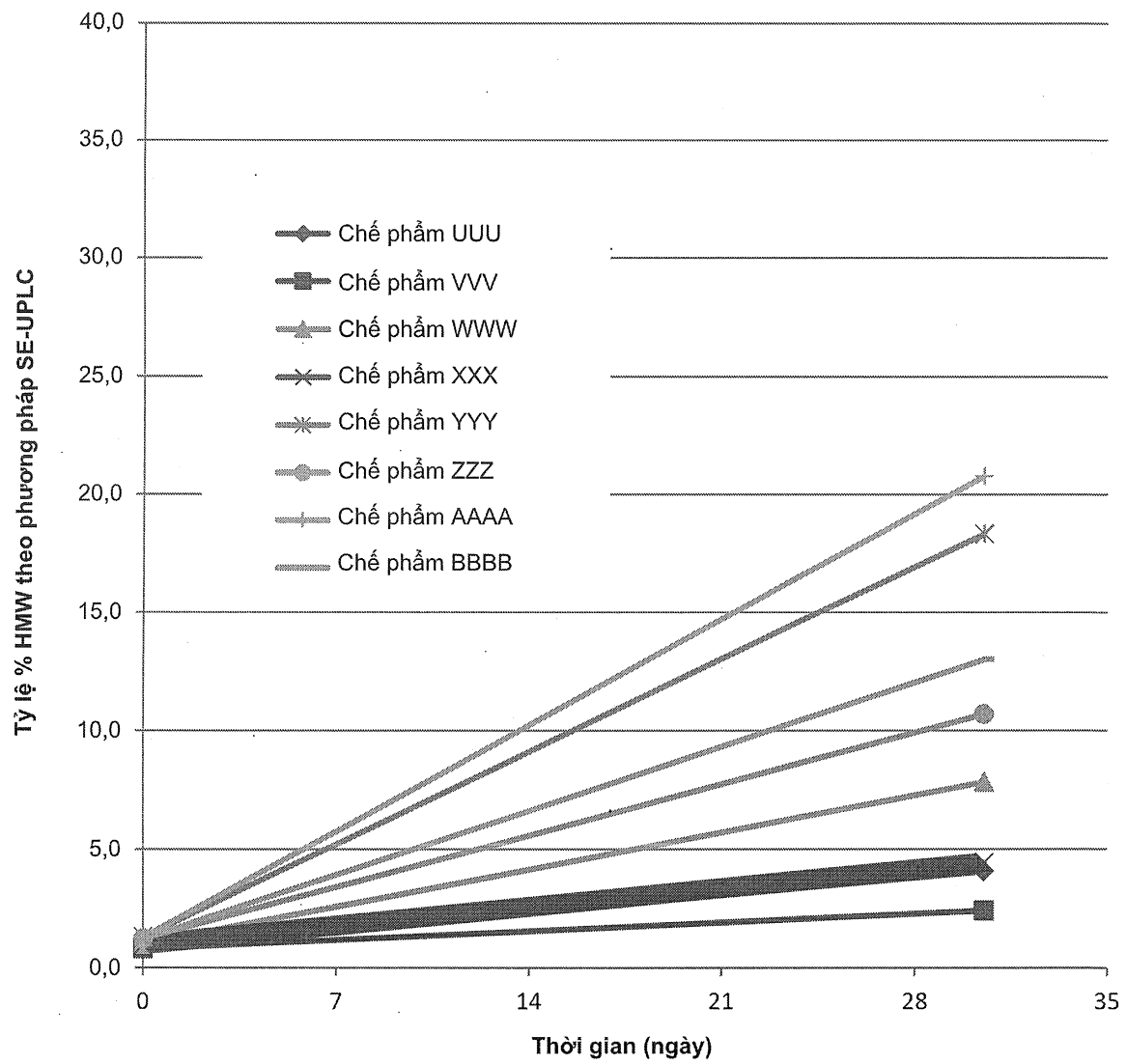


FIG. 18B

32/37

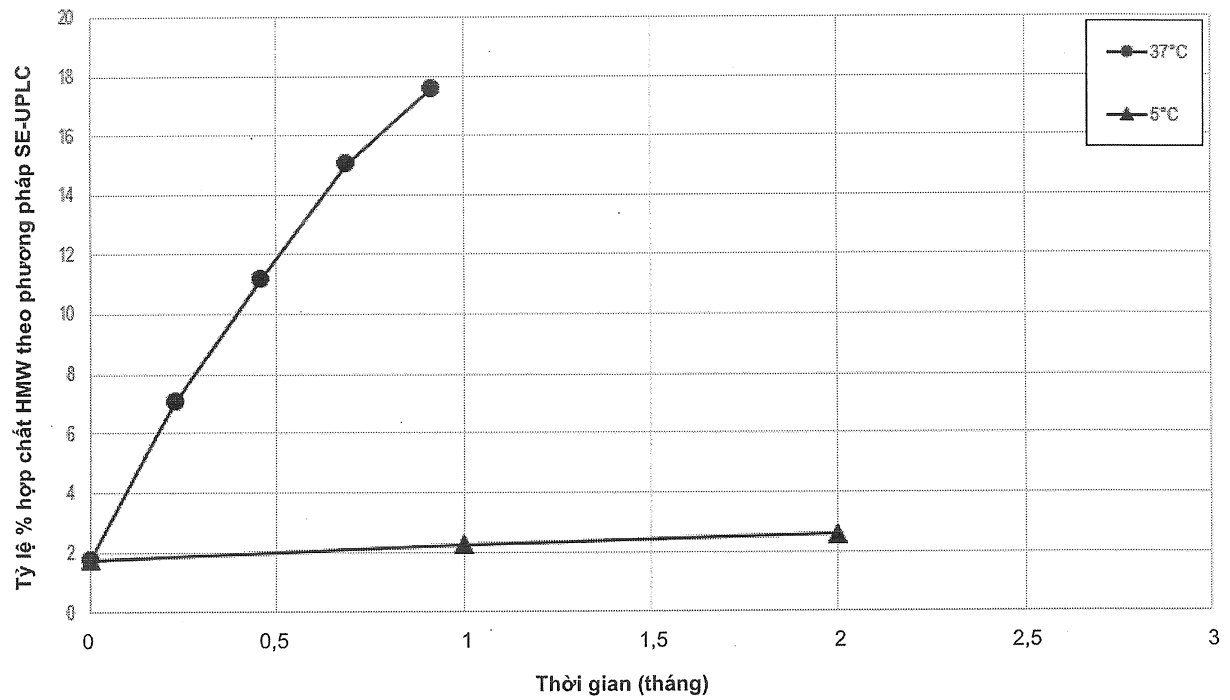


FIG. 19A

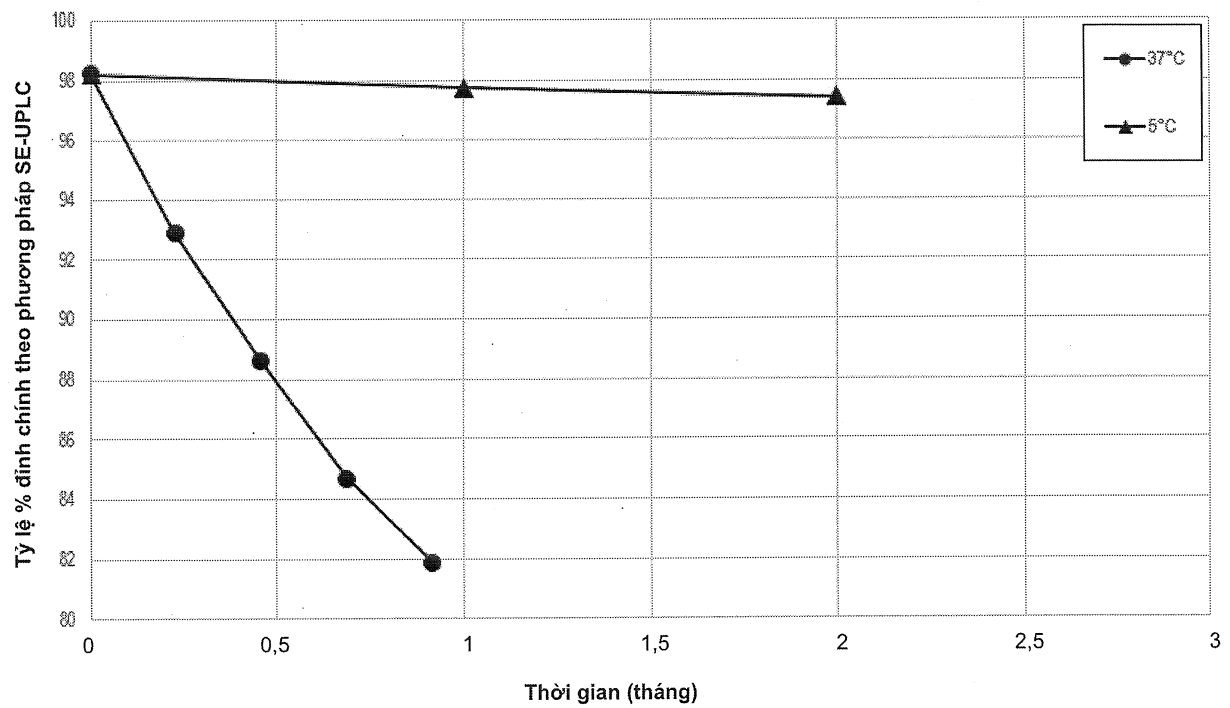


FIG. 19B

33/37

Chất dạng hạt có kích thước nhỏ hơn mức quan sát được bằng mắt thường theo ảnh chụp vi dòng sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C

