(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116585466 A
(43)申请公布日 2023.08.15

(21)申请号 202310152442.7

(22)申请日 2019.05.10

(30)优先权数据
62/669,506 2018.05.10 US
62/752,127 2018.10.29 US
62/769,876 2018.11.20 US
62/813,882 2019.03.05 US

(62)分案原申请数据
201980038234.6 2019.05.10

(71)申请人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州

(72)发明人 K·S·格拉哈姆 S·瓦德瓦

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 杨春刚 黄革生

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 47/18(2017.01)
A61K 47/26(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
C07K 16/22(2006.01)
A61K 9/08(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)
C07K 14/71(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61K 47/12(2006.01)
A61K 47/22(2006.01)

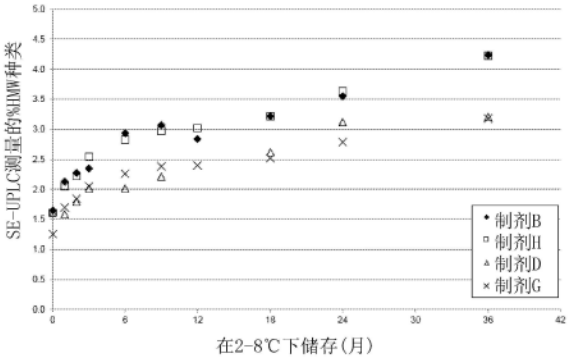
权利要求书3页 说明书53页
序列表（电子公布） 附图28页

(54)发明名称

含有高浓度VEGF受体融合蛋白的制剂

(57)摘要

本发明提供了含有高浓度VEGF受体融合蛋白的制剂，尤其是具有高浓度的血管内皮生长因子(VEGF)受体融合蛋白并且在储存期间具有高稳定性的眼科制剂。还提供了使用该高浓度制剂治疗血管原性眼病的方法。



CN 116585466 A

1.一种水性药物制剂,其包含:

浓度为至少约100mg/ml的阿帕西普;

热稳定剂,其是糖、氨基酸、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、海藻糖、L-脯氨酸、甘氨酸、甘油、牛磺酸或丙烷磺酸;

缓冲液,其是基于组氨酸的缓冲液、基于磷酸盐的缓冲液、基于乙酸盐的缓冲液或基于柠檬酸盐的缓冲液;

非离子表面活性剂;和

粘度降低剂,其是NaCl、$MgCl_2$、D-精氨酸、L-精氨酸或赖氨酸;

其中所述制剂的pH为约5.0至约6.8。

2.根据权利要求1所述的水性药物制剂,其中阿帕西普的浓度为约111.5mg/ml;112.0mg/ml;113.3mg/ml;约114.3mg/ml;约115.6mg/ml;或约116.3mg/ml。

3.根据权利要求1所述的水性药物制剂,其中阿帕西普的浓度为约100mg/ml;101mg/ml;102mg/ml;103mg/ml;104mg/ml;105mg/ml;106mg/ml;107mg/ml;108mg/ml;109mg/ml;110mg/ml;111mg/ml;112mg/ml;113mg/ml;113.3mg/ml;114mg/ml;114.1mg/ml;114.2mg/ml;114.3mg/ml;114.4mg/ml;114.5mg/ml;114.6mg/ml,114.7mg/ml,114.8mg/ml;114.9mg/ml;115mg/ml;116mg/ml;117mg/ml;118mg/ml;119mg/ml;120mg/ml;121mg/ml;122mg/ml;123mg/ml;124mg/ml;125mg/ml;126mg/ml;127mg/ml;128mg/ml;129mg/ml;130mg/ml;131mg/ml;132mg/ml;133mg/ml;133.3mg/ml;133.4mg/ml;134mg/ml;135mg/ml;136mg/ml;137mg/ml;138mg/ml;139mg/ml;140mg/ml;141mg/ml;142mg/ml;143mg/ml;144mg/ml;145mg/ml;146mg/ml;147mg/ml;148mg/ml;149mg/ml;150mg/ml;151mg/ml;152mg/ml;153mg/ml;154mg/ml;155mg/ml;156mg/ml;157mg/ml;158mg/ml;159mg/ml;160mg/ml;161mg/ml;162mg/ml;163mg/ml;164mg/ml;165mg/ml;166mg/ml;167mg/ml;168mg/ml;169mg/ml;170mg/ml;171mg/ml;172mg/ml;173mg/ml;174mg/ml;175mg/ml;176mg/ml;177mg/ml;178mg/ml;179mg/ml;180mg/ml;181mg/ml;182mg/ml;183mg/ml;184mg/ml;185mg/ml;186mg/ml;187mg/ml;188mg/ml;189mg/ml;190mg/ml;191mg/ml;192mg/ml;193mg/ml;194mg/ml;195mg/ml;196mg/ml;197mg/ml;198mg/ml;199mg/ml;200mg/ml;201mg/ml;202mg/ml;203mg/ml;204mg/ml;205mg/ml;206mg/ml;207mg/ml;208mg/ml;209mg/ml;210mg/ml;211mg/ml;212mg/ml;213mg/ml;214mg/ml;215mg/ml;216mg/ml;217mg/ml;218mg/ml;219mg/ml;220mg/ml;221mg/ml;222mg/ml;223mg/ml;224mg/ml;225mg/ml;226mg/ml;227mg/ml;228mg/ml;229mg/ml;230mg/ml;231mg/ml;232mg/ml;233mg/ml;234mg/ml;235mg/ml;236mg/ml;237mg/ml;238mg/ml;239mg/ml;240mg/ml;241mg/ml;242mg/ml;243mg/ml;244mg/ml;245mg/ml;246mg/ml;247mg/ml;248mg/ml;249mg/ml;250mg/ml;251mg/ml;252mg/ml;253mg/ml;254mg/ml;255mg/ml;256mg/ml;257mg/ml;258mg/ml;259mg/ml;260mg/ml;261mg/ml;262mg/ml;263mg/ml;264mg/ml;265mg/ml;266mg/ml;267mg/ml;268mg/ml;269mg/ml;270mg/ml;271mg/ml;272mg/ml;273mg/ml;274mg/ml;或275mg/ml。

4.根据权利要求1所述的水性药物制剂,其中所述热稳定剂是糖。

5.根据权利要求4所述的水性药物制剂,其中所述糖是蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、海藻糖。

6.根据权利要求1所述的水性药物制剂,其中所述热稳定剂是氨基酸。

7.根据权利要求1所述的水性药物制剂,其中所述热稳定剂是脯氨酸、甘氨酸、甘油、牛磺酸或丙烷磺酸。

8.根据权利要求4-7中任何一项所述的水性药物制剂,其中所述热稳定剂的浓度为约2%(w/v)至约10%(w/v)。

9.根据权利要求8所述的水性药物制剂,其中所述热稳定剂的浓度为约5%(w/v)。

10.根据权利要求1所述的水性药物制剂,其中所述粘度降低剂是L-精氨酸。

11.根据权利要求10所述的水性药物制剂,其中L-精氨酸的浓度为约10-100mM。

12.根据权利要求11所述的水性药物制剂,其中L-精氨酸的浓度为约50mM。

13.根据权利要求1所述的水性药物制剂,其中所述缓冲液是基于组氨酸的缓冲液。

14.根据权利要求1所述的水性药物制剂,其中所述缓冲液是基于磷酸盐的缓冲液。

15.根据权利要求1所述的水性药物制剂,其中所述缓冲液是基于柠檬酸盐的缓冲液。

16.根据权利要求1所述的水性药物制剂,其中所述缓冲液是基于乙酸盐的缓冲液。

17.根据权利要求13-16中任何一项所述的水性药物制剂,其中所述缓冲液的浓度为约5mM至约25mM。

18.根据权利要求17所述的水性药物制剂,其中所述缓冲液的浓度为约10mM。

19.根据权利要求17所述的水性药物制剂,其中所述缓冲液的浓度为约20mM。

20.根据权利要求1所述的水性药物制剂,其中pH为约5.0至6.0。

21.根据权利要求20所述的水性药物制剂,其中pH为约5.8。

22.根据权利要求1所述的水性药物制剂,其中所述非离子表面活性剂是基于聚氧乙烯的,聚山梨酯20、聚山梨酯80、泊洛沙姆188或聚乙二醇3350。

23.根据权利要求22所述的水性药物制剂,其中所述非离子表面活性剂的浓度为约0.02%至约0.1%。

24.根据权利要求22所述的水性药物制剂,其中所述非离子表面活性剂的浓度为约0.03%(w/v)。

25.根据权利要求1所述的水性药物制剂,其包含

浓度为至少约100mg/ml的阿帕西普;

蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、海藻糖;

基于组氨酸的缓冲液;

聚山梨酯20或聚山梨酯80;和

L-精氨酸,

pH为约5.0至约6.8;且

其中阿帕西普在制造和纯化后立即具有小于约3.5%的高分子量种类和/或在约2-8℃下储存约24个月后具有小于或等于约6%的高分子量种类。

26.根据权利要求25所述的水性药物制剂,其中

蔗糖、甘露醇、山梨糖醇或海藻糖的浓度为约2-10%(w/v);

L-精氨酸的浓度为约10-100mM;

聚山梨酯20或聚山梨酯80的浓度为约0.02-0.1%(w/v);且

基于组氨酸的缓冲液的浓度为约5-25mM;

pH为约5.0至约6.8。

27.预填充的注射器,其包含根据权利要求1-26中任何一项所述的制剂。

含有高浓度VEGF受体融合蛋白的制剂

[0001] 申请人于2019年5月10日提交发明名称为“含有高浓度VEGF受体融合蛋白的制剂”的PCT申请PCT/US2019/031879,所述PCT申请于2020年12月8日进入中国国家阶段,申请号为201980038234.6。本申请为该中国申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2019年3月5日提交的美国临时专利申请号62/813,882;2018年11月20日提交的美国临时专利申请62/769,876;2018年10月29日提交的美国临时专利申请62/752,127;以及2018年5月10日提交的美国临时专利申请62/669,506的权益;它们的每一个都通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本文的实施方案通常一般地涉及适合于眼内施用的含有高浓度VEGF受体融合蛋白的制剂。更特别地,本文的实施方案提供了用于玻璃体内施用的液体药物制剂,其中所述制剂包含大于40mg/ml的VEGF受体融合蛋白,并显示出药学上可接受的效力、稳定性、粘度和pH。

[0004] 序列表

[0005] 序列表的正式副本与说明书同时通过EFS-Web以ASCII格式的序列表电子提交,其文件名为“10430P1-US_SEQ_LIST_ST25.txt”,创建日期为2018年5月9日,大小为约7KB。该ASCII格式的文档中包含的序列表是说明书的一部分,并且在此以引用的方式全文并入。

背景技术

[0006] 治疗上有用的液体制剂的开发需要不同量的成分的组合,以提供用于目标药物的功能性和稳定的递送载体。当药物是蛋白质,而且进一步是抗体时,尤其如此。抗体制剂长期以来一直对药物开发商和制造商提出挑战,因为抗体活性和施用通常需要药学上可接受的效力、重量克分子渗透浓度、蛋白质稳定性、粘度和适当的pH值。当抗体在制剂中的浓度较高时(例如,超过大多数药物销售抗体的浓度20至40mg/ml),这些挑战会加剧。

[0007] 较高浓度的抗体制剂可缩短注射时间,减少注射量,降低抗体施用频率并提高生产效率和储存效率。但是,如上所述,抗体或蛋白质的浓度越高,维持制剂的适当活性和递送参数就越困难。特别地,高浓度的抗体和蛋白质制剂经常与增加的蛋白质聚集和粘度竞争,这导致较低的整体抗体或蛋白质效能、较低的制造稳定性和较差的储存稳定性。由于与高浓度蛋白质或抗体制剂有关的问题,很少开发出这种药学上可接受的制剂。本领域需要制备包括适当的效力、稳定性、粘度、重量克分子渗透浓度和pH值的高浓度、高稳定性抗体和蛋白质制剂。

[0008] 需要高浓度制剂的一种这样的蛋白是血管内皮生长因子(VEGF)受体融合蛋白。VEGF受体融合蛋白被用于在许多眼科制剂中阻断VEGF的功能,例如EYLEA® (Regeneron Pharmaceuticals,Inc.)。含有高浓度VEGF受体融合蛋白的制剂可以缩短眼部注射时间,减少注射量,每个施用周期减少可能的注射次数,并提高制造和储存效率。

[0009] 本发明旨在克服上面讨论的一个或多个问题。

发明内容

[0010] 本文所述的各种实施方案包括含高浓度蛋白质的制剂(例如,适合于玻璃体内施用),特别是含高浓度血管内皮生长因子(VEGF)受体融合蛋白的制剂。含有高浓度VEGF受体融合蛋白的制剂可提供许多治疗和经济利益,包括药学上可接受的效力、长期的制造和储存稳定性以及与眼内注射相容的粘度和pH值。含有高浓度VEGF受体融合蛋白的制剂还可以减少眼部施用量,这是避免对眼睛有限体积产生不良影响的益处。

[0011] 本文的实施方案提供了具有VEGF受体融合蛋白、缓冲液、热稳定剂、粘度降低剂和表面活性剂的制剂。在其他实施方案中,制剂不包含粘度降低剂。本发明的制剂具有适合于注射,特别是适于治疗性眼部注射的pH和粘度。

[0012] 在本发明的一个实施方案中,提供了本发明的药物制剂,其具有VEGF受体融合蛋白,所述VEGF受体融合蛋白的浓度为至少41mg/ml或包含单剂量的VEGF受体融合蛋白(其在本文讨论)的浓度小于约100□1、小于约50□1、约50□1、约57□1、约60□1、约70□1或约75□1,缓冲液,任选地热稳定剂和/或粘度降低剂,以及表面活性剂,其中所述制剂的pH为约5.0至约6.8(例如5.8)。

[0013] 在本发明的一个实施方案中,VEGF受体融合蛋白浓度为约30mg/ml、60mg/ml、114mg/ml、120mg/ml或140mg/ml。

[0014] 在本发明的一个实施方案中,表面活性剂可以是非离子表面活性剂(例如,约0.02%至约0.1%;或约0.03%(w/v))。在本发明的一个实施方案中,表面活性剂是具有聚氧乙烯部分的非离子表面活性剂,例如,聚山梨酸酯20(PS20)、聚山梨酸酯80(PS80)、泊洛沙姆188、聚乙二醇3350或它们的混合物。

[0015] 在本发明的一个实施方案中,缓冲液是基于组氨酸的缓冲液(例如10mM或20mM),例如组氨酸、盐酸组氨酸或乙酸组氨酸;基于磷酸盐的缓冲液,例如磷酸钠(例如10mM);基于乙酸盐的缓冲液,例如乙酸钠和乙酸,或基于柠檬酸盐的缓冲液,例如柠檬酸钠或柠檬酸。在本发明的一个实施方案中,如果缓冲液是磷酸盐缓冲液,则pH为约5.7至约8.0、约5.8至约8.0、约5.7至约7.0、约5.8至约7.0、约5.9至约7.0或约6.0到7.0;如果缓冲液是组氨酸缓冲液,则pH为约5.5至约6.5;如果缓冲液是柠檬酸盐缓冲液,则pH为约3.0至约6.2或约5.0至约6.0;如果缓冲液是乙酸盐缓冲液,则pH为约3.7至约5.6或约5.0至约6.0。

[0016] 在本发明的一个实施方案中,热稳定剂是糖,例如蔗糖(例如,约2.5%、5%或8%、10%或20%(w/v),例如约2-20%)、甘露醇、山梨糖醇或海藻糖;L-脯氨酸(例如约2%、3%或4%(w/v));甘氨酸(例如,约50mM),甘油,牛磺酸(例如,约50mM)或丙烷磺酸(例如,约50mM)或以上的任意组合。

[0017] 在本发明的一些实施方案中,本发明的药物制剂包含粘度降低剂,例如盐酸精氨酸(例如一盐酸L-精氨酸)(例如50mM)、赖氨酸、氯化钠(例如40mM或50mM)或氯化镁。或者,在其他实施方案中,本发明的制剂明确地排除了基本上所有的(如果不是全部的话)粘度降低剂。

[0018] 在本发明的一个实施方案中,本发明的药物制剂包含本文所述的制剂A-KKKK中的任何一种的成分、由其组成或基本上由其组成。

[0019] 在本文的方面中,本发明的药物制剂可以包含浓度为以下的VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普(aflibercept)或康柏西普(conbercept)):约41mg/ml至约275mg/ml,约

80mg/ml至约275mg/ml,约140mg/ml至约150mg/ml,约140mg/ml至约159或160mg/ml;包括约60mg/ml,约80mg/ml,约100mg/ml,约113.3mg/ml,约114.3mg/ml,约120mg/ml,约133.3mg/ml,约140mg/ml,约150mg/ml,约200mg/ml或约250mg/ml。在本发明的一个实施方案中,所述制剂包含约40mg/ml的VEGF受体融合蛋白。

[0020] 本发明药物制剂的一些方面包括热稳定剂,其浓度为约2%(w/v)至约9%(w/v)或约4%(w/v)至约9%(w/v),条件是,当热稳定剂是牛磺酸或丙烷磺酸时,稳定剂的浓度为约25mM至约100mM,表面活性剂的浓度为约0.02%(w/v)至约0.1%(w/v)(例如约0.03%),缓冲液为约5mM至约15mM。

[0021] VEGF受体融合蛋白可以例如:

[0022] • 由SEQ ID NO:1的核酸序列或SEQ ID NO:1的核苷酸79-1374或79-1371编码;

[0023]

[0024] • 包含SEQ ID NO:2的氨基酸或SEQ ID NO:2的氨基酸27-457或27-458;

[0025]

[0026] • 包括:

[0027] (1)VEGFR1组分,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸27至129;

[0028] (2)VEGFR2组分,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸130至231;

[0029] (3)多聚组分("FcΔC1(a)"),其包含SEQ ID NO:2的氨基酸232至457或458(SEQ ID NO:2的C末端氨基酸即K458可以或可以不包括在VEGF受体融合蛋白中)。注意,SEQ ID NO:2的氨基酸1至26是信号序列;

[0030] • 包含第一VEGF受体(例如,VEGFR1)的免疫球蛋白样(Ig)结构域2和第二VEGF受体(例如,VEGFR2)的Ig结构域3,任选地还包含第二VEGF受体(例如,VEGFR2)的Ig结构域4和多聚组分(例如IgG的Fc结构域);

[0031] • 为康柏西普;或

[0032] • 为阿帕西普。

[0033] VEGF Trap

[0034] atggtcagctactgggacaccggggtcctgctgtgcgcgctgctcagctgtctgcttctcacaggatctagttccggaagtgataccggtagacctttcgtagagatgtacagtgaaatccccgaaattatacacatgactgaaggaagggagctcgtcattccctgccgggttacgtcacctaacatcactgttactttaaaaaagtttccacttgacactttgatccctgatggaaaacgcataatctgggacagtagaaagggcttcatcatatcaaatgcaacgtacaaagaaatagggcttctgacctgtgaagcaacagtcaatgggcatttgtataagacaaactatctcacacatcgacaaaccaatacaatcatagatgtggttctgagtccgtctcatggaattgaactatctgttggagaaaagcttgtcttaaattgtacagcaagaactgaactaaatgtggggattgacttcaactgggaataccttcttcgaagcatcagcataagaaacttgtaaaccgagacctaaaaacccagtctgggagtgagatgaagaaatttttgagcaccttaactatagatggtgtaacccggagtgaccaaggattgtacacctgtgcagcatccagtgggctgatgaccaagaagaacagcacatttgtcagggtccatgaaaaggacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca

[0035] aagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg

[0036] caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccca

[0037] gcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac

[0038] accctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtc

[0039] aaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaac

[0040] aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaag

[0041] ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcat

[0042] gaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

[0043] (SEQ ID NO:1)

[0044] MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVI

[0045] PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATV

[0046] NGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDF

[0047] NWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAA

[0048] SSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR

[0049] TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV

[0050] LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE

[0051] LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

[0052] LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0053] (SEQ ID NO:2)

[0054] AAs 1-26＝信号序列

[0055] AAs 27-129＝Flt1-D2(VEGFR1-D2)

[0056] AAs 130-231＝Flk1-D3(VEGFR2-D3)

[0057] AAs 232-458＝FcΔC1

[0058] 在本发明的另一个实施方案中,提供一种容器,其包含约5mM至约25mM药学上可接受的缓冲液、约4%(w/v)至约9%(w/v)的药学上可接受的热稳定剂、约0.02%(w/v)至约0.1%(w/v)的药学上可接受的表面活性剂和约41mg/ml至约275mg/ml的VEGF受体融合蛋白的水溶液。当热稳定剂包括牛磺酸或丙烷磺酸时,牛磺酸或丙烷磺酸的浓度为约25mM至约100mM。水溶液的pH为约5.0至约6.8,并且可以为约5.5至约6.2(例如5.8)。在一些方面,容器是小瓶或注射器。在其他方面,水溶液不包含无机盐。当热稳定剂是糖时,它可以是蔗糖、甘露醇、山梨糖醇或海藻糖,并且可以以约4%(w/v)至9%(w/v)之间的量存在;表面活性剂可以是非离子表面活性剂,并且可以包含聚氧乙烯部分,例如聚山梨酯20、聚山梨酯80、泊洛沙姆188或聚乙二醇3350,其浓度约为每体积0.02%至0.1%重量(w/v),更通常为0.02%-0.04%(w/v)。在本发明的一个实施方案中,VEGF受体融合蛋白由SEQ ID NO:1的核酸序列或SEQ ID NO:1的核苷酸79-1374或79-1371编码;包含SEQ ID NO:2的氨基酸或SEQ ID NO:2的氨基酸27-457或27-458;包含(1)VEGFR1组分,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸27至129;(2)VEGFR2组分,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸130至231;和(3)多聚组分("FcΔC1(a)"),其包含SEQ ID NO:2的氨基酸232-457(SEQ ID NO:2的C端氨基酸即K458可以或可以不包括在VEGF受体融合蛋白中);包含第一VEGF受体(例如,VEGFR1)的免疫球蛋白样(Ig)结构域2和第二VEGF受体(例如,VEGFR2)的Ig结构域3,任选地还包含第二VEGF受体(例如,VEGFR2)的Ig结构域4和多聚组分(例如IgG的Fc结构域);为康柏西普或为阿帕西普。

[0059] 在其他实施方案中,提供了本发明药物制剂,其具有在水性载体中的VEGF受体融

合蛋白，其中所述水性载体的粘度在20℃为约10cP至约15cP，更通常在20℃为约10cP至13cP，最通常在20℃为约11cP到约12cP(例如在20℃为约6.0、7.3、11.5或12.0cP)。在本发明的一个实施方案中，粘度在20℃为约12cP至约15cP。制剂的pH可以为约5.8至约6.5(例如，约5.8)。在某些情况下，所述制剂不包含粘度降低剂，例如，不包含盐酸精氨酸、赖氨酸、氯化钠或氯化镁。在其他情况下，所述制剂包括10mM盐酸组氨酸或10mM乙酸组氨酸。糖可以是蔗糖、甘露醇、山梨糖醇或海藻糖，并且可以以约4％(w/v)至9％(w/v)之间的量存在(例如约5％)；表面活性剂可以是非离子表面活性剂，并且可以包含聚氧乙烯部分，例如聚山梨酯20、聚山梨酯80、泊洛沙姆188或聚乙二醇3350，其浓度约为每体积0.02％至0.1％重量(w/v)，更通常为0.02％-0.04％(w/v)(例如0.03％)。另外，该制剂可以另外包含热稳定剂，其选自牛磺酸或丙烷磺酸，其浓度为约25mM至约100mM，更通常为约50mM至约70mM。在本发明的一个实施方案中，制剂包含VEGF受体融合蛋白，例如阿帕西普(例如，浓度为约41-275mg/ml，约50mg/ml，约100mg/ml，约115mg/ml，约125mg/ml，约150mg/ml，约200mg/ml或本文讨论的任何“高”浓度)，约10mM的基于组氨酸的缓冲液，约5％(w/v)蔗糖，约0.03％(w/v)非离子表面活性剂，例如聚山梨酸酯，例如聚山梨酸酯20，和约50mM的精氨酸、L-精氨酸或一盐酸L-精氨酸，pH为约5.8。在本发明的一个实施方案中，VEGF受体融合蛋白由SEQ ID NO:1的核酸序列或SEQ ID NO:1的核苷酸79-1374或79-1371编码；包含SEQ ID NO:2的氨基酸或SEQ ID NO:2的氨基酸27-457或27-458；包含(1)VEGFR1组分，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸27至129；(2)VEGFR2组分，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸130至231；和(3)多聚组分(“FcΔC1(a)”)，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸232-457(SEQ ID NO:2的C端氨基酸即K458可以或可以不包括在VEGF受体融合蛋白中)；包含第一VEGF受体(例如，VEGFR1)的免疫球蛋白样(Ig)结构域2和第二VEGF受体(例如，VEGFR2)的Ig结构域3，任选地还包含第二VEGF受体(例如，VEGFR2)的Ig结构域4和多聚组分(例如IgG的Fc结构域)；为康柏西普或为阿帕西普。

[0060] 在又一个实施方案中，提供了本发明的药物制剂，其在药学上可接受的缓冲液中包含浓度为约80mg/ml至约275mg/ml的VEGF受体融合蛋白。在某些情况下，稳定的药物制剂还可以包含牛磺酸或丙烷磺酸。该制剂可以在约2℃至约8℃的温度下稳定大约24-36个月。在某些情况下，当在这些温度下并在此时间量存储时，VEGF受体融合蛋白显示出高分子量种类的增加小于约5％，并且更通常地，高分子量种类的增加小于约4.5％，高分子量种类的增加小于约4.0％，高分子量种类的增加小于约3.5％，高分子量种类的增加小于约3.0％，高分子量种类的增加小于约2.5％，高分子量种类的增加小于约2.0％和/或高分子量种类的增加小于约1.5％。在其他情况下，当将制剂在这些温度下并在此时间量内存储时，VEGF受体融合蛋白显示出高分子量种类的增加小于2.0％至3.0％。

[0061] 本文的实施方案还可包括本发明的药物制剂，其包含阿帕西普、pH缓冲溶液、糖和表面活性剂，其中阿帕西普的浓度为41mg/ml至约275mg/ml。或者，实施方案可以是稳定的液体药物制剂，其包含康柏西普、pH缓冲溶液、糖和表面活性剂，其中康柏西普的浓度为41mg/ml至约275mg/ml。稳定的液体药物制剂还可以包含牛磺酸或丙烷磺酸。在一些方面，阿帕西普或康柏西普的浓度为80mg/ml或150mg/ml。在其他方面，所述制剂不包含无机盐，例如氯化钠。

[0062] 一些实施方案涉及无菌注射器，使得注射器预先填充有水溶液，其具有80mg/ml阿帕西普、康柏西普，10mM盐酸组氨酸、乙酸组氨酸或磷酸钠，5％(w/v)蔗糖、甘露醇、山梨糖

醇或海藻糖，0.03％(w/v)聚山梨酯20、聚山梨酯80、泊洛沙姆188或聚乙二醇3350和40mM氯化钠。本文的方面包括进一步添加约25mM至约100mM，更通常约50mM至约70mM的牛磺酸或丙烷磺酸。在一些方面，所述注射器预先填充有水溶液，其具有80mg/ml阿帕西普、康柏西普，10mM盐酸组氨酸、乙酸组氨酸或磷酸钠，8％(w/v)蔗糖、甘露醇、山梨糖醇或海藻糖，和0.03％(w/v)聚山梨酯20、聚山梨酯80、泊洛沙姆188或聚乙二醇3350。本文的方面包括进一步添加约25mM至约100mM，更通常约50mM至约70mM的牛磺酸或丙烷磺酸。在又其他方面，注射器预先填充有水溶液，其具有150mg/ml阿帕西普、康柏西普，10mM盐酸组氨酸、乙酸组氨酸或磷酸钠，5％(w/v)蔗糖、甘露醇、山梨糖醇或海藻糖，0.03％(w/v)聚山梨酯20、聚山梨酯80、泊洛沙姆188或聚乙二醇3350和40mM氯化钠，pH约为6.2。本文的方面可以包括牛磺酸或丙烷磺酸的进一步添加。在又其他方面，注射器预先填充有水溶液，其具有150mg/ml阿帕西普、康柏西普，10mM盐酸组氨酸、乙酸组氨酸或磷酸钠，8％(w/v)蔗糖、甘露醇、山梨糖醇或海藻糖，和0.03％(w/v)聚山梨酯20、聚山梨酯80、泊洛沙姆188或聚乙二醇3350，pH约为6.2，并且该水溶液不包括无机盐。方面可进一步包括约25mM至约100mM，并且更典型地约50mM至约70mM的牛磺酸或丙烷磺酸。仍在其他方面，注射器预先填充有水溶液，其具有150mg/ml阿帕西普或康柏西普、10mM乙酸钠或乙酸、5％(w/v)甘油和0.03％(w/v)聚山梨酯20、聚山梨酯80、泊洛沙姆188或聚乙二醇3350和40mM氯化钠，pH约为6.2。仍在其他方面，注射器预先填充有水溶液，其具有150mg/ml阿帕西普或康柏西普、10mM乙酸钠或乙酸、8％(w/v)甘油和0.03％(w/v)聚山梨酯20、聚山梨酯80、泊洛沙姆188或聚乙二醇3350和40mM氯化钠，pH约为6.2。

[0063] 本发明还提供了制备本文所述的任何制剂的方法，包括将制剂的每种组分合并为单一组合物的步骤。这样的方法可以包括将所得制剂添加到小瓶或注射装置中的步骤。为此类方法的产物的任何组合物也构成本发明的一部分。例如，本文的实施方案还包括通过将基于组氨酸的、基于柠檬酸盐的、基于乙酸盐的或基于磷酸盐的缓冲液与蔗糖、聚山梨酯20和VEGF受体融合蛋白；以及任选地，例如本文所述的一个或多个附加组分组合来制备制剂的方法。在某些情况下，该制剂被制备成还包含牛磺酸或丙烷磺酸，但是在不包含牛磺酸或丙烷磺酸的情况下，它也可以不包含无机盐。在本文的方面中，蔗糖的每体积重量为约4％至约10％，聚山梨酯20的每体积重量为约0.02％至约0.1％，并且受体融合蛋白的浓度为约41mg/ml至约275mg/ml。在制剂包含牛磺酸或丙烷磺酸的情况下，其以例如约25mM至约100mM的量存在，但也可以以50mM至70mM包括。该方法可以包括将预定体积的制备制剂装载到无菌注射器中，使得该体积具有0.1mg至10mg剂量的VEGF受体融合蛋白。

[0064] 本发明还提供了向受试者(例如人)施用本发明的制剂的方法，包括眼内注射(例如玻璃体内注射)该制剂到受试者的眼睛中。本发明还提供了向受试者(例如人)施用本发明的制剂的方法，包括将包含本发明的制剂的玻璃体内植入物植入受试者的玻璃体内。

[0065] 本文的实施方案还包括通过眼内注射至少约2mg(例如4mg、6mg或8mg)的VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普或康柏西普)例如本文所述的任何制剂到有需要的受试者的眼睛中治疗有需要的受试者中的血管原性眼病的方法，例如年龄相关性黄斑变性(湿性)、视网膜静脉阻塞后的黄斑水肿、视网膜静脉阻塞(RVO)、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、视网膜分支静脉阻塞(BRVO)、糖尿病性黄斑水肿(DME)、脉络膜新生血管(CNV)、虹膜新生血管、新生血管性青光眼、青光眼的手术后纤维化、增生性玻璃体视网膜病变(PVR)、视盘新血管形成、

角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、玻璃体新生血管形成、角膜翳、翼状胬肉、血管性视网膜病或糖尿病性视网膜病(例如,非增殖性糖尿病性视网膜病和/或增殖性糖尿病性视网膜病)。在本发明的一个实施方案中,注射体积为100微升或更小(例如100微升、50微升或57微升)。该方法包括玻璃体内注射预混合水溶液,其具有浓度为41mg/ml至约275mg/ml的VEGF受体融合蛋白、药学上可接受的糖、药学上可接受的缓冲液和药学上可接受的表面活性剂。使用预混合水溶液的处理方法无需稀释。在本文的方面中,预混合水溶液的pH为约6.0至约6.5,并且粘度为约10cP至13cP。

[0066] 在治疗方法的方面,VEGF受体融合蛋白包含由SEQ ID NO:1的核酸序列编码的VEGFR1R2-FcΔC1(a)、SEQ ID NO:2的氨基酸27至129、包含SEQ ID NO:2的氨基酸130至231的VEGFR2组分或包含SEQ ID NO:2的氨基酸232至457的多聚化组分,或其任何组合。在本发明的一个实施方案中,VEGF受体融合蛋白是阿帕西普或康柏西普。

[0067] 根据本文的公开内容的其它实施方案将从随后详细说明的阅读变得显而易见。

附图说明

[0068] 参考附图,本文公开的实施方案的上述和其他方面、特征和优点对于本领域普通技术人员将变得更加显而易见。

[0069] 图1A是确定四种不同制剂(B、H、D和G)在2℃至8℃下在36个月的过程中VEGF受体融合蛋白(阿帕西普)稳定性的图。使用尺寸排阻超高效液相色谱(SE-UPLC)测试了VEGF受体融合蛋白的稳定性,以鉴定高分子量(HMW)种类的形成(蛋白降解的迹象)。

[0070] 图1B也是确定四种制剂(B、H、D和G)在2℃至8℃下在36个月的过程中VEGF受体融合蛋白(阿帕西普)稳定性的图。使用SE-UPLC测试了VEGF受体融合蛋白的稳定性,以鉴定每种制剂中主要种类的百分比。

[0071] 图1C是条形图,显示了在四个制剂(B、H、D和G)中在2℃至8℃下在36个月的过程中形成了VEGF受体融合蛋白电荷异质体。使用成像毛细管等电聚焦(iCIEF)在制造(0.0)、12个月、24个月和36个月时测试了酸性物质的水平。

[0072] 图1D是条形图,显示了在四个制剂(B、H、D和G)中在2℃至8℃下在36个月的过程中形成了VEGF受体融合蛋白电荷异质体。使用iCIEF在制造(0.0)、12个月,24个月和36个月时测试了主要种类的成分。

[0073] 图2A是显示在37℃下28天的过程中在10mM磷酸钠、8%(w/v)蔗糖和0.03%聚山梨酯20(w/v)制剂pH6.2(有和没有一盐酸L-精氨酸)中150mg/ml VEGF受体融合蛋白(阿帕西普)稳定性的图。使用SE-UPLC测试了VEGF受体融合蛋白的稳定性,以鉴定HMW种类的形成。

[0074] 图2B是显示在37℃下28天的过程中在10mM磷酸钠、8%(w/v)蔗糖和0.03%聚山梨酯20(w/v)制剂pH6.2(有和没有一盐酸L-精氨酸)中150mg/ml VEGF受体融合蛋白稳定性的图。使用SE-UPLC测试了VEGF受体融合蛋白的稳定性,以鉴定每种制剂中主要种类的百分比。

[0075] 图3A是条形图,显示了具有155mg/ml VEGF受体融合蛋白且不含盐、有100mM精氨酸、200mM精氨酸、50mM赖氨酸、200mM赖氨酸、50mM氯化钠或100mM氯化钠的10mM磷酸钠缓冲制剂的粘度。粘度在20℃以cP为单位测量。

[0076] 图3B是条形图,显示了具有155mg/ml VEGF受体融合蛋白且不含盐、有100mM精氨

酸、200mM精氨酸、50mM赖氨酸、200mM赖氨酸、50mM氯化钠或100mM氯化钠的10mM组氨酸缓冲制剂的粘度。粘度在20℃以cP为单位测量。

[0077] 图4A是显示在有和没有50mM的一盐酸L-精氨酸的情况下在5℃下历时12个月在10mM磷酸钠、8％(w/v)蔗糖和0.03％(w/v)聚山梨酯20，pH6.2中

[0078] 150mg/ml VEGF受体融合蛋白的稳定性的图。VEGF受体融合蛋白为150mg/ml。使用SE-UPLC测试了VEGF受体融合蛋白的稳定性，以鉴定HMW种类的形成。

[0079] 图4B是显示在5℃下历时12个月在10mM磷酸钠、8％(w/v)蔗糖和0.03％(w/v)聚山梨酯20，pH6.2(有和没有50mM一盐酸L-精氨酸)中150mg/ml VEGF受体融合蛋白的稳定性的图。VEGF受体融合蛋白为150mg/ml。使用SE-UPLC测试了VEGF受体融合蛋白的稳定性，以鉴定每种制剂中主要种类的百分比。

[0080] 图5是显示在20℃两个缓冲条件(10mM磷酸盐缓冲液或10mM组氨酸缓冲液)下制剂的粘度的图。VEGF受体融合蛋白浓度在10mg/ml至170mg/ml之间变化。粘度以mPa-S为单位。