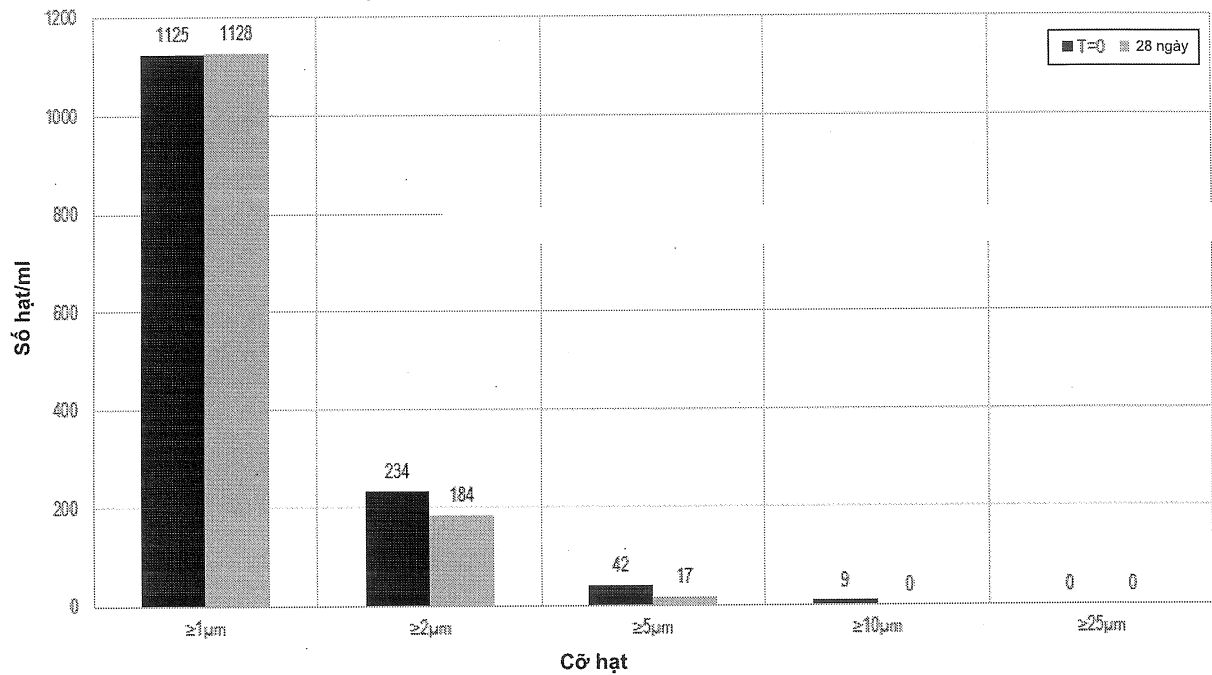


FIG. 19C

Chất dạng hạt có kích thước nhỏ hơn mức quan sát được bằng mắt thường theo phương pháp làm mờ ánh sáng sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C