[0081] 图6显示了多种不同配制条件的动态光散射筛选(screen)，每种条件具有2至10mg/ml的蛋白质。扩散相互作用参数表明了牛磺酸和PSA(丙烷磺酸)改善了Kd。

[0082] 图7是在5℃储存6个月后通过体积排阻超高效液相色谱(SE-UPLC)测量的制剂F1-F9(制剂WW-EEE)中高分子量(HMW)种类百分比随时间变化的图表。制剂F1-F9在本文的表7-1中列出。

[0083] 图8(A-B)通过SE-UPLC在5℃下储存3个月(A)或在37℃下孵育28天(B)后测量的高分子量种类的百分比。制剂F1-F4(EEE、SSS、CCC(140mg/ml)和TTT)在下表8-1中列出。

[0084] 图9示出制剂F1-F12在初始时间点的在20℃的粘度(cp)。制剂F1-F12在下表A中列出。

[0085] 表A.制剂F1-F12。

[0086]

制剂编号	VEGF Trap (mg/mL)	缓冲液	其他赋形剂	筛选赋形剂 (mM)
F1(GGG)	140	20 mM 组氨酸，pH 5.8	5%蔗糖，0.03%聚山梨酯 20	50mM 硫酸钠
F2(HHH)	140	20 mM 组氨酸，pH 5.8	5%蔗糖，0.03%聚山梨酯 20	50mM 硫氰酸钠
F3(III)	140	20 mM 组氨酸，pH 5.8	5%蔗糖，0.03%聚山梨酯 20	40mM 柠檬酸钠
F4(JJJ)	140	20 mM 组氨酸，	5%蔗糖，0.03%聚	50mM 甘氨酸

[0087]

		pH 5.8	山梨酯 20	
F5(KKK)	140	20 mM 组氨酸，pH 5.8	5%蔗糖，0.03%聚山梨酯 20	50mM 氯化钠
F6(LLL)	140	20 mM 组氨酸，pH 5.8	5%蔗糖，0.03%聚山梨酯 20	50mM 赖氨酸
F7(MMM)	140	20 mM 组氨酸，pH 5.8	5%蔗糖，0.03%聚山梨酯 20	50mM 天冬氨酸钠
F8(NNN)	140	20 mM 组氨酸，pH 5.8	5%蔗糖，0.03%聚山梨酯 20	50mM 谷氨酸钠
F9(OOO)	140	20 mM 组氨酸，pH 5.8	5%蔗糖，0.03%聚山梨酯 20	50mM 柠檬酸钠+ 50mM 盐酸精氨酸
F10(PPP)	140	20 mM 组氨酸，pH 5.8	5%蔗糖，0.03%聚山梨酯 20	50mM 甘氨酸+ 50mM 盐酸精氨酸
F11(QQQ)	140	20 mM 组氨酸，pH 5.8	5%蔗糖，0.03%聚山梨酯 20	50mM 天冬氨酸钠+ 50mM 盐酸精氨酸
F12(RRR)	140	20 mM 组氨酸，pH 5.8	5%蔗糖，0.03%聚山梨酯 20	50mM 谷氨酸钠+ 50mM 盐酸精氨酸

[0088] 图10显示制剂F1-F12的重量克分子渗透浓度(mmol/Kg)(在本文表A中列出)。

[0089] 图11(A-B)通过SE-UPLC在37℃储存达28天(A)或在5℃储存达3个月(B)后随时间测量的制剂F1-F6(制剂GGG、HHH、III、JJJ、LLL和KKK)中随时间的高分子量种类百分比。

[0090] 图12示出了在表9-3(GGG-RRR)中所示的制剂的初始时间点处的动态光散射(扩散系数(cm^2/秒)、半径(nm)和%Pd)。

[0091] 图13示出了在阿帕西普施用前两个不同的兔子(326-OS和329-OD)的基线FA图像和OCT(30度晶状体)(OD＝oculus dexter(右眼);OS＝oculus sinister(左眼))。(A)兔子326左眼的FA图像;(B)兔子326左眼的OCT图像;(c)兔子329右眼的FA图像;(D)兔子329右眼的OCT图像。

[0092] 图14(A-F)显示了施用组氨酸缓冲液制剂(30度晶状体)(7mg/眼)的一只兔子(326-OS)在第1天(A)、第7天(B)和第14天(C)的兔子FA图像以及在第1天(D)、第7天(E)和第14天(F)的OCT的时程。

[0093] 图15(A-H)显示了施用组氨酸缓冲液制剂(55度晶状体)(7mg/眼)的一只兔子(326-OS)在3周(A)、4周(B)、7周(C)和8周(D)的兔子FA图像;以及3周(E)、4周(F)、7周(G)和8周(H)的OCT的时程。

[0094] 图16(A-F)显示了施用磷酸盐缓冲液制剂(30度晶状体)(7mg/眼)的一只兔子(329-OS)在第1天(A)、第1周(B)和第2周(C)的兔子FA图像以及在第1天(D)、第1周(E)和第2周(F)的OCT的时程。

[0095] 图17(A-H)显示了施用磷酸盐缓冲液制剂(55度晶状体)(7mg/眼)的一只兔子(329-OS)在第3周(A)、第4周(B)、第7周(C)和第8周(D)的兔子FA图像以及在第3周(E)、第4周(F)、第7周(G)和第8周(H)的OCT的时程。

[0096] 图18(A-B)显示了在37℃下(长达一个月)制剂UUU-BBBB中随时间的纯度(天然种类的百分比)(A)和高分子量(HMW)种类百分比(B)(参见表11-1),如由SE-UPLC分析的。

[0097] 图19(A-E)显示了制剂的稳定性和纯度分析,该制剂具有在10mM组氨酸,pH 5.8、5%蔗糖,0.03%聚山梨酯20、50mM一盐酸精氨酸中配制的114.3mg/mL VEGF Trap(阿帕西普),该分析是通过尺寸排阻色谱法测定以下的百分比:(i)在5℃或37℃孵育达2个月后的高分子量种类(HMW)(A)和(ii)在5℃或37℃孵育达2个月后的主要种类(主峰)(B);以及通过微流成像确定在37℃下孵育达28天后在显微镜下才能看到的颗粒物的存在(C),通过颗粒光遮蔽分析确定在37℃下孵育达28天后在显微镜下才能看到的颗粒物的存在(D),和通过显微镜确定在37℃孵育达28天后在显微镜下才能看到的颗粒物(E)。

[0098] 图20显示了具有80、100、120或140mg/ml阿帕西普的制剂CCC的稳定性和纯度分析,该分析是在2-8℃下孵育达6个月(A)或在37℃下达28天(B)后通过SE-UPLC测定高分子量种类(HMW)的百分比。

[0099] 图21显示了在施用500微克或2mg阿帕西普时,随时间用完全渗漏抑制测试的随时间的在兔子眼内的百分比(Gehan-Breslow-Wilcoxon测试(P 0.0453))。

具体实施方式

[0100] 本发明提供了具有高浓度的VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普)的制剂,尽管具有显著的技术障碍,其仍显示出形成了优异的功能和储存特性。例如,一种用于鉴定包含多肽药物(例如VEGF受体融合蛋白)的制剂的合适赋形剂的常用方法是通过评估加速压力条件例如高温(例如37℃)下的多肽稳定性。在非压力条件下(例如低温,如5℃)不适合的赋形剂通常在短时间内在压力下会引起不期望的影响(例如蛋白质聚集)。这种方法在生物技术和制药工业中常见,因为它加速消除不太可能稳定药物产品的赋形剂。参见例如Magari,Assessing Shelf Life Using Real-Time and Accelerated Stability Tests,Biopharm Intl.16(11):36-48(2003)。在某些情况下,可基于加速的稳定性数据来释放产品,但这必须与实时货架寿命分析(非加速)同时进行。Magari(2003)以及FDA,Guidelines for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics,Rockville,MD(1987)。然而,在这里,在5℃,组氨酸制剂中精氨酸的存在是稳定的,尽管看

起来精氨酸趋向于在温度压力下(37℃)降低稳定性。参见图8(A-B)。本文阐述的制剂的这种性质将带来技术上的困难,其指导从业者不选择精氨酸;因此,从业人员不太可能会选择精氨酸作为赋形剂。然而,本文提出的制剂由于克服了诸如这种的技术上的障碍而获得具有高稳定性的制剂。相对于磷酸盐缓冲液制剂所观察到的粘度,组氨酸缓冲液中VEGF trap的配制还导致粘度的有益降低。由于优选小针孔进行玻璃体内注射(由于减少的患者不适感和眼外伤),因此期望相对较低的粘度。较低粘度的制剂需要较小的力来将制剂推过针头,从而使治疗医师更容易通过针头注射制剂。另外,在兔眼中对含组氨酸和精氨酸的制剂具有良好的耐受性。

[0101] 现在将详细参考代表性实施方案。应当理解,以下描述并非旨在将实施方案限制为一个优选实施方案。相反,它们旨在覆盖可以包括在所附权利要求中所限定的所描述的实施方案的精神和范围内的替代、修改和等同形式。

[0102] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。如本文所用,当用于提及具体所列举的数值时,术语"约"意指数值可以与所引用的值相差不超过1%。因此例如,如本文所用,表述"约100"包含99和101以及其之间的所有值(例如,99.1%、99.2%、99.3%、99.4%等)。

[0103] 在本发明的一个实施方案中,本发明的药物制剂符合眼部溶液的小体积注射(SVP)的USP<789>,例如每ml含有少于约50个直径≥10□m的颗粒;每ml含有少于约5个直径≥25□m的颗粒;或每ml含有少于约2个直径≥50□m的颗粒。

[0104] 注意,出于本文的目的,"玻璃体内注射"是指注射入眼睛的玻璃体(在眼后的视网膜附近)。表述"适用于玻璃体内施用"、"适用于玻璃体内注射"等表示可以将所讨论的制剂安全地注射到受试者眼睛的玻璃体中,而不会引起任何已知与玻璃体内注射EYLEA相关的不良反应。

[0105] 本文中的术语"药物制剂"是指包括药学上可接受的载体的制剂,例如,用于将VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普或康柏西普)施用于受试者以用于治疗/医学用途。

[0106] 术语"药学上可接受的"是指在合理的医学判断范围内适用于施用至眼睛的制剂。

[0107] 本文中的术语"受试者"是指任何哺乳动物(例如兔子、小鼠,大鼠或猴子)受试者,尤其是人类,例如对于其期望用本文所述的制剂进行诊断、预后或治疗。

[0108] 术语"水性"制剂是指包括水的制剂。

[0109] 术语"治疗(treat)"或"治疗(treatment)"是指逆转、稳定或消除不希望的疾病或病症(例如血管原性眼病或癌症)的治疗措施,例如通过引起这种疾病或病症的一种或多种症状或指征消退、稳定或消除任何临床上可测量的程度(例如,关于血管原性眼病),通过降低或维持糖尿病性视网膜病严重程度评分(DRSS),通过改善或维持视力(例如,最佳矫正视力敏锐度,例如,通过增加ETDRS字母测量的)、增加或保持视野和/或减少或保持视网膜中央厚度,以及就癌症而言,停止或逆转受试者中癌症细胞的生长、存活和/或转移。通常,治疗措施是向患有疾病或病症的受试者施用一剂或多剂治疗有效量的VEGF受体融合蛋白。

[0110] "预防(prevent)"或"预防(prevention)"是指阻止不期望的疾病或病症(例如,血管原性眼病)的发展的预防措施。

[0111] SE-UPLC可用于本发明中以定量制剂中高分子量种类的存在。SE是指尺寸排阻色谱法。UPLC是指超高效液相色谱。可以在UPLC系统中用于表征制剂中VEGF受体融合蛋白(例

如阿帕西普或康柏西普)的此类HMW种类的合适的SE色谱柱能够分辨分子量范围约为10,000-450,000道尔顿的分子。例如,参见ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 200Å色谱柱。在本发明的一个实施方案中,当定量制剂中的HMW种类时,将两个这样的柱串联连接。与HPLC(高效液相色谱)相比,UPLC的灵敏度和分辨率有所提高。UPLC使用的仪器在高压下运行,并且使用的颗粒比HPLC中使用的颗粒更细(通常小于2.5μm)。此外,UPLC流动相比HPLC在高的线速度下运行。

[0112] 本文的实施方案包括制剂,其包含高浓度(例如,约60mg/ml、约80mg/ml、约90mg/ml、约100mg/ml、约113.3mg/ml、约114.3mg/ml、约120mg/ml、约133.3mg/ml、约140mg/ml、约150mg/ml、约200mg/ml或约250mg/ml)VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普或康柏西普)。本文包括的合适制剂包含高浓度的VEGF受体融合蛋白、缓冲液、热稳定剂和表面活性剂。在一些方面,合适的制剂还包括粘度降低剂。在其他方面,合适的制剂基本上不包括所有粘度降低剂。典型的制剂具有约5.0至约6.8(例如5.8)的pH,但是可以包括可用于将VEGF受体融合蛋白施用于受试者的眼睛的任何pH。

[0113] 本发明包括制剂,其包含VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普或康柏西普)与一种或多种其他治疗剂结合(例如,Ang-2抑制剂(例如,抗ANG2抗体或其抗原结合片段)或奈西伐单抗(nesvacumab)),Tie-2受体激活剂,抗PDGF、PDGF受体或PDGF受体β抗体或其抗原结合片段和/或其他VEGF拮抗剂,例如贝伐单抗、雷珠单抗、哌加他尼或人血管内皮生长因子受体3(VEGFR-3)的可溶形式,其包含细胞外结构域1-3,以Fc融合蛋白表示),以及预防或治疗方法,包括施用本文所述的此类制剂。在本发明的一个实施方案中,本发明的制剂包含VEGF受体融合蛋白,例如阿帕西普,但不包括任何其他治疗剂(例如,其是抗体或其抗原结合片段)。

[0114] 术语“与...结合”表示可以将制剂和其他治疗剂配制成单一组合物,例如,以便同时递送,或分别配制成两种或更多种组合物(例如,试剂盒)。所述其他治疗剂本身可以被配制成其自身的药物制剂。可以在与其它相同的时间或者与施用其它不同的时间将每种施用于受试者;例如,每次施用可以在给定的时间间隔内非同时(例如,分别或按照顺序)给予。此外,制剂和其他治疗剂可以通过相同或不同的途径施用于受试者。

[0115] 在本发明的一个实施方案中,本发明的制剂包含任何一种或多种硫酸钠(例如50mM);硫氰酸钠(例如50mM);柠檬酸钠(例如40mM);甘氨酸(例如50mM);氯化钠(例如50mM);赖氨酸(例如50mM);天门冬氨酸钠(例如50mM);和/或谷氨酸钠(例如50mM)。例如,在一个实施方案中,所述制剂包含组合:柠檬酸钠(例如50mM)和盐酸精氨酸(例如50mM);甘氨酸(例如50mM)和盐酸精氨酸(例如50mM);天门冬氨酸钠(例如50mM)和盐酸精氨酸(例如50mM);或谷氨酸钠(例如50mM)和盐酸精氨酸(例如50mM)。

[0116] VEGF受体融合蛋白和其他VEGF抑制剂

[0117] 为了本文的目的,“VEGF受体融合蛋白”是指包含与另一个多肽融合的一个或多个VEGF受体或其结构域的分子,其干扰VEGF和天然VEGF受体之间的相互作用,例如其中两个这样的融合多肽结合,从而形成同型二聚体或其他多聚体。这样的VEGF受体融合蛋白可以被称为“VEGF-Trap”或“VEGF Trap”。在本公开内容范围内的落入该定义的VEGF受体融合蛋白包括嵌合多肽,其包含VEGF受体的两个或更多个免疫球蛋白(Ig)样结构域,例如VEGFR1(也称为Flt1)和/或VEGFR2(也称为Flk1或KDR),并且也可包含多聚结构域(例如Fc结构

域)。

[0118] 示例性的VEGF受体融合蛋白是被称为VEGF1R2-FcΔC1(a)的分子,其由SEQ ID NO:1的核酸序列或其核苷酸79-1374或79-1371编码。

[0119] VEGF1R2-FcΔC1(a)包含三个组分:

[0120] (1)VEGFR1组分,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸27至129;

[0121] (2)VEGFR2组分,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸130至231;和

[0122] (3)多聚组分("FcΔC1(a)"),其包含SEQ ID NO:2的氨基酸232至457(SEQ ID NO:2的C末端氨基酸即K458可以或可以不包括在VEGF受体融合蛋白中,参见美国专利号7,396,664或7,354,579,出于所有目的将其并入本文)。注意,

[0123] SEQ ID NO:2的氨基酸1至26是信号序列。

[0124] 在本发明的一个实施方案中,VEGF受体融合蛋白包含SEQ ID NO:2的氨基酸27-458或27-457。

[0125] 在本发明的一个实施方案中,VEGF受体融合蛋白包括

[0126] (1)第一VEGF受体(例如VEGFR1)的免疫球蛋白样(Ig)结构域2,和

[0127] (2)第二VEGF受体(例如VEGFR2)的Ig结构域3,

[0128] (3)并且任选地,还包括第二VEGF受体(例如,VEGFR2)的Ig结构域4和

[0129] (4)多聚组分(例如IgG的Fc结构域)。

[0130] 例如,在本发明的一个实施方案中,VEGF受体融合蛋白具有所述结构域的以下排列:

[0131] •[VEGFR1Ig结构域2]-[VEGFR2Ig结构域3]-[MC](例如,其同型二聚体)

[0132] 或

[0133] •[VEGFR1Ig结构域2]-[VEGFR2Ig结构域3]-[VEGFR2Ig结构域4]-

[0134] [MC](例如,其同型二聚体)。

[0135] 在本发明的一个实施方案中,VEGF受体融合蛋白是VEGF微型陷阱(trap),其是具有截短的多聚组分(例如,Fc)的VEGF Trap分子,例如,其中微型陷阱仍然包括Fc铰链区。参见例如WO2005/00895或美国专利号7,396,664。

[0136] 注意,本公开在其范围内还包括高浓度制剂,该高浓度制剂代替VEGF受体融合蛋白而包括VEGF结合分子和抗VEGF抗体及其抗原结合片段,

[0137] •贝伐单抗(例如,约80-90或88mg/ml的浓度),

[0138] •雷珠单抗(例如浓度为约20-40mg/ml,例如21-35、21或35mg/ml),

[0139] •抗VEGF适体,例如哌加他尼(例如哌加他尼钠),

[0140] •单链(例如V_L-V_H)抗VEGF抗体,例如brolucizumab(例如a-*--*---------浓度约为200-400或200、210、400或420mg/ml),

[0141] •抗VEGF DARPin,例如Abicipar Pegol DARPin(例如,浓度约为70-140、

[0142] 70或140mg/ml),或

[0143] •双特异性抗VEGF抗体,例如,其也可与ANG2结合,例如RG7716(例如,浓度约为100-400、100、105、400或420mg/ml)。

[0144] 为了使本文讨论的实施方案的重复性最小化,考虑本发明的范围包括其中本文讨论的任何制剂包括代替VEGF受体融合蛋白的以本文所讨论的任何浓度的抗VEGF抗体或抗

体片段或本文所讨论的其他VEGF结合分子(例如,被抗VEGF DARPin取代)的实施方案。例如,本发明包括具有35或80mg/ml雷珠单抗、缓冲液、热稳定剂、粘度降低剂和表面活性剂的制剂。

[0145] DARPins是设计的锚蛋白重复蛋白。DARPins通常包含约33个氨基酸残基的三至四个紧密堆积的重复序列,每个重复序列均包含一个β转角和两个反平行的α螺旋。该刚性框架提供了蛋白质稳定性,同时能够呈现可变区,其通常每个重复序列包含六个氨基酸残基,用于靶标识别。

[0146] "抗VEGF"抗体或抗体的抗原结合片段是指与VEGF特异性结合的抗体或片段。

[0147] 例示性的VEGF受体融合蛋白包括阿帕西普(EYLEA®,Regeneron Pharmaceuticals,Inc.)或康柏西普(由成都康宏生物技术有限公司商业出售)。参见国际专利申请公开WO2005/121176或WO2007/112675。术语"阿帕西普"和"康柏西普"包括其生物相似形式。提及产品(例如阿帕西普)的生物相似形式通常是指包含相同氨基酸序列的产品,但包括根据U.S.Biologics Price Competition and Innovation Act是生物相似的产品。

[0148] 本发明的药物制剂是"高浓度"。本发明的高浓度药物制剂包含浓度为至少41mg/ml、至少80mg/ml、至少100mg/ml、至少125mg/ml、至少140mg/ml、至少150mg/ml、至少175mg/ml、至少200mg/ml、至少225mg/ml、至少250mg/ml或至少275mg/ml的VEGF受体融合蛋白。或者,"高浓度"可以指制剂包括的VEGF受体融合蛋白的浓度约140mg/ml至约160mg/ml,至少约140mg/ml但小于160mg/ml,约41mg/ml至约275mg/ml,约70mg/ml至约75mg/ml或约80mg/ml至约250mg/ml。在一些方面,所述制剂中的VEGF受体融合蛋白浓度为约以下浓度的任一种:41mg/ml;42mg/ml;43mg/ml;44mg/ml;45mg/ml;46mg/ml;47mg/ml;48mg/ml;49mg/ml;50mg/ml;51mg/ml;52mg/ml;53mg/ml;54mg/ml;55mg/ml;56mg/ml;57mg/ml;58mg/ml;59mg/ml;60mg/ml;61mg/ml;62mg/ml;63mg/ml;64mg/ml;65mg/ml;66mg/ml;67mg/ml;68mg/ml;69mg/ml;70mg/ml;71mg/ml;72mg/ml;73mg/ml;74mg/ml;75mg/ml;76mg/ml;77mg/ml;78mg/ml;79mg/ml;80mg/ml;81mg/ml;82mg/ml;83mg/ml;84mg/ml;85mg/ml;86mg/ml;87mg/ml;88mg/ml;89mg/ml;90mg/ml;91mg/ml;92mg/ml;93mg/ml;94mg/ml;95mg/ml;96mg/ml;97mg/ml;98mg/ml;99mg/ml;100mg/ml;101mg/ml;102mg/ml;103mg/ml;104mg/ml;105mg/ml;106mg/ml;107mg/ml;108mg/ml;109mg/ml;110mg/ml;111mg/ml;112mg/ml;113mg/ml;113.3mg/ml;114mg/ml;114.1mg/ml;114.2mg/ml;114.3mg/ml;114.4mg/ml;114.5mg/ml;114.6mg/ml,114.7mg/ml,114.8mg/ml;114.9mg/ml;115mg/ml;116mg/ml;117mg/ml;118mg/ml;119mg/ml;120mg/ml;121mg/ml;122mg/ml;123mg/ml;124mg/ml;125mg/ml;126mg/ml;127mg/ml;128mg/ml;129mg/ml;130mg/ml;131mg/ml;132mg/ml;133mg/ml;133.3mg/ml;133.4mg/ml,134mg/ml;135mg/ml;136mg/ml;137mg/ml;138mg/ml;139mg/ml;140mg/ml;141mg/ml;142mg/ml;143mg/ml;144mg/ml;145mg/ml;146mg/ml;147mg/ml;148mg/ml;149mg/ml;150mg/ml;151mg/ml;152mg/ml;153mg/ml;154mg/ml;155mg/ml;156mg/ml;157mg/ml;158mg/ml;159mg/ml;160mg/ml;161mg/ml;162mg/ml;163mg/ml;164mg/ml;165mg/ml;166mg/ml;167mg/ml;168mg/ml;169mg/ml;170mg/ml;171mg/ml;172mg/ml;173mg/ml;174mg/ml;175mg/ml;176mg/ml;177mg/ml;178mg/ml;179mg/ml;180mg/ml;181mg/ml;182mg/ml;183mg/ml;184mg/ml;185mg/ml;186mg/ml;187mg/ml;188mg/ml;

189mg/ml;190mg/ml;191mg/ml;192mg/ml;193mg/ml;194mg/ml;195mg/ml;196mg/ml;197mg/ml;198mg/ml;199mg/ml;200mg/ml;201mg/ml;202mg/ml;203mg/ml;204mg/ml;205mg/ml;206mg/ml;207mg/ml;208mg/ml;209mg/ml;210mg/ml;211mg/ml;212mg/ml;213mg/ml;214mg/ml;215mg/ml;216mg/ml;217mg/ml;218mg/ml;219mg/ml;220mg/ml;221mg/ml;222mg/ml;223mg/ml;224mg/ml;225mg/ml;226mg/ml;227mg/ml;228mg/ml;229mg/ml;230mg/ml;231mg/ml;232mg/ml;233mg/ml;234mg/ml;235mg/ml;236mg/ml;237mg/ml;238mg/ml;239mg/ml;240mg/ml;241mg/ml;242mg/ml;243mg/ml;244mg/ml;245mg/ml;246mg/ml;247mg/ml;248mg/ml;249mg/ml;250mg/ml;251mg/ml;252mg/ml;253mg/ml;254mg/ml;255mg/ml;256mg/ml;257mg/ml;258mg/ml;259mg/ml;260mg/ml;261mg/ml;262mg/ml;263mg/ml;264mg/ml;265mg/ml;266mg/ml;267mg/ml;268mg/ml;269mg/ml;270mg/ml;271mg/ml;272mg/ml;273mg/ml;274mg/ml;或275mg/ml。本文考虑了其他VEGF受体融合蛋白浓度,只要该浓度根据本文的实施方案起作用即可。

[0149] 在本发明的一个实施方案中,本发明的药物制剂的浓度使得其包含约4、6、8、10、12、14、16、18或20mg VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普),或在本文讨论的其任何可接受剂量中的此类蛋白质的量,在约100□l或更少,约75□l或更少或约70□l或更少,例如约50□l;51□l;52□l;53□l;54□l;55□l;56□l;57□l;58□l;59□l;60□l;61□l;62□l;63□l;64□l;65□l;66□l;67□l;68□l;69□l;70□l;71□l;72□l;73□l;74□l;75□l;76□l;77□l;78□l;79□l;80□l;81□l;82□l;83□l;84□l;85□l;86□l;87□l;88□l;89□l;90□l;91□l;92□l;93□l;94□l;95□l;96□l;97□l;98□l;99□l;或100□l。

[0150] 本发明包括本文“说明性制剂”下列出的任何制剂,但是其中VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普)的浓度被本节(“VEGF受体融合蛋白和其他VEGF抑制剂”)中提出的浓度替代。

[0151] 缓冲液

[0152] 本文使用的缓冲液是指通过使用酸碱缀合物抵抗pH变化的溶液。缓冲液能够将pH维持在约5.0至约6.8的范围内,并且更通常地,在约5.8至约6.5的范围内,并且最通常地,在约6.0至约6.5的范围内。在某些情况下,本发明制剂的pH为约5.0、约5.1、约5.2、约5.3、约5.4、约5.5、约5.6、约5.7、约5.8、约5.9、约6.0、约6.1、约6.2、约6.3、约6.4、约6.5、约6.6、约6.7或约6.8。用于本文制剂中的缓冲液的实例包括基于组氨酸的缓冲液,例如组氨酸、盐酸组氨酸和乙酸组氨酸。包含在本文制剂中的缓冲液可以替代地是基于磷酸盐的缓冲液,例如磷酸钠,基于乙酸盐的缓冲液,例如乙酸钠或乙酸,或者可以是基于柠檬酸盐的缓冲液,例如柠檬酸钠或柠檬酸。还认识到缓冲液可以是上述的混合物,只要该缓冲液能在上述pH范围内缓冲制剂即可。在某些情况下,缓冲液为约5mM至约25mM,或更通常为约5mM至约15mM。缓冲液可以是约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约11mM、约12mM、约13mM、约14mM、约15mM、约16mM、约17mM、约18mM、约19mM、约20mM、约21mM、约22mM、约23mM、约24mM或约25mM。

[0153] 在本发明的一个实施方案中,使用组氨酸和一盐酸组氨酸制备基于组氨酸的缓冲液。

[0154] 表面活性剂

[0155] 本文使用的表面活性剂是指保护较高浓度的VEGF受体融合蛋白免受各种表面和界面诱导的应力的成分。这样，表面活性剂可用于限制或最小化VEGF受体融合蛋白的聚集，并促进蛋白的溶解性。已经显示本文中合适的表面活性剂是非离子的，并且可以包括具有聚氧乙烯部分的表面活性剂。此类中的示例性表面活性剂包括：聚山梨酯20、聚山梨酯80、泊洛沙姆188、聚乙二醇3350及其混合物。制剂中的表面活性剂可以以每体积重量约0.02％至约0.1％(w/v)存在，并且更通常地约0.02％至约0.04％(w/v)。在一些情况下，表面活性剂为约0.02％(w/v)、约0.03％(w/v)、约0.04％(w/v)、约0.05％(w/v)、约0.06％(w/v)、约0.07％(w/v)、约0.08％(w/v)、约0.09％(w/v)或约0.1％(w/v)。

[0156] 热稳定剂

[0157] 本文所用的热稳定剂是指提供针对VEGF受体融合蛋白的热变性的热稳定性以及防止VEGF受体融合蛋白的效能或活性丧失的成分。合适的热稳定剂包括糖，并且可以是蔗糖、海藻糖、山梨糖醇或甘露糖醇，或者可以是氨基酸，例如L-脯氨酸、L-精氨酸(例如一盐酸L-精氨酸)或牛磺酸。另外，热稳定剂还可以包括取代的丙烯酰胺或丙烷磺酸，或者可以是诸如甘油的化合物。

[0158] 在某些情况下，本文的制剂包括糖和牛磺酸、糖和氨基酸、糖和丙烷磺酸、糖和牛磺酸、甘油和牛磺酸、甘油和丙烷磺酸、氨基酸和牛磺酸、或氨基酸和丙烷磺酸。另外，制剂可以包括糖、牛磺酸和丙烷磺酸，甘油、牛磺酸和丙烷磺酸，以及L-脯氨酸、牛磺酸和丙烷磺酸。

[0159] 本文的实施方案通常具有单独存在的热稳定剂，各自独立地以下述浓度存在，或者以下述的总浓度组合存在：约2％(w/v)至约10％(w/v)或约4％(w/v)至约10％(w/v)，或约4％(w/v)至约9％(w/v)，或约5％(w/v)至约8％(w/v)。制剂中的热稳定剂的浓度可以为约2％(w/v)、约2.5％(w/v)、约3％(w/v)、约4％(w/v)、约5％(w/v)、约6％(w/v)、约7％(w/v)、约8％(w/v)、约9％(w/v)、约10％(w/v)或约20％(w/v)。

[0160] 关于牛磺酸和丙烷磺酸，在本发明的一个实施方案中，这些热稳定剂在制剂中的存在量可以为约25mM至约100mM，更通常为约50mM至约75mM(与其他热稳定剂相比)。

[0161] 粘度降低剂

[0162] 粘度降低剂通常用于减少或防止蛋白质聚集。用于本文的粘度降低剂包括：氯化钠、氯化镁、D-或L-精氨酸(例如，一盐酸L-精氨酸)、赖氨酸或其混合物。当本文中存在时，粘度降低剂可以以约10mM至约100mM，并且更典型地为约30mM至约75mM，并且甚至更典型地为约40mM至约70mM的量存在。在某些情况下，粘度降低剂以下述存在：约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约45mM、约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM或约100mM。

[0163] 制剂粘度

[0164] 根据本文的实施方案的制剂还可以具有用于眼内施用例如玻璃体内注射的药学上可接受的粘度。粘度通常是指通过剪切应力或拉应力而变形的流体的阻力的量度(通常通过本领域已知的技术例如粘度计或流变仪测量)。根据本文的实施方案的制剂的典型粘度是约5.0cP(厘泊)至约15cP，约11cP至约14cP，约12cP至约15cP或约11cP至约12cP。因此，本文的制剂粘度可以为约5.0cP、约6.0、约7.1cP、约7.2cP、约7.3cP、约7.4cP、约7.5cP、约7.6cP、约10cP、约10.5cP、约11.0cP、约11.5cP、约12.0cP、约12.5cP、约13.0cP、约13.5cP、

约14.0cP、约14.5cP或约15.0cP(例如,在20℃时测量)。

[0165] 本文的各种实施方案不需要包含无机盐或其他粘度降低剂来维持这些高度有用的粘度。通常,高浓度的蛋白质溶液需要粘度降低剂以避免蛋白质聚集和较高的粘度,这使得该制剂难以玻璃体内注射并且降低了VEGF受体融合蛋白的效力。这样,本文的实施方案包括基本上没有或没有添加氯化钠(NaCl)、氯化镁($MgCl_2$)、盐酸D-或L-精氨酸、赖氨酸或其他粘度降低剂的制剂。

[0166] 制剂重量克分子渗透浓度

[0167] 重量克分子渗透浓度是可注射制剂的关键属性。期望具有与生理渗透条件匹配的产品。此外,重量克分子渗透浓度可确认溶液中的可溶内容物。在本发明的一个实施方案中,本发明制剂的重量克分子渗透浓度小于或等于约506mmol/Kg或约250至约506mmol/Kg,例如约250、260、270、280、290、299、300、310、314、315、316、324、343、346、349、369、384、403、426、430或506mmol/Kg。在本发明的一个实施方案中,重量克分子渗透浓度低于约250mmol/Kg。

[0168] 制剂的纯度和稳定性

[0169] 本文所述的含有高浓度VEGF受体融合蛋白的制剂在制造和储存期间是稳定的。本文中的术语"稳定的"是指包含VEGF受体蛋白的制剂在制剂的制造和储存期间保持化学和物理稳定性,例如,其保持完整性并且具有最小的降解、变性或展开。VEGF受体蛋白的稳定性可以使用本领域中可用的分析技术在不同温度和不同时间段确定。特别地,可以使用各种生物测定法(例如,用于确定本文的VEGF受体融合蛋白的$VEGF_{165}$结合的BAF/3VEGFR1/EPOR细胞系)确定VEGF受体化学稳定性(效能),和通过尺寸排阻(SE)色谱分析、UPLC(超高效液相色谱)尺寸排阻(SE)色谱、视觉外观、OD、pH、电荷异质体形成和高分子量(HMW)种类形成速率确定物理稳定性。稳定的VEGF受体融合蛋白是在OD、pH、电荷变异体形成和HMW种类形成方面表现出有限变化的蛋白。

[0170] 如本文所用的提及含有给定VEGF Trap(例如阿帕西普)的制剂的"高分子量"(HMW)种类是指该制剂中从尺寸排阻色谱柱(例如,SE-UPLC)在VEGF Trap多肽和/或其同型二聚体之前(例如,具有比其更高的分子量)洗脱的任何多肽或多肽复合种类类。HMW种类的百分比是指此种类相对于制剂中多肽总量的百分比,例如通过SE-UPLC分析。

[0171] 在本发明的一个实施方案中,如在以下实施例中更全面地讨论的,当在约2℃至约8℃下储存时在长达12个月、长达24个月和/或长达36个月的期间稳定的制剂显示出显著的VEGF受体融合蛋白效力和物理稳定性。

[0172] 在本发明的实施方案中,本发明的制剂是以下的制剂:

[0173] • 在约37℃下约28天后,高分子量种类具有大约3%、5%、10%、11%、

[0174] 12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、20%、30%、35%或37%(或

[0175] 10-15%或15-20%或10-20%)的增加(例如,通过SE-UPLC或SEC测量)

[0176] • 在约37℃下约28天后,主要种类具有大约5%、6%、9%、10%、11%、

[0177] 12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%或22%(或

[0178] 5-20%或5-10%或10-15%或15-20%)的减少(例如,通过SE-UPLC或SEC

[0179] 测量)

[0180] • 在约37℃下约28天后,具有约80%、81%、82%、83%、84%、85%、

[0181] 86%或87%(或约80-85%)或更多的蛋白质作为主要种类(例如,通过SE-

[0182] UPLC或SEC测量)

[0183] • 在约37℃下约28天后,低分子量种类增加了约1或1.5或2%(或1-

[0184] 2%)(例如,通过SE-UPLC或SEC测量)

[0185] • 在约37℃下约一个月后,高分子量种类增加了约16%;和/或主要种类减少了约17%和/或低分子量种类增加了约0.5%或<1%;和/或在约5℃下约两个月后,主要种类减少了约1%,和/或高分子量种类增加了约1%,和/或无显著或可检测的量的低分子量(LMW)种类;和/或在约5℃下约2个月后,具有约97%的主要种类(例如通过SE-UPLC或SEC测量)

[0186] • 在约2-8℃下约12个月后,高分子量种类增加了约3-3.5%(例如,通过SE-UPLC或SEC测量)

[0187] • 在约2-8℃下约12个月后,主要种类减少小于约1%或1%、2%、3%或4%(例如,1-4%或3-4%)(如由SE-UPLC或SEC测量)