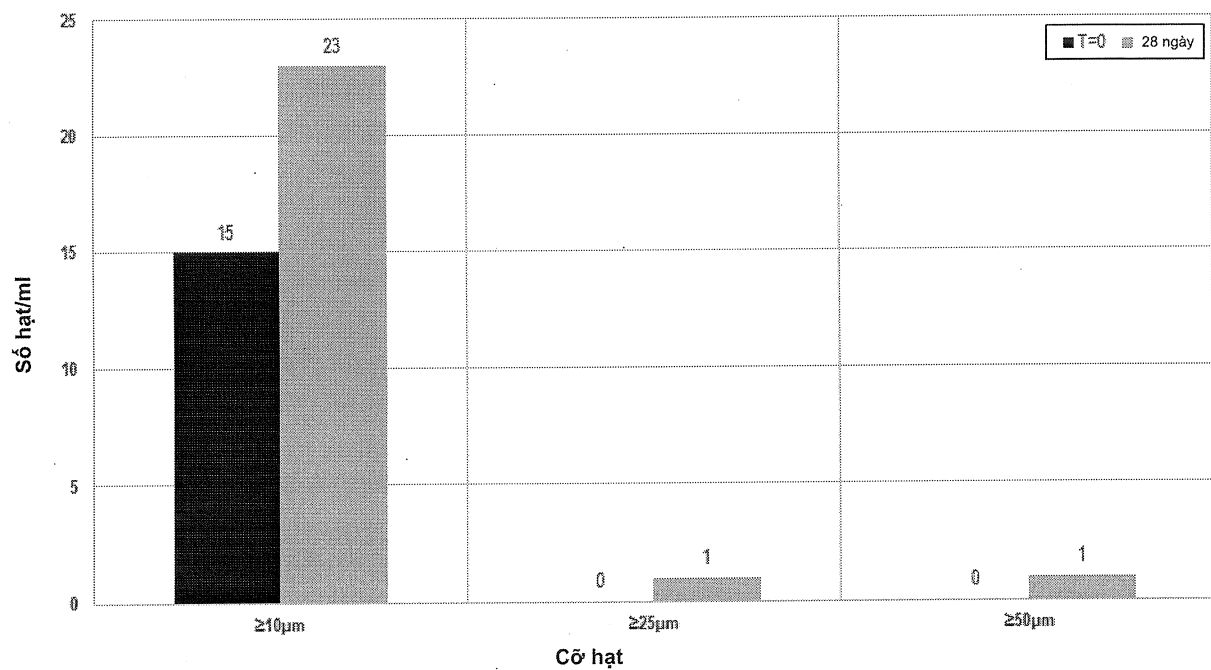


FIG. 19D

34/37

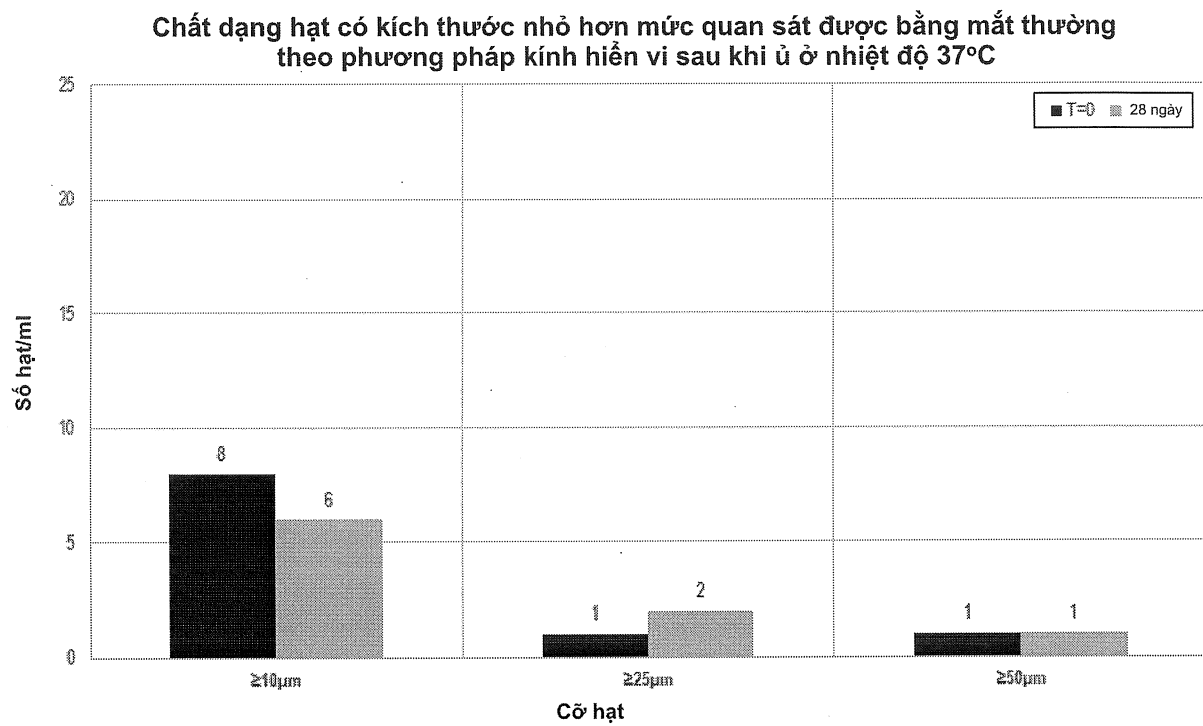


FIG. 19E

35/37

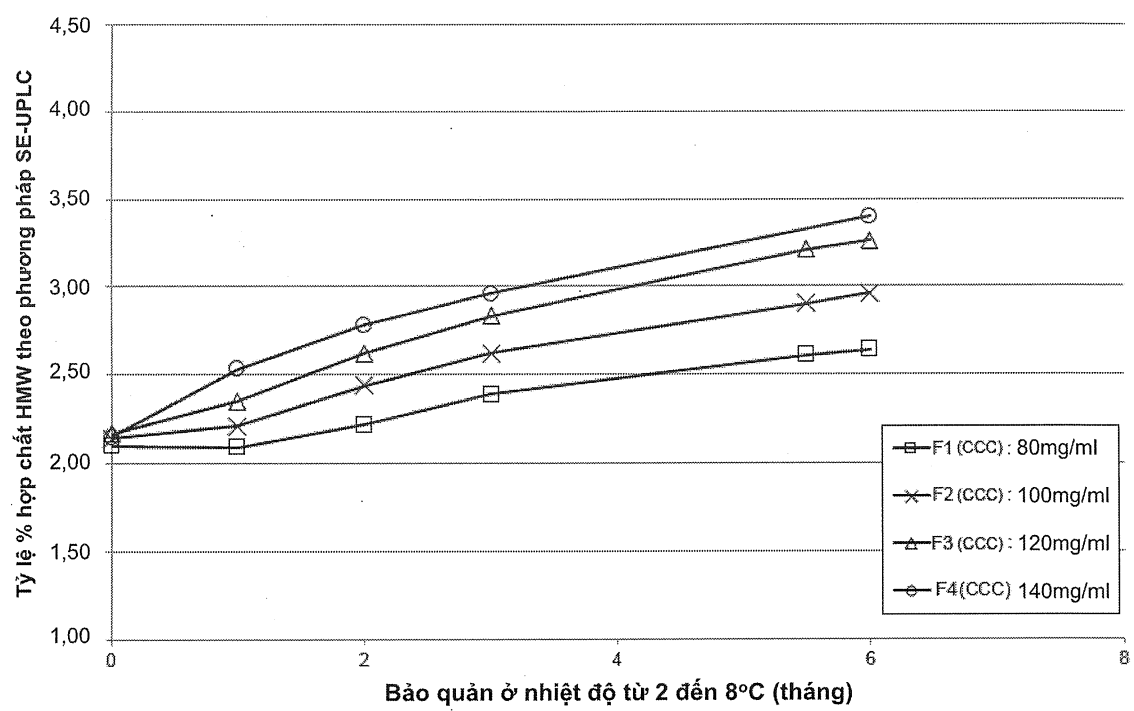


FIG. 20A

36/37

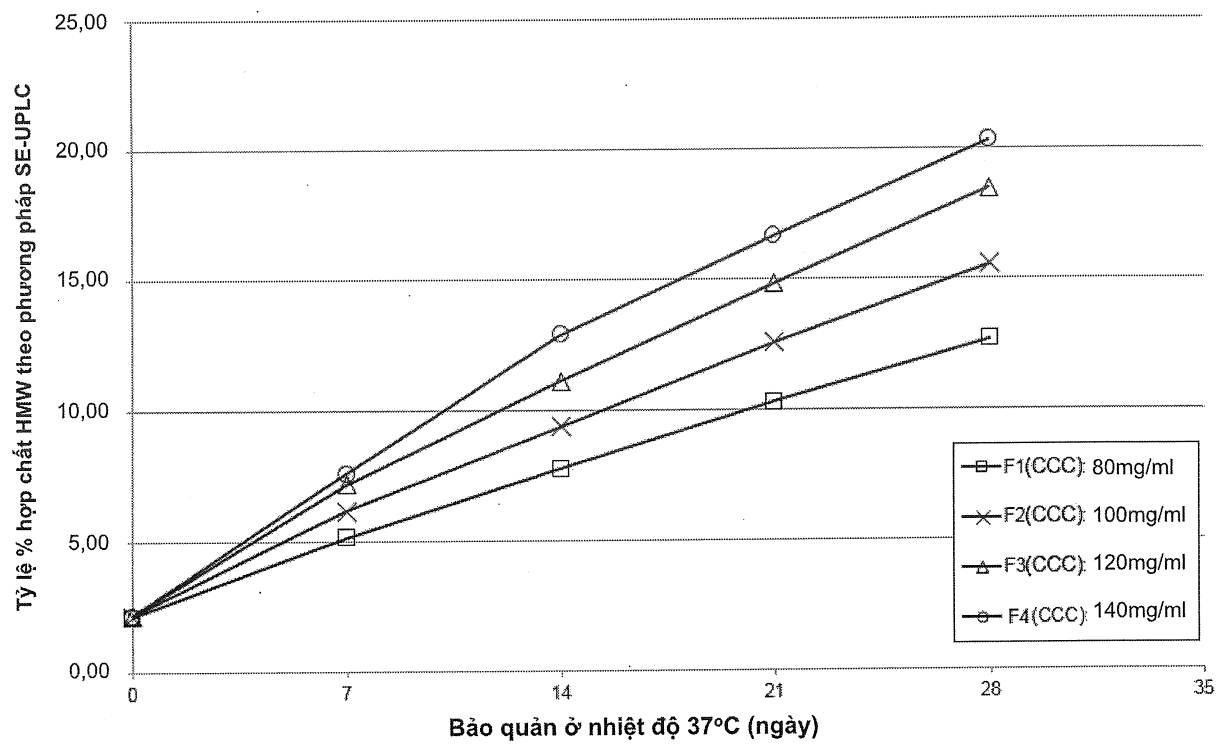


FIG. 20B

37/37

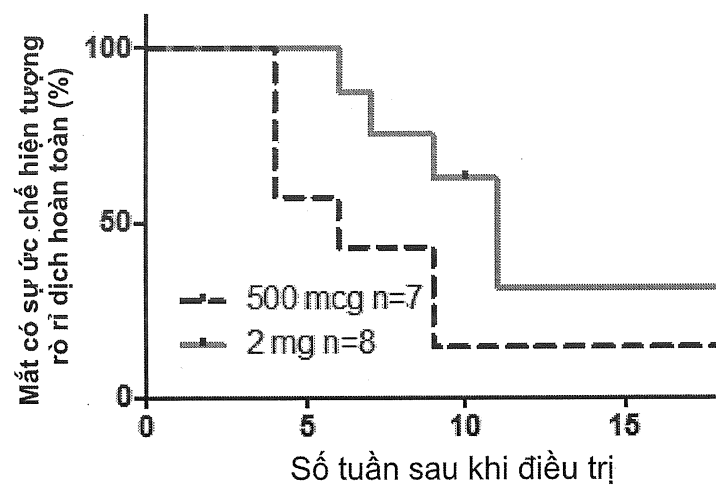


FIG. 21

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Graham, Kenneth S
Wadhwa, Saurabh
- <120> CHẾ PHẨM DƯỢC CHỨA NƯỚC CHỨA PROTEIN DUNG HỢP THU THỂ YẾU TỔ SINH TRƯỞNG NỘI
MÔ MẠCH (VEGF), PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ VÀ XY LANH NẠP SẴN THUỐC CHỨA CHẾ PHẨM NÀY
- <130> 10430-WO
- <160> 2
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
- <211> 1377
- <212> ADN
- <213> Người hiện đại

<400> 1

atgggtcagct actgggacac cggggtcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc	60
acaggatcta gttccggaag tgataccggt agacctttcg tagagatgta cagtgaatc	120
cccgaatta tacacatgac tgaaggaagg gagctcgtca ttccctgccg ggttacgtca	180
cctaacaatca ctgttacttt aaaaaagttt ccacttgaca ctttgatccc tgatggaaaa	240