[0188] • 在约2-8℃下约12个月后,具有约94%或95%或更多的蛋白质作为主要种类(例如,通过SE-UPLC或SEC测量)

[0189] • 在约2-8℃下约3个月后,高分子量种类增加了约1%或2%(例如,通过SE-UPLC或SEC测量)

[0190] • 在约2-8℃下约6个月后,高分子量种类增加了约<1%、1%或2%(例如,通过SE-UPLC或SEC测量)

[0191] • 在约5℃下约$5^{1}/_{2}$或6个月后,具有约2.5、3.0或3.5(或约2.5-3.5%)的总高分子量种类(例如,如通过SE-UPLC或SEC测量)。

[0192] • 在约2-8℃下约6个月后,主要种类减少小于约1%或1%或2%(例如,0.5-2%或1-2%)(如由SE-UPLC或SEC测量)

[0193] • 在约2-8℃下约6个月后,具有约96%或97%或98%(或96-98%)或更多的蛋白质作为主要种类(例如,通过SE-UPLC或SEC测量)

[0194] • 在约2-8℃下约24个月或36个月后,高分子量种类的增加小于约5或6或7%(例如,约1.5、2、3、4或5%)(或1.5-5%或1.5-2.5%);和/或具有约3.0、3.25、3.5、4.0、4.5或5%的总高分子量种类;和/或主要种类减少约2%或3%(或2-3%);和/或主要种类的总量大约95%或96%或更多(或95-96%)(例如,通过SE-UPLC或SEC测量)

[0195] • 在约37℃下约1个月之后,在制剂中具有约97、98、99或100%(或97-

[0196] 100%)的阿帕西普可通过RP-HPLC回收

[0197] • 在生产和纯化后立即具有小于约1.5%、2%、2.5%、3.0%或3.5%的高分子量种类(例如,通过SE-UPLC或SEC测量)

[0198] • 在约37℃下约6个月后,具有至少约70%或75%(例如70-75%)的阿帕西普作为主要种类/主峰(例如,通过毛细管等电聚焦(cIEF)或成像的毛细管等电聚焦(非酸性和非碱性种类)测量的)

[0199] • 在约2-8℃下约36个月后,酸性种类增加约1或2%(或1-2%)(例如,通过毛细管等电聚焦(cIEF)或成像的毛细管等电聚焦测量)

[0200] • 在约2-8℃下约36个月后,主要种类/主峰降低约1%或更少(例如,通过毛细管等电聚焦(cIEF)或成像的毛细管等电聚焦测量)

[0201] • 在约2-8℃下约36个月后，主要种类/主峰约78-79％(例如，通过毛细管等电聚焦(cIEF)或成像的毛细管等电聚焦测量)

[0202] 和/或

[0203] • 当玻璃体腔内施用于哺乳动物(例如人或兔子或小鼠)(例如，患有血管形成性眼病，例如湿性AMD)时，不会引起任何与EYLEA(例如，当

[0204] EYLEA被玻璃体内给药0.5或2.0mg)所观察到的临床上不同的不良事件；

[0205] 或不会在眼中引起临床上明显的炎症、长时间的眼内压(IOP)升高、血压的长期升高或降低和/或视网膜脱落。

[0206] 此外，在本发明的实施方案中，高浓度的VEGF受体融合蛋白是稳定的，因为它们在制造和储存过程中几乎没有或没有形成酸性电荷异质体，例如几乎没有或没有形成电荷异质体，如通过例如成像的毛细管等电聚焦测试的。

[0207] 在本发明的实施方案中，本发明的制剂表现出小于或等于约8％的低分子量(LMW)种类。

[0208] 在本发明的实施方案中，本发明的制剂具有小于约0.2、0.4或0.5EU(内毒素单位)/ml的内毒素；

[0209] 在本发明的实施方案中，本发明的制剂基本上不含颗粒物质或大小为约1、2、5、10、25或50微米(或更大)的颗粒物质。

[0210] 在本发明的实施方案中，当通过非还原CE-SDS(SDS毛细管凝胶电泳)分析本发明的制剂时，总峰面积的至少97％是主峰。

[0211] 在本发明的实施方案中，当通过尺寸排阻UPLC(SE-UPLC)分析本发明的制剂时，总峰面积的至少93、94或95％是主峰且小于或等于3.5、4、5或6％是聚集体。

[0212] 在本发明的实施方案中，本发明的制剂是在约2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃或8℃、2-8℃(例如，5℃的平均温度)、23℃、25℃、30℃或37℃。

[0213] 说明性制剂

[0214] 说明性的高浓度VEGF受体融合蛋白制剂包括以下：

[0215] 制剂A:80mg/ml阿帕西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、5％(w/v)蔗糖、0.03％(w/v)聚山梨酯20和40mM氯化钠，pH值为5.8至6.2。

[0216] 制剂B:80mg/ml阿帕西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、5％(w/v)蔗糖、0.03％(w/v)聚山梨酯20和40mM氯化钠，pH值为5.8至6.2。

[0217] 制剂C:80mg/ml阿帕西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、5％(w/v)蔗糖、0.03％(w/v)聚山梨酯20和40mM氯化钠，pH值为5.8至6.2。

[0218] 制剂D:80mg/ml阿帕西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、5％(w/v)蔗糖、0.03％(w/v)聚山梨酯80和40mM氯化钠，pH值为6.2。

[0219] 制剂E:80mg/ml阿帕西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、5％(w/v)蔗糖、0.03％(w/v)聚山梨酯80和40mM氯化钠，pH值为5.8至6.2。

[0220] 制剂F:80mg/ml阿帕西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、5％(w/v)蔗糖、0.03％(w/v)聚山梨酯80和40mM氯化钠，pH值为5.8至6.2。

[0221] 制剂G:80mg/ml阿帕西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、8％(w/v)蔗糖、和0.03％(w/v)聚山梨酯20，pH值为5.8至6.2，并且可选地，特别排除粘度降低剂。

[0222] 制剂H:80mg/ml阿帕西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯20,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0223] 制剂I:80mg/ml阿帕西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯20,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0224] 制剂J:80mg/ml阿帕西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯80,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0225] 制剂K:80mg/ml阿帕西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯80,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0226] 制剂L:80mg/ml阿帕西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯80,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0227] 制剂M:150mg/ml阿帕西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯20和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0228] 制剂N:150mg/ml阿帕西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯20和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0229] 制剂O:150mg/ml阿帕西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯20和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0230] 制剂P:150mg/ml阿帕西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯80和40mM氯化钠,pH值为6.2。

[0231] 制剂Q:150mg/ml阿帕西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯80和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0232] 制剂R:150mg/ml阿帕西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯80和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0233] 制剂S:150mg/ml阿帕西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯20,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0234] 制剂T:150mg/ml阿帕西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯20,pH值为5.8至6.2(如6.2),并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0235] 制剂U:150mg/ml阿帕西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯20,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0236] 制剂V:150mg/ml阿帕西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯80,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0237] 制剂W:150mg/ml阿帕西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯80,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0238] 制剂X:150mg/ml阿帕西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯80,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0239] 制剂Y:80mg/ml康柏西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯20和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0240] 制剂Z:80mg/ml康柏西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯20和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0241] 制剂AA:80mg/ml康柏西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%

(w/v)聚山梨酯20和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0242] 制剂BB:80mg/ml康柏西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯80和40mM氯化钠,pH值为6.2。

[0243] 制剂CC:80mg/ml康柏西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯80和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0244] 制剂DD:80mg/ml康柏西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯80和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0245] 制剂EE:80mg/ml康柏西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯20,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0246] 制剂FF:80mg/ml康柏西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯20,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0247] 制剂GG:80mg/ml康柏西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯20,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0248] 制剂HH:80mg/ml康柏西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯80,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0249] 制剂II:80mg/ml康柏西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯80,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0250] 制剂JJ:80mg/ml康柏西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯80,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0251] 制剂KK:150mg/ml康柏西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯20和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0252] 制剂LL:150mg/ml康柏西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯20和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0253] 制剂MM:150mg/ml康柏西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯20和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0254] 制剂NN:150mg/ml康柏西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯80和40mM氯化钠,pH值为6.2。

[0255] 制剂OO:150mg/ml康柏西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯80和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0256] 制剂PP:150mg/ml康柏西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯80和40mM氯化钠,pH值为5.8至6.2。

[0257] 制剂QQ:150mg/ml康柏西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯20,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0258] 制剂RR:150mg/ml康柏西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯20,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0259] 制剂SS:150mg/ml康柏西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯20,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0260] 制剂TT:150mg/ml康柏西普、10mM基于组氨酸的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯80,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0261] 制剂UU:150mg/ml康柏西普、10mM基于磷酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯80,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0262] 制剂VV:150mg/ml康柏西普、10mM基于柠檬酸盐的缓冲液、8%(w/v)蔗糖、和0.03%(w/v)聚山梨酯80,pH值为5.8至6.2,并且可选地,特别排除粘度降低剂。

[0263] 制剂WW:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、10mM基于组氨酸的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯20和50mM牛磺酸,pH值为5.8。

[0264] 制剂XX:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、20mM基于组氨酸的缓冲液、4%(w/v)脯氨酸、0.03%(w/v)聚山梨酯20和50mM盐酸精氨酸,pH值为5.8。

[0265] 制剂YY:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、20mM基于组氨酸的缓冲液、2.5%(w/v)蔗糖、2.0%(w/v)脯氨酸、0.03%(w/v)聚山梨酯20和50mM牛磺酸,pH值为5.8。

[0266] 制剂ZZ:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、10mM基于组氨酸的缓冲液、2.5%(w/v)蔗糖、2.0%(w/v)脯氨酸、0.03%(w/v)聚山梨酯20和50mM盐酸精氨酸,pH值为5.8。

[0267] 制剂AAA:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、20mM基于组氨酸的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯20和50mM PSA,pH值为5.8。

[0268] 制剂BBB:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、20mM基于组氨酸的缓冲液、2.5%(w/v)蔗糖、2.0%(w/v)脯氨酸、0.03%(w/v)聚山梨酯20和50mM PSA,pH值为5.8。

[0269] 制剂CCC:80、100、120或140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、20mM基于组氨酸的缓冲液、5%(w/v)蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨酯20和50mM盐酸精氨酸,pH值为5.8。

[0270] 制剂DDD:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、10mM基于组氨酸的缓冲液、4%(w/v)脯氨酸、0.03%(w/v)聚山梨酯20和50mM PSA,pH值为5.8。

[0271] 制剂EEE:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、20mM基于组氨酸的缓冲液、5%(w/v)蔗糖和0.03%(w/v)聚山梨酯20,并且任选地无热稳定剂,pH值为5.8。

[0272] 制剂FFF:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普)、10mM磷酸钠、5%(w/v)蔗糖和0.03%聚山梨酯20,pH为6.2。

[0273] 制剂GGG:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普);20mM组氨酸,pH 5.8;5%蔗糖;0.03%聚山梨酯20;50mM硫酸钠

[0274] 制剂HHH:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普);20mM组氨酸,pH 5.8;5%蔗糖;0.03%聚山梨酯20;50mM硫氰酸钠

[0275] 制剂III:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普);20mM组氨酸,pH 5.8;5%蔗糖;0.03%聚山梨酯20;40mM柠檬酸钠

[0276] 制剂JJJ:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普);20mM组氨酸,pH 5.8;5%蔗糖,0.03%聚山梨酯20;50mM甘氨酸

[0277] 制剂KKK:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普);20mM组氨酸,pH 5.8;5%蔗糖,0.03%聚山梨酯20;50mM氯化钠

[0278] 制剂LLL:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普);20mM组氨酸,pH 5.8;5%蔗糖;0.03%聚山梨酯20;50mM赖氨酸

[0279] 制剂MMM:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普);20mM组氨酸,pH 5.8;

5％蔗糖;0.03％聚山梨酯20;50mM天冬氨酸钠

[0280] 制剂NNN:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普);20mM组氨酸,pH 5.8;5％蔗糖;0.03％聚山梨酯20;50mM谷氨酸钠

[0281] 制剂OOO:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普);20mM组氨酸,pH 5.8;5％蔗糖;0.03％聚山梨酯20;50mM柠檬酸钠;50mM盐酸精氨酸

[0282] 制剂PPP:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普);20mM组氨酸,pH 5.8;5％蔗糖;0.03％聚山梨酯20;50mM甘氨酸;50mM盐酸精氨酸

[0283] 制剂QQQ:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普);20mM组氨酸,pH 5.8;5％蔗糖;0.03％聚山梨酯20;50mM天门冬氨酸钠;50mM盐酸精氨酸

[0284] 制剂RRR:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普);20mM组氨酸,pH 5.8;5％蔗糖;0.03％聚山梨酯20;50mM谷氨酸钠;50mM盐酸精氨酸

[0285] 制剂SSS:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普);20mM His,pH 5.8;5％蔗糖;0.03％聚山梨酯20;10mM盐酸L-精氨酸

[0286] 制剂TTT:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普);20mM His,pH 5.8;5％蔗糖;0.03％聚山梨酯20;100mM盐酸L-精氨酸

[0287] 制剂UUU:30mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、10％蔗糖、10mM磷酸盐、0.03％聚山梨酯20,pH 6.2

[0288] 制剂VVV:30mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、20％蔗糖、10mM磷酸盐、0.03％聚山梨酯20,pH 6.2

[0289] 制剂WWW:60mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、10％蔗糖、10mM磷酸盐、0.03％聚山梨酯20,pH 6.2

[0290] 制剂XXX:60mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、20％蔗糖、10mM磷酸盐、0.03％聚山梨酯20,pH 6.2

[0291] 制剂YYY:120mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、10％蔗糖、10mM磷酸盐、0.03％聚山梨酯20,pH 6.2

[0292] 制剂ZZZ:120mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、20％蔗糖、10mM磷酸盐、0.03％聚山梨酯20,pH 6.2

[0293] 制剂AAAA:120mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、10％蔗糖、10mM磷酸盐、0.03％聚山梨酯20、50mM NaCl,pH 6.2

[0294] 制剂BBBB:120mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、20％蔗糖、10mM磷酸盐、0.03％聚山梨酯20、50mM NaCl,pH 6.2

[0295] 制剂CCCC:140mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、10mM磷酸钠、5％蔗糖、40mM氯化钠、0.03％PS20,pH 6.2

[0296] 制剂DDDD:80mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)、20mM基于组氨酸的缓冲液、5％(w/v)蔗糖、0.03％(w/v)聚山梨酯20和50mM一盐酸L-精氨酸,pH值为5.8。

[0297] 制剂EEEE:120.0mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)(例如±12mg/ml)、20mM基于组氨酸的缓冲液(例如±2mM)、5％(w/v)蔗糖(例如±0.5％)、0.03％(w/v)聚山梨酯20(例如0.02-0.04％)和50mM一盐酸L-精氨酸(例如±5mM),pH值为5.8(例如5.6-6.0或5.5-6.1)。

[0298] 制剂FFFF:113.3mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)(例如102-125mg/ml)、20mM基于组氨酸的缓冲液(例如±2mM)、5%(w/v)蔗糖(例如±0.5%)、0.03%(w/v)聚山梨酯20(例如0.02-0.04%)和50mM一盐酸L-精氨酸(例如±5mM),pH值为5.8(例如5.6-6.0或5.5-6.1)。

[0299] 制剂GGGG:114.3mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)(例如103-126mg/ml)、10mM基于组氨酸的缓冲液(例如±1mM)、5%(w/v)蔗糖(例如±0.5%)、0.03%(w/v)聚山梨酯20(例如0.02-0.04%)和50mM一盐酸L-精氨酸(例如±5mM),pH值为5.8(例如5.6-6.0或5.5-6.1)。

[0300] 制剂HHHH:100.0mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)(例如±10mg/ml)、20mM基于组氨酸的缓冲液(例如±2mM)、5%(w/v)蔗糖(例如±0.5%)、0.03%(w/v)聚山梨酯20(例如0.02-0.04%)和50mM一盐酸L-精氨酸(例如±5mM),pH值为5.8(例如5.6-6.0或5.5-6.1)。

[0301] 制剂IIII:133.3mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)(例如±13mg/ml)、20mM基于组氨酸的缓冲液(例如±2mM)、5%(w/v)蔗糖(例如±0.5%)、0.03%(w/v)聚山梨酯20(例如0.02-0.04%)和50mM一盐酸L-精氨酸(例如±5mM),pH值为5.8(例如5.6-6.0或5.5-6.1)。

[0302] 制剂JJJJ:150mg/ml阿帕西普(例如,阿帕西普)(例如±15mg/ml)、10mM磷酸钠、8%(W/V)蔗糖(例如±0.8%)、0.03%(w/v)聚山梨酯20(例如0.02-0.04%)和50mM盐酸L-精氨酸,pH 6.2(例如6.0-6.4或5.9-6.5)。

[0303] 制剂KKKK:114.3mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)(例如±14mg/ml)、20mM基于组氨酸的缓冲液(例如±2mM)、5%(w/v)蔗糖(例如±0.5%)、0.03%(w/v)聚山梨酯20(例如0.02-0.04%)和50mM一盐酸L-精氨酸(例如±5mM),pH值为5.8(例如5.6-6.0或5.5-6.1);

[0304] 或本文阐述的任何制剂。

[0305] 在本发明的实施方案中,上面列出的或本文讨论的任何制剂组成(例如,所有组成)(例如,制剂A-KKKK中的任何一种)的浓度为特别提到的浓度的±约3%、5%或约10%。

[0306] 制造方法

[0307] 本文的实施方案包括制造包含VEGF受体融合蛋白的本发明药物制剂(例如,本文所述的制剂A-KKKK中的任何一种)的方法,该方法包括将制剂的组分合并成单一组合物,并且任选地将制剂引入容器或装置(例如小瓶)或递送装置(例如预填充的注射器)中。作为这种方法的产物的制剂、小瓶或装置是本发明的一部分。

[0308] 在本发明的实施方案中,制备本发明的含有VEGF受体融合蛋白的药物制剂(例如,本文所述制剂A-KKKK的任一种)的方法包括步骤:在培养基中并在表达该蛋白的条件下培养包含一种或多种编码VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)的多核苷酸的宿主细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞);和从宿主细胞和/或培养基中纯化所述蛋白,并将该蛋白的一部分与本文所述药物制剂的赋形剂合并。再次,作为这种方法的产物的制剂、小瓶或装置是本发明的一部分。

[0309] 在本发明的实施方案中,确定制剂中使其高浓度及其最终用途所需的VEGF受体融合蛋白的量和类型。关于缓冲液的量和类型、表面活性剂的量和类型、热稳定剂的量和类型

以及粘度降低剂的包含或具体排除，进行相同的确定。将这些组分合并和混合，确保制剂的pH处于期望的值，例如，在约5.0和约6.8之间(例如5.8)，和/或粘度在期望的值，例如，在20℃时约6.0、7.3、11.5或12.0cP。在本发明的实施方案中，可以将含有高浓度VEGF受体融合蛋白的制剂灭菌并在稳定条件例如在2℃至8℃(例如5℃)下保存长达24或36个月。

[0310] 参加例如Hardman等人，(2001)，《古德曼和吉尔曼治疗学的药理学基础(Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)》，麦格劳希尔出版公司(McGraw-Hill)，纽约市，纽约州；Gennaro，(2000)，《雷明顿：药学的科学与实践(The Science and Practice of Pharmacy)》，利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott，Williams，and Wilkins)，纽约市，纽约州；Avis等人(编著)，(1993)，《药物剂型：胃肠外用药(Pharmaceutical Dosage Forms:Parenteral Medications)》，马塞尔德克尔公司(Marcel Dekker)，纽约；Lieberman等人(编著)，(1990)，《药物剂型：片剂(Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets)》，马塞尔德克尔公司，纽约；Lieberman等人(编著)，(1990)，《药物剂型：分散系统(Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems)，马塞尔德克尔公司，纽约；

[0311] Weiner和Kotkoskie，(2000)，《赋形剂毒性和安全性(Excipient Toxicity and Safety)》，马塞尔德克尔公司，纽约。

[0312] 血管原性眼病和癌症

[0313] 包含VEGF受体融合蛋白的本发明药物制剂(例如，药物制剂A-KKKK的任一种)可用于通过向需要其的受试者施用治疗有效量的本发明制剂中的VEGF受体融合蛋白，例如通过玻璃体内注射，治疗或预防任何血管原性眼病。本文中的血管原性眼病是指由血管的生长或增殖和/或由血管渗漏引起或与之相关的任何眼睛疾病。使用本文的制剂和方法可治疗或可预防的血管原性眼病的非限制性实例包括：

[0314] • 与年龄有关的黄斑变性(湿性)，

[0315] • 黄斑水肿，

[0316] • 视网膜静脉阻塞后黄斑水肿，

[0317] • 视网膜静脉阻塞(RVO)，

[0318] • 视网膜中央静脉阻塞(CRVO)，

[0319] • 视网膜分支静脉阻塞(BRVO)，

[0320] • 糖尿病性黄斑水肿(DME)，

[0321] • 脉络膜新生血管(CNV)，

[0322] • 虹膜新生血管形成，

[0323] • 新生血管性青光眼，

[0324] • 青光眼的手术后纤维化，

[0325] • 增生性玻璃体视网膜病变(PVR)，

[0326] • 视神经乳头新血管形成，

[0327] • 角膜新血管形成，

[0328] • 视网膜新血管形成，

[0329] • 玻璃体新血管形成，

[0330] • 角膜翳，

[0331] • 翼状胬肉，

[0332] • 血管性视网膜病，

[0333] • 糖尿病性视网膜病(例如非增生性糖尿病性视网膜病(例如，以约47或53的糖尿病性视网膜病严重程度等级(DRSS)为特征)或增生性糖尿病性视网膜病；例如，在未患有DME的受试者中)和

[0334] • 患有糖尿病性黄斑水肿(DME)的患者的糖尿病性视网膜病。

[0335] 包含VEGF受体融合蛋白的本发明药物制剂(例如，药物制剂A-KKKK的任一种)可用于通过向需要其的受试者施用治疗有效量的本发明制剂中的VEGF受体融合蛋白，例如通过肌内、肿瘤内、皮下或静脉内注射，治疗或预防任何癌症。癌症包括其生长、增殖、存活和/或转移在一定程度上依赖于血管生成的那些癌症。在本发明的实施方案中，所述癌症是结肠直肠癌、肺癌、皮肤癌、乳腺癌、脑癌、胃癌、肾癌、前列腺癌、肝癌或胰腺癌。

[0336] 因此，本发明提供了用于在有此需要的受试者中治疗或预防血管原性眼病的方法，该方法包括眼内施用治疗有效量的VEGF受体融合蛋白(例如阿帕西普)(例如约4、6或8.0、8.1、8.4或8.5mg)，例如在根据本发明的药物制剂中，例如进入受试者眼睛的玻璃体内。在本发明的实施方案中，给两只眼睛都施用VEGF受体融合蛋白。在本发明的实施方案中，约每2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周或24周施用治疗有效剂量的VEGF受体融合蛋白。在本发明的实施方案中，在不存在血压(收缩压和/或舒张压)显著升高和/或高血压没有发展(例如1级、2级或3级)和/或受试者的眼内压异常高的情况下进行这种治疗或预防的方法。在本发明的实施方案中，该方法包括以下步骤：在所述施用之后，监测受试者的血压(收缩压和/或舒张压)的显著增加和/或高血压的发展(例如，1级、2级或3级)和/或异常高的眼内压。

[0337] 施用模式

[0338] 包含VEGF受体融合蛋白的本发明的药物制剂可以根据已知的医学批准的递送系统来施用。在本文的实施方案中，这些递送系统可包括通过眼、眼内、脉络膜内、玻璃体内或结膜下注射将制剂施用至患者。可选地，本发明的药物制剂也可以通过局部途径例如眼药水、眼凝胶、眼药膏等向患者施用。本文制剂的其他可能的递送途径包括皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服。

[0339] 在本发明的实施方案中，玻璃体内注射本发明的药物制剂包括以下步骤：用包含该制剂的注射器和针头(例如30号注射针头)刺穿眼睛，并注射该制剂(例如小于或等于约100微升；约40、50、55、56、57、57.1、58、60、70或75微升)进入眼睛的玻璃体(例如，具有足够的体积以递送治疗有效量的VEGF受体融合蛋白，例如约4、5、6、7、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8或8.9、9、10、12、14、16、18或20mg VEGF受体融合蛋白)。任选地，该方法包括将局部麻醉剂(例如，普罗卡因、利多卡因或丁卡因)、抗生素(例如，氟喹诺酮)、防腐剂(例如，聚维酮-碘)和/或瞳孔扩张剂施用至待注射的眼睛的步骤。在本发明的实施方案中，在注射之前建立要注射的眼睛周围的无菌区域。在本发明的实施方案中，在玻璃体内注射后，监测受试者眼内压和/或血压的升高。在本发明的实施方案中，另一只眼睛也通过相同的过程被注射。

[0340] VEGF受体融合蛋白的施用量

[0341] 在治疗过程中给予受试者的每剂量高浓度VEGF受体融合蛋白可包含相同或基本相同量的融合蛋白。替代地,在治疗过程中,任何一种剂量的量可以是不同的或可变的。

[0342] 用于治疗或预防癌症(例如,至少部分地通过血管生成介导的)或血管原性眼病的有效或治疗有效量的VEGF受体融合蛋白是指足以引起癌症或血管原性眼病消退、稳定或消除的VEGF受体融合蛋白的量,例如通过以任何临床可测量的程度(例如就血管原性眼病而言)使癌症或血管原性眼病的一种或多种症状或指征消退、稳定或消除,通过降低或维持糖尿病性视网膜病严重程度评分(DRSS),通过改善或维持视力(例如,最佳矫正视力敏锐度,例如,通过增加ETDRS字母测量的)、增加或保持视野和/或减少或保持视网膜中央厚度,以及就癌症而言,停止或逆转受试者中癌症细胞的生长、存活和/或转移。在本发明的实施方案中,用于治疗或预防血管原性眼病的VEGF受体融合蛋白的有效或治疗有效量为每剂量约0.5mg至约10mg或0.5mg至约20mg,包括:约0.5mg或更多;或约2mg或更多,例如约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;

[0343] 3.5mg;3.6mg;3.7mg;3.8mg;3.9mg;4.0mg;4.1mg;4.2mg;4.3mg;

[0344] 4.4mg;4.5mg;4.6mg;4.7mg;4.8mg;4.9mg;5.0mg;5.1mg;5.2mg;

[0345] 5.3mg;5.4mg;5.5mg;5.6mg;5.7mg;5.8mg;5.9mg;6.0mg;6.1mg;

[0346] 6.2mg;6.3mg;6.4mg;6.5mg;6.6mg;6.7mg;6.8mg;6.9mg;7.0mg;

[0347] 7.1mg;7.2mg;7.3mg;7.4mg;7.5mg;7.6mg;7.7mg;7.8mg;7.9mg;

[0348] 8.0mg;8.1mg;8.2mg;8.3mg;8.4mg;8.5mg;8.6mg;8.7mg;8.8mg;

[0349] 8.9mg;9mg;9.1mg;9.2mg;9.3mg;9.4mg;9.5mg;9.6mg;9.7mg;

[0350] 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;或20mg。在本发明的实施方案中,用于治疗或预防癌症的有效量或治疗有效量的VEGF受体融合蛋白为约4mg/kg(例如静脉注射)。该剂量可以例如每2周施用一次。

[0351] 在本发明的实施方案中,以足以递送例如如上所述的期望剂量的融合蛋白的体积施用VEGF受体融合蛋白。在本发明的实施方案中,递送的体积(例如,例如通过玻璃体内注射用于治疗或预防血管原性眼病)小于或等于约100微升(例如,约以下体积的任一种:25微升;26微升;27微升;28微升;29微升;30微升;31微升;32微升;33微升;34微升;35微升;36微升;37微升;

[0352] 38微升;39微升;40微升;41微升;42微升;43微升;44微升;45微升;

[0353] 46微升;47微升;48微升;49微升;50微升;51微升;52微升;53微升;

[0354] 54微升;55微升;56微升;57微升;58微升;59微升;60微升;61微升;

[0355] 62微升;63微升;64微升;65微升;66微升;67微升;68微升;69微升;

[0356] 70微升;71微升;72微升;73微升;74微升;75微升;76微升;77微升;

[0357] 78微升;79微升;80微升;81微升;82微升;83微升;84微升;85微升;

[0358] 86微升;87微升;88微升;89微升;90微升;91微升;92微升;93微升;

[0359] 94微升;95微升;96微升;97微升;98微升或99微升)。

[0360] 在本发明的实施方案中,以约60微升或更少、约70微升或更少或约75微升或更少或约100微升或更少的体积施用(例如,通过例如玻璃体内注射用于治疗或预防血管原性眼病)所述制剂。例如,在本发明的实施方案中,约2、4、6、8.0、8.1、8.0-8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8或8.9、9.0或10mg的VEGF受体融合蛋白以约50、60、70或75微升施用。

[0361] 本发明的范围还包括在本发明的药物制剂中以低体积例如小于50□l(例如约1、5、10、17、17.5、18、18.5、20、30、40或45□l)递送0.5或2mg VEGF受体融合蛋白的方法(例如,用于治疗或预防血管原性眼病,例如通过玻璃体内注射)。

[0362] 本发明还包括一种组合物,该组合物包括本发明的药物制剂的“单剂量体积”或由其组成或基本上由其组成,即在本发明的药物制剂中包含单剂量的VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普)的体积(例如约50□l或60□l、70□l或75□l或任何体积包含约4、6、8或10mg VEGF受体融合蛋白)。如下所述,包括单个剂量体积,任选地包括小的过量填充体积的制剂的容器(例如,小瓶或注射装置)也是本发明的一部分。

[0363] 容器和注射装置

[0364] 根据本文实施方案的高浓度VEGF受体融合蛋白制剂(例如,制剂A-KKKK中的任何一种)可以被预包装或预装载在各种有用的容器和注射装置中。因此,本发明包括含有这种制剂的容器和注射装置。在本文的实施方式中,容器是可以无菌的小瓶。在本文的另一个实施方案中,容器是可以是无菌的试管。在本发明的实施方案中,注射装置(可以是无菌的)是注射器(例如,预填充的注射器或自动注射器)。在本发明的一个实施方案中,注射装置是玻璃体内植入物,例如可再填充的玻璃体内植入物。

[0365] “预填充”注射器是在出售或医师或患者使用之前用本发明的制剂填充的注射器。

[0366] 本文中“无菌的”是指无病菌的或没有基本上全部或全部活微生物及其孢子。

[0367] 本文使用的注射器包括圆筒,其例如由玻璃或聚合物例如美国专利公开2017/0232199(其出于所有目的并入本文)中所述的环烯烃制成,柱塞和针头。

[0368] 容器和注射装置可涂有硅酮(例如硅油或烘烤的硅酮(例如≤40□g或≤100□g))。

[0369] 在本发明的实施方案中,容器或注射装置是基本上无金属的或基本上无钨的或低钨的。

[0370] 在本发明的一个实施方案中,注射器包含一个或多个剂量线刻度和/或为剂量计量系统。

[0371] 根据本文的实施方案的容器可以容纳高浓度的VEGF受体融合蛋白制剂。在某些方面,容器或注射装置可包括陈述使用说明的标签。在某些情况下,本文的容器或注射装置可包括带有如在整个本说明书中所述使用的说明书的包装插页。

[0372] 在其他实施方案中,包含单剂量或多剂量(例如2或大于2)的高浓度VEGF受体融合

蛋白(例如,其中剂量为2mg、4mg、6mg、8mg或10mg的VEGF受体融合蛋白)的体积(如上所述的)可以预包装到容器或注射装置例如无菌注射器中,以用于储存直至使用。在一个实例中,容器中的体积包括单剂量的VEGF受体融合蛋白,任选地还包括少量的过量填充体积。可以将无菌的预装注射器在储存条件(例如2℃-8℃)下保持例如长达12个月、24个月或36个月。过量填充是指足以允许撤回和/或施用适当体积的过量体积。在本发明的一个实施方案中,容器具有单个剂量体积或多个剂量体积和约5%-10%的过量填充体积。

[0373] 注射器的尺寸可以是例如0.3cc、0.5cc或1cc。无菌注射器通常包括可用于眼内注射的针头,长度通常约为1/2英寸,或12.5mm至16mm,并且根据患者和医疗保健专家的喜好,可以为29号、30号、31号、32号或33号。只要针头有效地完成玻璃体内注射,就可以使用其他针头长度和规格。

[0374] 尽管已经参考多个实施方案具体地示出和描述了本发明,但是本领域技术人员将理解,可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下,对这里公开的各个实施方案进行形式和细节上的改变并且在此公开的各种实施方案并不旨在作为对权利要求的范围的限制。

[0375] 其他制剂

[0376] 本发明包括以下制剂,其包含大于40mg/ml VEGF受体融合蛋白(例如,阿帕西普或康柏西普)以及:

[0377] (a)缓冲液,其包含组氨酸盐(例如组氨酸-HCl或组氨酸-乙酸盐,例如10mM至50mM),且pH值为5.7至6.2;糖(例如,大于6%,但不大于10%),例如蔗糖、海藻糖、甘露醇或葡萄糖;表面活性剂,其选自聚山梨酯20和聚山梨酯80(例如0%至0.1%);

[0378] (b)含有组氨酸的缓冲液,例如L-组氨酸/盐酸组氨酸(例如10mM);非离子表面活性剂,例如聚山梨酯20(例如0.03%),无机盐,例如NaCl(例如40mM)和碳水化合物,例如蔗糖(例如5%),例如pH 6.0-6.5(例如6.2或6.5);

[0379] (c)柠檬酸(例如5mM、10mM、15mM、20mM、25mM或30mM),蔗糖(例如1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%),精氨酸(例如5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM或50mM或100mM),聚山梨酯20(例如0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%或0.10%);

[0380] (d)缓冲液,例如磷酸盐、组氨酸、乙酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、谷氨酸盐和/或乳酸盐(例如5-20或5-50mM);非离子表面活性剂,例如聚山梨酯(例如PS20或PS80)、聚乙二醇十二烷基醚、泊洛沙姆、4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯基-聚乙二醇、烷基糖或烷基糖苷,渗透剂(tonicifying agent),例如多元醇或氨基酸,例如蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、甘露醇、甘油、脯氨酸、精氨酸、蛋氨酸、甘氨酸或赖氨酸,其中制剂的最终重量克分子渗透浓度为约300mOsm/kg,并且其中氯阴离子的浓度小于约10mM;pH值5.0-6.5;或者

[0381] (e)10mM磷酸钠、40mM氯化钠、0.03%聚山梨酯20和5%蔗糖,pH 6.2。

[0382] 具体实施方式

[0383] 实施例

[0384] 提供以下实施例仅用于说明目的,并不旨在限制本发明的范围。已经努力确保关于所使用的数字的准确性,但是应该考虑一些实验误差和偏差。这些实施例中列出的任何制剂都是本发明的一部分。

[0385] 在这些实施例中,当一个实验在2-8℃下进行时,温度目标为5℃,具有±3℃变化

的公差。

[0386] 实施例1:80mg/ml VEGF受体融合蛋白制剂在36个月的期间内保持效力、物理稳定性和电荷。

[0387] 测试了具有80mg/ml VEGF受体融合蛋白(阿帕西普)的一系列四种不同制剂的长期效力、物理稳定性和电荷异质体的形成。四种制剂中每种的成分清单列于表1-1。通过SE-UPLC,评估每种制剂在2℃至8℃下36个月储存过程中VEGF受体融合蛋白HMW种类的形成,以及主要种类百分比。还使用成像毛细管等电聚焦在相同的时间过程和温度评估了每个包含VEGF受体融合蛋白的制剂。最后,在相同的时间过程和温度下,通过生物测定法测试每种制剂的效力。

[0388] 表1-1.含有VEGF受体融合蛋白的制剂

[0389]

制剂	VEGFT (mg/mL)	磷酸钠 (mM)	组氨酸 (mM)	蔗糖 (w/v)	聚山梨酯20(w/v)	氯化钠 (mM)	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

[0390] 表1-2.%HMW种类

[0391]

	制剂 B	制剂 H	制剂 D	制剂 G
	制剂 1	制剂 2	制剂 3	制剂 4
2-8℃下月数				
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

[0392] 表1-3.%主峰

[0393]

	制剂 B	制剂 H	制剂 D	制剂 G
	制剂 1	制剂 2	制剂 3	制剂 4

[0394]

2-8℃下月数				
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

[0395] 表1-4.%酸性种类

[0396]

	制剂B	制剂H	制剂D	制剂G
	制剂1	制剂2	制剂3	制剂4
2-8℃下月数				
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

[0397] 表1-5.%主要种类

[0398]

	制剂 B	制剂 H	制剂 D	制剂 G
	制剂 1	制剂 2	制剂 3	制剂 4
2-8℃下月数				
0.0	78.9	79.1	79.2	79.9
12	79.3	79.3	NP	79.7