cgcataatct gggacagtag aaagggttc atcatatcaa atgcaacgta caaagaaata	300
gggcttctga cctgtgaagc aacagtcaat gggcatttgt ataagacaaa ctatctcaca	360
catcgacaaa ccaatacaat catagatgtg gttctgagtc cgtctcatgg aattgaacta	420
tctgttggag aaaagcttgt cttaaattgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt	480
gacttcaact gggaataccc ttcttcgaag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac	540
ctaaaaacc agtctgggag tgagatgaag aaatttttga gcaccttaac tatagatggt	600
gtaaccgga gtgaccaagg attgtacacc tgtgcagcat ccagtgggct gatgaccaag	660
aagaacagca ctttgtcag ggtccatgaa aaggacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	720
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac	780
accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa	840
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	900
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	960
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa agccctccca	1020
gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac	1080

accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1140
 aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagggggaga gcaatgggca gccggagaac 1200
 aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag 1260
 ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1320
 gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 1377

<210> 2
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<220>
 <221> TÍN HIỆU
 <222> (1)..(26)

<400> 2

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
 20 25 30

Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
 35 40 45

Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
 50 55 60

Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
 65 70 75 80

Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
 85 90 95

Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
 100 105 110

Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
 115 120 125

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu

130	135	140
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile 145 150 155 160		
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu 165 170 175		
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe 180 185 190		
Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu 195 200 205		
Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr 210 215 220		
Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys 225 230 235 240		
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 245 250 255		
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 260 265 270		
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 275 280 285		
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 290 295 300		
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 305 310 315 320		
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 325 330 335		
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 340 345 350		
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		

355

360

365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455