[0399]

24.0	79.3	78.5	79.5	79.3
36.0	78.6	78.1	78.7	78.6

[0400] 数据示于图1A、1B、1C和1D。图1A显示了四种制剂中每种形成的VEGF受体融合蛋白HMW种类的百分比。与磷酸钠相比，当制剂是基于组氨酸的时，VEGF TRAP的HMW种类形成速率略慢。如图1A所示，在2℃至8℃下储存36个月后的％HMW种类在磷酸钠制剂(制剂1和2)中增加了2.6％，相比而言组氨酸缓冲液(制剂3和4)中增加了1.6％至1.9％。如图1B所示，数据得到了证实，其中SE-UPLC用于鉴定在相同时间范围和温度范围内存在的VEGF受体融合蛋白主要种类的百分比。作为比较点，对具有10mM磷酸钠的当前EYLEA®制剂(40mg/ml)进行测定，其表明，在2℃至8℃保存36个月后％HMW种类增加了1.2％(未显示)。此外，测试了四种80mg/ml VEGF TRAP制剂的每一种的效力，并与EYLEA®活性进行了比较(未显示)。通过所有四种制剂以及EYLEA®的生物测定法保持效力。这些数据表明，本文的制剂能够维持与EYLEA®相当的VEGF受体融合蛋白稳定性。

[0401] 参照图1C和1D，还测试了在2℃至8℃储存36个月后形成的VEGF TRAP电荷异质体的百分比。图1C显示了制剂1-4中的VEGF TRAP在36个月的过程中没有显示出酸性种类百分比的有意义的变化，图1D显示了在36个月的过程中对于主要种类百分比的相同发现。VEGF TRAP在存储过程中保持电荷异质体种类的发现表明，VEGF TRAP的质量得以保持，并且在存储参数过程中未发生例如脱氨、N末端焦谷氨酸形成、异构化、聚集等过程。

[0402] 实施例1中的数据表明，在EYLEA®中具有两倍于VEGF TRAP浓度的制剂可以在2℃至8℃下36个月的过程中保持物理稳定性、质量和效力。此外，尽管在此期间所有四种制剂均显示出相似的效力，但含组氨酸的制剂导致HMW种类形成(蛋白质降解的迹象)的增加量略小，表明在某些情况下，组氨酸可能是选择的缓冲液。但是，基于组氨酸和磷酸盐的缓冲液的发现在整个研究过程中均显示出极好的稳定性。

[0403] 实施例2：在磷酸钠缓冲液/蔗糖制剂中150mg/ml的VEGF TRAP稳定性。

[0404] 测试了两种磷酸钠制剂在37℃下28天中150mg/ml VEGF Trap(阿帕西普)的物理稳定性。两种制剂中每种的成分清单均在表2-1中列出。通过SE-UPLC，评估每种制剂在37℃下28个天储存过程中HMW种类的形成，以及主要种类百分比。

[0405] 表2-1.实施例2的含有VEGF受体融合蛋白(阿帕西普)的制剂

[0406]

制剂	VEGFT (mg/mL)	磷酸钠 (mM)	蔗糖 (w/v)	聚山梨酯 20(w/v)	盐酸精氨酸(mM)	pH
F1 (T)	150	10	8%	0.03	N/A	6.2
F2 (JJJJ)	150	10	8%	0.03	50	6.2

[0407] 表2-2.％HMW种类

[0408]

	10 mM 磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨酯 20，pH 6.2	10 mM 磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨酯 20、50 mM 单盐酸 L-精氨酸，pH 6.2
	磷酸盐	磷酸盐-精氨酸
在 37℃下的天数		
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

[0409]

[0410] 表2-3.%主峰

[0411]

	10 mM 磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨酯 20，pH 6.2	10 mM 磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨酯 20、50 mM 单盐酸 L-精氨酸，pH 6.2
	磷酸盐	磷酸盐-精氨酸
在 37℃下的天数		
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

[0412] 图2A显示，在37℃储存28天期间，两种制剂之间形成的%HMW种类没有有意义的差

异,这由SE-UPLC确定的主要种类百分比确认(图2B)。在28天的过程中,两种制剂的外观、浊度或pH没有变化(未显示)。

[0413] 然后将结果与包含40mg/ml EYLEA®的制剂和实施例1的制剂1(在磷酸钠缓冲液中为80mg/ml VEGF TRAP)进行比较。如所预期的,与EYLEA®制剂相比,150mg/ml VEGF TRAP制剂显示出更高的HMW种类形成百分比,并且与实施例1的制剂1相比,显示出稍微更高的HMW种类形成百分比。

[0414] 对含高浓度VEGF TRAP的制剂进行了进一步测试,含组氨酸的制剂比基于磷酸钠的制剂对这些分子的保护作用更好。此外,将氯化钠掺入每种测试制剂中实际上导致在37℃下VEGF TRAP不稳定。实施例2中的数据表明,即使在150mg/ml的高浓度VEGF受体融合蛋白和相当高的温度存储下,本文的制剂也为物理稳定性提供了极好的保护。

[0415] 实施例3:对于150mg/ml的VEGF TRAP,可以获得药学上可接受的制剂粘度。

[0416] 测试了许多包含VEGF Trap(阿帕西普)的制剂的粘度性质。在存在和不存在各种粘度降低剂的情况下测试具有10mg/ml至160mg/ml VEGF Trap的制剂。

[0417] 图3A显示了具有在10mM磷酸钠缓冲液中的155mg/ml VEGF Trap,5%蔗糖和pH 6.2且结合没有无机盐,精氨酸、赖氨酸、氯化钠和氯化镁的制剂显示出粘度几乎没有差异。在每种情况下,粘度在20℃以cP为单位测量。观察到粘度范围在约17cP(无无机盐)和15cP(100mM氯化镁)之间,在使用粘度降低剂或者完全存在粘度降低剂之间几乎没有变化。图3B显示了一系列类似的制剂,除了碱性缓冲液是10mM组氨酸和pH 5.8。在此,缺少任何无机盐提供了具有11.5cP粘度的制剂和50mM赖氨酸为14cP粘度。含组氨酸的缓冲液具有出色的粘度,与其他低浓度生物注射剂一致。

[0418] 测试了在不存在精氨酸的情况下在pH为6.2下用10mM磷酸钠、5%蔗糖,以及在50mM盐酸精氨酸下,在10mg/ml至160mg/ml浓度之间的VEGF Trap的粘度。对于所有测试的VEGF Trap浓度,包含粘度降低剂都产生相似的粘度。如图3A和3B所示,即使在较高的蛋白质浓度下,粘度降低剂对制剂粘度也几乎没有积极影响。这是令人惊讶的结果,因为精氨酸和其他粘度降低剂先前已显示出对高浓度蛋白粘度具有有益的特性。

[0419] 表3-1.粘度-磷酸盐制剂(20℃时cP)

[0420]

缓冲液组成	10mM磷酸钠、5%蔗糖,pH 6.2
没有粘度降低剂	17.3
100mM精氨酸	16.2
200mM精氨酸	15.8
50mM赖氨酸	16.2
100mM氯化钠	16.5
50mM氯化镁	16.3
100mM氯化镁	15.3

[0421] 表3-2.粘度-组氨酸制剂(20℃时cP)

[0422]

缓冲液组成	10mM组氨酸,pH 5.8
没有粘度降低剂	11.5
100mM精氨酸	12.0

200mM精氨酸	12.7
50mM赖氨酸	14.0
200mM赖氨酸	14.1
50mM氯化钠	13.1
100mM氯化钠	12.1
50mM氯化镁	12.6
100mM氯化镁	11.4

[0423] 实施例4:盐酸精氨酸改善了磷酸钠缓冲液/蔗糖制剂中150mg/ml VEGFTRAP的稳定性。

[0424] 测试了两种磷酸钠制剂在2-8℃下12个月中150mg/ml VEGF Trap(阿帕西普)的物理稳定性。两种制剂中每种的成分清单均在表4-1中列出。制剂2还包含50mM的盐酸精氨酸。通过SE-UPLC,评估每种制剂在37℃下12个月储存过程中HMW种类的形成,以及主要种类百分比。

[0425] 表4-1.实施例3的含有VEGF受体融合蛋白(阿帕西普)的制剂

[0426]

制剂	VEGFT (mg/mL)	磷酸钠 (mM)	蔗糖 (w/v)	聚山梨酯 20(w/v)	pH	盐酸精氨酸(mM)
F1 (T)	150	10	8%	0.03	6.2	0
F2 (JJJJ)	150	10	8%	0.03	6.2	50

[0427] 图4A显示制剂中包含50mM盐酸精氨酸改善了VEGF TRAP的物理稳定性。VEGF TRAP的这种稳定属性在图4B中得到了证实,其中在存在50mM盐酸精氨酸的情况下,VEGF TRAP的主要种类百分比仍然较高。该数据表明,在某些情况下,添加盐酸精氨酸可为储存的VEGF TRAP提供稳定作用。表4-2和4-3中列出了排阻色谱法数据。

[0428] 表4-2.%HMW种类

[0429]

	10 mM 磷酸钠、8% 蔗糖、0.03%聚山梨酯 20，pH 6.2	10 mM 磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨酯 20、50 mM 单盐酸 L-精氨酸，pH 6.2
2-8℃下月数		
0.0	2.4	1.9

[0430]

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

[0431] 表4-3.%主峰

[0432]

	10 mM 磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨酯 20，pH 6.2	**10 mM 磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨酯 20、50 mM 单盐酸 L-精氨酸，pH 6.2**
2-8℃下月数		
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

[0433] 实施例5:在组氨酸和磷酸盐缓冲液中的粘度为10mg/ml至170mg/ml VEGF TRAP

[0434] 图5显示10mM磷酸盐缓冲液和10mM组氨酸缓冲液对于一定范围的VEGF Trap(阿帕西普)浓度都具有非常有用的粘度。在较高的VEGF Trap浓度下,组氨酸缓冲液显示出粘度的改善(相对于磷酸盐)。粘度在20℃下测量。

[0435] 实施例6:牛磺酸和丙烷磺酸为高浓度的VEGF Trap(阿帕西普)制剂提供了改善的稳定性。

[0436] 进行了实验以确定多种制剂组合对蛋白质稳定性的影响。图6示出了具有从2mg/ml蛋白质到10mg/ml蛋白质(阿帕西普)之间的任何值的制剂的动态光散射图。包含70mM牛磺酸或70mM PSA的制剂在较高浓度下显示出降低的自我相互作用。这些数据表明,牛磺酸和PSA可能是高浓度蛋白质制剂中有用的内含物,就像在这种情况下所讨论的那样。

[0437] 实施例7:各种含组氨酸制剂的稳定性的长期研究。

[0438] 用不同的缓冲液浓度、热稳定剂和疏水性盐测试了总共9种不同的阿帕西普制剂。表7-1总结了9种制剂F1-F9。

[0439] 表7-1.制剂F1-F9。

[0440]

制剂	VEGFT (mg/mL)	缓冲液类型	缓冲液浓度 (mM)	蔗糖 (%w/v)	脯氨酸 (%w/v)	聚山梨酯20(w/v)	稳定剂 (mM)	稳定剂浓度 (mM)	pH
F1(WW)	140	His	10	5	0	0.03	牛磺酸	50	5.8
F2(XX)	140	His	20	0	4	0.03	盐酸精氨酸	50	5.8
F3(YY)	140	His	20	2.5	2	0.03	牛磺酸	50	5.8
F4(ZZ)	140	His	10	2.5	2	0.03	盐酸精氨酸	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	盐酸精氨酸	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

[0441] VEGFT＝VEGF Trap(阿帕西普)

[0442] 在15mL Falcon管中混入十四(14)mL每种制剂。然后使用0.22μM注射器过滤器对制剂进行无菌过滤,并装入无菌的2mL 1型玻璃小瓶中。在层流罩中,以0.4mL的体积将八(8)个小瓶装满每种制剂。

[0443] 对所有样品进行SE-UPLC(分子量种类)以确定每种制剂的化学稳定性。

[0444] 图7中显示了每种制剂F1-F9的HMW种类随时间变化的百分比(另参见表7-2)。制剂F4和F7在5℃下4个月后显示出最低百分比的HMW种类。结果表明,添加精氨酸和脯氨酸等赋形剂可显著降低VEGF Trap制剂中％HMW种类形成的速率。

[0445] 表7-2.SE-UPLC分析(2-8℃)

	F1(WW)		F2(XX)		F3(YY)	
2-8℃下月数	%HMW	%主峰	%HMW	%主峰	%HMW	%主峰
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

[0446]

F4 (ZZ)		F5 (AAA)		F6 (BBB)	
%HMW	%主峰	%HMW	%主峰	%HMW	%主峰
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)

[0447]

%HMW	%主峰	%HMW	%主峰	%HMW	%主峰
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

[0448] 实施例8:具有不同精氨酸浓度的140mg/mL VEGF Trap的稳定性研究。

[0449] 研究了不同浓度的盐酸精氨酸对四种140mg/mL VEGF Trap(阿帕西普)眼药产品制剂稳定性的影响。在2-8℃的储存条件下进行稳定性评估。药物(DP)也在应力(37℃)条件下孵育。在该稳定性研究中评估的四种制剂(F1-F4)描述于下表8-1中。

[0450] 表8-1.制剂F1-F4

[0451]

制剂编号	组成					
	VEGFT(mg/ml)	组氨酸 (mM)	蔗糖(w/v)	聚山梨醇 20	L-精氨酸	pH
F1	140	20	5	0.03	0	5.8
F2					10	
F3					50	
F4					100	

[0452] 解冻187mg/mL VEGF Trap组氨酸制剂的约145mL。除F3外,混合每种制剂三十六(36)mL;混合39mL的F3块。每种制剂均使用0.22□m Durapore PVDF灭菌过滤器在LFH(层流罩)中进行过滤灭菌,然后填充。使用干净的去热原的2mL I型Schott玻璃小瓶,其塞有13mm血清瓶塞(S2-F451 4432/50B2-40),以进行稳定性研究。

[0453] 如上所述进行制剂的SE-UPLC分析。在每种制剂中随时间的使用SE-UPLC%的HMW测量值在图8(A-B)中列出。也参见表8-2和8-3。

[0454] 当储存在5℃时,这些制剂的%HMW种类形成速率降低,其与盐酸精氨酸的浓度成比例。然而,在应力下,这种作用被逆转。该制剂在37℃下显示出与盐酸精氨酸浓度成比例的%HMW种类明显增加。该性质使得在组氨酸缓冲液存在下发现精氨酸对阿帕西普的有益作用高度不可能。通常,对于生物技术工业中的制剂开发,首先要在短时间内在应力下(例如,在高温,例如37℃下)筛选各种赋形剂对药物的作用。这种方法的目的是快速消除在较长时间无应力(例如在较低温度,如5℃)下可能不会表现良好的赋形剂。尽管精氨酸对37℃

的稳定性有影响，但仍被认为是有用的赋形剂。由于配制的药品通常在生产后在4-5℃下保存数月，因此在精氨酸和组氨酸缓冲液中的阿帕西普对于长期稳定地保存药品将是非常有价值的制剂。

[0455] 表8-2.SE-UPLC分析(2-8℃)

[0456]

	F1(EEE)		F2(SSS)	
2-8℃下月数	%主峰	%HMW	%主峰	%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

[0457]

F3(CCC)		F4(TTT)	
%主峰	%HMW	%主峰	%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

[0458] 表8-3.SE-UPLC分析(37℃)

	F1(EEE)		F2(SSS)	
在37℃下的天数	%主峰	%HMW	%主峰	%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

[0459]

F3(CCC)		F4(TTT)	
%主峰	%HMW	%主峰	%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

[0460] 实施例9:在来自Hofmeister系列和其他赋形剂的抗衡离子存在下的VEGF Trap稳定性。

[0461] 确定了各种抗衡离子和其他赋形剂对几种制剂稳定性的影响。

[0462] A.抗衡离子筛选

[0463] 以具有高浓度VEGF Trap(阿帕西普)制剂(140mg/ml)的钠盐形式测试了抗衡离子(例如硫酸根、硫氰酸根和柠檬酸根)。另外,还测试了其他氨基添加赋形剂(例如,甘氨酸和赖氨酸)。

[0464] 解冻187mg/ml VEGF Trap眼用药的约42ml。制备50ml的中间配制的药物物质(155.56mg/ml),其具有140mg/ml的配制药物物质的110%浓度和目标赋形剂浓度(不包括抗衡离子、甘氨酸和赖氨酸)。

[0465] 用0.5M的赋形剂储备溶液(抗衡离子、甘氨酸或赖氨酸)进一步稀释中间配制的药物物质,以生产出下表9-1中所列的140mg/ml的配制的药物物质制剂。将每种最终制剂在层流罩中用0.22□m PVDF注射器过滤器灭菌,然后装入干净的去热原的2mL I型Schott玻璃瓶中,该瓶用13mm血清塞S2-F451

[0466] 4432/50 82-40(ELN物品编号19700004冲洗编号0 000078949)塞住。六十(60)个小瓶装有0.5ml的每种制剂。六(6)小瓶装有1.5ml。

[0467] 表9-1.用于抗衡离子筛选的制剂

[0468]

赋形剂(mM)	制剂	VEGF Trap 浓度
硫酸钠 50mM	20mM 组氨酸/0.03%PS20/5% 蔗糖/50mM 硫酸钠	140
硫氰酸钠 50mM	20mM 组氨酸/0.03%PS20/5% 蔗糖/50mM 硫氰酸钠	140
柠檬酸钠 50mM	20mM 组氨酸/0.03%PS20/5% 蔗糖/50mM 柠檬酸钠	140
甘氨酸 50mM	20mM 组氨酸/0.03%PS20/5% 蔗糖/50mM 甘氨酸	140
氯化钠 50mM	20mM 组氨酸/0.03%PS20/5% 蔗糖/50mM 氯化钠	140
赖氨酸 50mM	20mM 组氨酸/0.03%PS20/5% 蔗糖/50mM 赖氨酸	140

[0469] B.谷氨酸和天冬氨酸筛选

[0470] 测试了在有机抗衡离子与盐酸精氨酸结合存在下VEGF Trap(阿帕西普)高浓度制剂(140mg/ml)的稳定性。此外,还测试了两种新的抗衡离子(谷氨酸和天冬氨酸)与高浓度VEGF Trap(结合使用和不使用盐酸精氨酸)的相容性。下面表9-2总结了测试的制剂。

[0471] 解冻187mg/ml的VEGF Trap药物的约50ml。制备60ml的中间配制的药物物质(155.56mg/ml),其具有140mg/ml的配制药物物质的110%和目标赋形剂浓度(不包括抗衡离子、柠檬酸、甘氨酸、谷氨酸和天冬氨酸)。中间配制的药物物质进一步用1M赋形剂储备溶液(盐酸精氨酸、柠檬酸钠、甘氨酸、谷氨酸钠和天冬氨酸钠)稀释,以产生下表所列的140mg/ml的配制的药物物质制剂。将每种最终制剂在层流罩中用0.22□m PVDF注射器过滤器灭菌,然后装入干净的去热原的2mL I型Schott玻璃瓶中,该瓶用13mm血清塞S2-F451 4432/50B2-40(ELN物品编号19700004冲洗编号0000078949)塞住。六十(60)个小瓶装有0.5ml的每种制剂。六(6)小瓶装有1.5ml。

[0472] 表9-2.用于谷氨酸和天冬氨酸筛选的制剂

[0473]

赋形剂(mM)	制剂	VEGF Trap 浓度
柠檬酸钠 50mM+盐酸精氨酸 50mM	20mM 组氨酸 /0.03%PS20/5%蔗糖 /50mM 柠檬酸钠/50mM 盐酸精氨酸	140
甘氨酸 50mM+盐酸精氨酸 50mM	20mM 组氨酸 /0.03%PS20/5%蔗糖 /50mM 甘氨酸/50mM 盐酸精氨酸	140

[0474]

天冬氨酸钠 50mM+盐酸精氨酸 50mM	20mM 组氨酸 /0.03%PS20/5%蔗糖 /50mM 天冬氨酸钠 /50mM 盐酸精氨酸	140
谷氨酸钠 50mM+盐酸精氨酸 50mM	20mM 组氨酸 /0.03%PS20/5%蔗糖 /50mM 谷氨酸钠/50mM 盐酸精氨酸	140
天冬氨酸钠 50mM	20mM 组氨酸 /0.03%PS20/5%蔗糖 /50mM 天冬氨酸钠	140
天冬氨酸钠 50mM	20mM 组氨酸 /0.03%PS20/5%蔗糖 /50mM 天冬氨酸钠	140

[0475] 使用RHEOSENSE m-VROC®粘度计进行粘度测试。将大约0.5mL未稀释的样品上样到玻璃注射器上。将样品平衡至所需温度，然后注入芯片或测量池中。通过测量从入口到出口的压降来计算粘度，该压降与芯片壁上的切应力相关。结果表示为mPas-1或cp。参见图9和表9-3。

[0476] 重量克分子渗透浓度测试是使用VAPRO蒸气压渗透计进行的。将大约10μL的未稀释样品接种到纸盘中。露点温度下降是溶液蒸气压的函数，通过灵敏的热电偶进行测量并报告为溶液的重量克分子渗透浓度。结果表示为mmol/kg或mOsm。参见图10和表9-3。

[0477] 也通过SE-UPLC评价在37℃或5℃下存储之后在某些制剂中随时间的高分子量种类。参见图11(A-B)以及表9-4和9-5。

[0478] 动态光散射实验是使用DynaPro®Plate Reader II进行的。将大约100μL的未稀释样品上样至96孔板上。在25℃下,每孔进行了35次采集。在DYNAMICS v7.1软件上执行使用正则化的自相关函数分析。生成了半径(nm)与%强度图以及%质量与半径(nm)图,以得出每个样品的平均分子半径和%多分散性值(%Pd)。参见图12。

[0479] 表9-3.各种制剂的粘度和重量克分子渗透浓度

测试参数	50mM 硫酸钠(GGG)	50mM 硫氰酸钠(HHH)	40mM 柠檬酸钠(III)	50mM 甘氨酸(JJJ)	50mM 氯化钠(KKK)	50mM 赖氨酸(LLL)
粘度(cp)	11.9	12.4	14.8	12.2	11.6	11.8
重量克分子渗透浓度(mOsmol/Kg)	384	324	403	299	349	349

[0480]

50mM 天冬氨酸钠(MMM)	50mM 谷氨酸钠(NNN)	50mM 柠檬酸钠+50mM 精氨酸 HCl(OOO)	50mM 甘氨酸+50mM 精氨酸 HCl(PPP)	50mM 天冬氨酸钠+50mM 精氨酸 HCl(QQQ)	50mM 谷氨酸钠+50mM 精氨酸 HCl(RRR)
13.0	13.1	14.8	12.5	13.1	13.3
343	346	506	369	426	430

[0481] 表9-4.SE-UPLC分析;%HMW(37℃)

[0482]

%HMW(在37C下的天数)	50mM 硫酸钠(GGG)	50mM 硫氰酸钠(HHH)	40mM 柠檬酸钠(III)	50mM 甘氨酸(JJJ)	50mM 氯化钠(KKK)	50mM 赖氨酸(LLL)
0	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.2

[0483]

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

[0484] 表9-5.SE-UPLC分析;%HMW(5℃)

[0485]

%HMW (5℃下月数)	50mM 硫酸钠 (GGG)	50mM 硫氰酸钠 (HHH)	40mM 柠檬酸钠(III)	50mM 甘氨酸(JJJ)	50mM 氯化钠 (KKK)	50mM 赖氨酸 (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

[0486] 实施例10:在正常兔子中IVT递送大剂量VEGF阱(140mg/ml)的耐受性。

[0487] 通过玻璃体内注射施用的抗VEGF疗法目前是用于治疗新血管性年龄相关性黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿和视网膜血管闭塞性疾病的护理标准。然而,每月或每两个月玻璃体内注射给患者、护理人员和医生带来了巨大的治疗负担。在临床实践中迫切需要更有效和持久的疗法。这项研究旨在调查稳定配制的高剂量VEGF Trap(140mg/ml,相当于临床剂量的14倍)在正常新西兰白兔眼中的耐受性。

[0488] 测试了在组氨酸缓冲液或磷酸盐缓冲液中的高剂量VEGF-Trap(阿帕西普)的两种制剂。每组三只兔子通过每种制剂的单次双侧玻璃体内注射接受50mg/L的7mg VEGF Trap。在玻璃体内施用后第1天、第4天、第1周,然后每周一次直到12周,通过裂隙灯、光学相干断层扫描(OCT)和眼底血管造影术监测眼部炎症迹象。在玻璃体内注射之前、之后10分钟和30分钟,然后在每个随访时间点,用Tonopen测量眼压。在第12周对动物实施安乐死。

[0489] 对兔子的眼睛给予以下任一种:

[0490] (1)140mg/ml阿帕西普,20mM组氨酸,5%蔗糖,50mM精氨酸HCl,0.03%PS20,pH 5.8;

[0491] 或

[0492] (2)140mg/ml阿帕西普,10mM磷酸钠,5%蔗糖,40mM氯化钠,0.03%PS20,pH 6.2。

[0493] 组氨酸缓冲液组的六只眼中有两只在直到IVT后8周时玻璃体上有暗影,这通过裂隙灯检查证实是由于与手术相关的晶状体后部损伤引起的局部白内障。磷酸盐缓冲液组的六只眼中有一只在直到IVT后8周时玻璃体上有暗影,这通过裂隙灯检查证实是由于(与手术相关的)晶状体后部损伤引起的局部白内障。

[0494] 单次玻璃体内施用后12周内,在正常的新西兰白兔眼中,所测试的高剂量VEGF Trap(140mg/ml)制剂具有良好的耐受性。单次玻璃体内注射7mg VEGF Trap后,眼底未见异常或炎症迹象。玻璃体清晰,视网膜血管形态正常。未见视网膜脱离、出血或视神经头改变。与基线相比,眼内压没有变化。兔眼的基线荧光素血管造影(FA)和OCT图像如图13(A-D)所示。图14、15、16和17显示了每个治疗组在8周内的兔眼随时间变化的FA和OCT图像。显示了来自兔子326和329的左眼(OS)或右眼(OD)的数据。

[0495] 实施例11:评价制剂UUU-BBBB的稳定性

[0496] 这项研究检查了在10mM磷酸盐、10％或20％蔗糖(Suc.)、0或50mM NaCl、0.03％聚山梨酯20，pH 6.2中60mg/ml和120mg/ml VEGF Trap(阿帕西普)在37℃下孵育达6个月时的稳定性。下表11-1列出了用于该稳定性研究的制剂。

[0497] 表11-1.制剂UUU-BBBB

[0498]

制剂名称	[VEGF Trap] mg/mL	蔗糖%	mM NaCl
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

[0499] 基本制剂:10mM磷酸盐，0.03％聚山梨酯20，pH 6.2VEGF Trap＝阿帕西普

[0500] 在分配之前，将制剂在层流罩中用PVDF 0.2μm过滤器进行过滤灭菌。

[0501] 将含有每种制剂的小瓶贮存在37℃下1个月。

[0502] 表11-2.反相高效液相色谱(RP-HPLC)结果

[0503]

制剂	储存条件	实际孵育(月)	% 回收的 VEGFT	[VGFT] mg/ml
30 mg/mL 10%蔗糖(UUU)	37℃	0.0	100.0	29.99
		1.0	97.9	29.37
30 mg/mL 20%蔗糖(VVV)	37℃	0.0	100.0	29.97
		1.0	98.2	29.44
60 mg/mL 10%蔗糖(WWW)	37℃	0.0	100.0	58.90
		1.0	98.3	57.89
60 mg/mL	37℃	0.0	100.0	58.80

[0504]

20%蔗糖(XXX)		1.0	98.9	58.18
120 mg/mL 10%蔗糖(YYY)	37℃	0.0	100.0	120.80
		1.0	97.4	117.63
120 mg/mL 20%蔗糖(ZZZ)	37℃	0.0	100.0	117.85
		1.0	98.9	116.51
120 mg/mL 10%蔗糖 50 mM NaCl (AAAA)	37℃	0.0	100.0	120.14
		1.0	97.9	117.64
120 mg/mL 20%蔗糖 50 mM NaCl (BBBB)	37℃	0.0	100.0	120.55
		1.0	97.0	116.94

[0505] VGFT＝VEGF Trap,阿帕西普

[0506] 表11-3.尺寸排阻超高效液相色谱(SE-UPLC)结果

[0507]

制剂	储存条件	实际孵育(月)	总计 % HMW	%原始物(Native)	总计 % LMW
30 mg/mL VGFT 10%蔗糖(UUU)	37℃	0	0.8	99.0	0.1
		1.0	4.1	94.0	1.9
30 mg/mL VGFT 20%蔗糖(VVV)	37℃	0	0.8	99.0	0.2
		1.0	2.4	95.6	2.0
60 mg/mL VGFT 10%蔗糖(WWW)	37℃	0	1.0	98.8	0.2
		1.0	7.8	89.5	2.7
60 mg/mL VGFT 20%蔗糖(XXX)	37℃	0	1.0	98.8	0.2
		1.0	4.4	92.8	2.7
120 mg/mL VGFT 10%蔗糖(YYY)	37℃	0	1.3	98.5	0.2
		1.0	18.3	79.5	2.2
120 mg/mL VGFT 20%蔗糖(ZZZ)	37℃	0	1.2	98.5	0.2
		1.0	10.7	87.1	2.2
120 mg/mL VGFT 10%蔗糖 50 mM NaCl (AAAA)	37℃	0	1.3	98.5	0.2
		1.0	20.8	77.1	2.2
120 mg/mL VGFT 20%蔗糖 50 mM NaCl (BBBB)	37℃	0	1.2	98.5	0.3
		1.0	13.0	84.8	2.2

[0508] VGFT＝VEGF Trap,阿帕西普

[0509] 通过目测和光密度测量,所有制剂基本不含颗粒。在37℃1个月后,RP-HPLC回收蛋白无明显损失(表11-2),这种趋势持续了6个月。

[0510] VEGF Trap的主要降解途径是在这些条件下聚集(图18(A-B);表11-3)。VEGF Trap的稳定性取决于蛋白质和蔗糖浓度。较低的VEGF Trap浓度和较高的蔗糖的制剂更稳定。维持相同的蛋白质:蔗糖比例不会导致相同的降解率。例如,F1和F4具有相同的蛋白质:蔗糖比3:1,但由于F4的蛋白质浓度较高,因此稳定性不如F1。观察到6个月的趋势相似。

[0511] 实施例12:用不同阿帕西普制剂在猴子中的重复剂量玻璃体内毒理学研究。

[0512] 在该实施例中评估了食蟹猴中各种制剂的安全性。对第1-3组,大约Q4W总共向两只眼睛施用7剂玻璃体内剂量;对第4-9组,大约Q4W总共向两只眼睛施用3剂眼玻璃体内剂

量。最后一次给药后大约一周(N＝3/性别/组)进行终末剖检,最后一次给药后大约12周进行回收性剖检(2/性别/组)。

[0513] 执行以下评估:

[0514] • 基于临床体征、体重、生命体征、心电图数据(治疗的给药前结束和回收结束)、血压测量(通过尾巴套管)、临床和解剖病理学进行安全性评估

[0515] • 在给药和恢复期间定期进行全面的眼科检查,包括裂隙灯显微镜、间接检眼镜和眼压测量

[0516] • 治疗前、研究第9周(所有组)、第26周(仅第1-3组)和恢复期结束时的眼底照相、荧光素血管造影和视网膜电图检查

[0517] • 血液和玻璃样(终止时)用于生物分析、ADA分析和毒物动力学评估

[0518] 表13.研究组汇总*

[0519]

组	测试材料	IVT剂量体积(μL/剂量/眼)	mg阿帕西普/眼	N/性别	尸体剖检的N/性别	恢复的N/性别

[0520]

1	20 mM 组氨酸，**50 mM 精氨酸**，5%蔗糖，0.03%PS20	50	0(对照)	5	3	2
2	在 20 mM 组氨酸、**50mM 精氨酸**、5%蔗糖、0.03%PS20 中的 **80 mg/mL 阿帕西普**	50	4	5	3	2
3	在 20 mM 组氨酸、**50mM 精氨酸**、5%蔗糖、0.03%PS20 中的约 **140 mg/mL 阿帕西普**	50	~7	5	3	2
4	20 mM 组氨酸，5%蔗糖，0.03%PS20	50	0(对照)	5	3	2
5	在 20 mM 组氨酸、5%蔗糖、0.03%PS20 中的 **80 mg/mL 阿帕西普**	50	4	5	3	2
6	在 20 mM 组氨酸、5%蔗糖、0.03%PS20 中的**约 140 mg/mL 阿帕西普**	50	~7	5	3	2
7	20 mM 组氨酸，**50 mM 甘氨酸**，5%蔗糖，0.03%PS20	50	0(对照)	5	3	2
8	在 20 mM 组氨酸、**50 mM 甘氨酸**、5%蔗糖、0.03%PS20 中的 **80 mg/mL 阿帕西普**	50	4	5	3	2
9	在 20 mM 组氨酸、**50 mM 甘氨酸**、5%蔗糖、0.03%PS20 中的**约 140 mg/mL 阿帕西普**	50	~7	5	3	2

[0521] *每种所述制剂都是本发明的一部分

[0522] 预期在第1组、第2组、第3组、第4组、第5组、第6组、第7组、第8组和/或第9组中的任何一个或多个中测试的制剂在食蟹猴中的安全性概况可与EYLEA相当，如以上讨论的评估中测定的。

[0523] 实施例13：使用VEGF阱产品的稳定性研究。

[0524] 在填充前，使用0.22μm Durapore PVDF灭菌过滤器在LFH(层流罩)中制备包含114.3mg/mL VEGF Trap(阿帕西普)和10mM组氨酸，pH 5.8、5％蔗糖、0.03％聚山梨酯20、50mM一盐酸精氨酸的制剂。将干净的去热原的3mL I型Schott玻璃小瓶装满0.3mL药品，并用13mm血清瓶塞(S2-F451 4432/50B2-40)塞住。在37℃或5℃下储存后，通过尺寸排阻色谱(SEC)在不同时间点分析样品的纯度，以确定高分子量种类(HMW)、低分子量种类(LMW)和主要峰(主峰)的存在(％)；以及通过微流成像、HIAC液体颗粒计数(通过光线遮挡)和显微镜

下确定各种尺寸颗粒的存在。

[0525] 图19(A-E)显示了在37℃、25℃和2-8℃储存后的稳定性和纯度数据。也参见表13-1-13-4。

[0526] 表13-1.尺寸排阻色谱(SEC)纯度分析

[0527]

37°C			
月数	%主峰	%HMW	%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			

[0528]

月数	%主峰	%HMW	%LMW
0	98.23	1.77	0
1	97.73	2.27	0
2	97.4	2.59	0

[0529] 表13-2:微流成像/在显微镜下才可见的颗粒

[0530]

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

[0531] 表13-3.通过光遮蔽(HIAC)测量的在显微镜下才可见的颗粒物质/在显微镜下才可见的颗粒

[0532]

37°C			
月数	≥10μm	≥25μm	≥50μm
T=0	15	0	0
28 天	23	1	1

[0533] 表13-4.在显微镜下才可见的颗粒的微观分析

[0534]

37°C			
月数	≥10μm	≥25μm	≥50μm
T=0	8	1	1
28 天	6	2	1

[0535] 实施例14:具有变化的VEGF阱浓度的稳定性研究。

[0536] 研究了不同浓度的VEGF Trap对四种VEGF Trap(阿帕西普)眼用药物制剂稳定性的影响。浓度范围为80至140mg/mL。在2-8℃的储存条件下进行稳定性评估。药物(DP)也在应力(37℃)条件下孵育。在该稳定性研究中评估的四种制剂(在本文中每种均称为“CCC”)描述于下表14-1中。

[0537] 在填充之前,使用0.22μm Durapore PVDF灭菌过滤器在LFH(层流罩)内制备约27mL每种制剂。填充干净的去热原的2mL I型Schott玻璃小瓶,并用13mm血清瓶塞(S2-F451 4432/50B2-40)塞住。在37℃或2-8℃下储存后,通过尺寸排阻超高效液相色谱(SE-UPLC)在不同时间点分析样品的纯度,以确定高分子量种类(HMW)和主要峰(主峰)的存在(%)。

[0538] 图20(A-B)中列出了显示在2-8℃或37℃孵育6个月后HMW百分比的数据。也见表14-2和14-3。当在37℃和5℃下存储时,这些制剂显示出HMW形成速率与VEGF Trap的浓度的正相关。140mg/mL制剂显示出%HMW种类形成的最高速率。

[0539] 表14-1.测试的制剂。

[0540]

制剂编号	组成					
	L-精氨酸 mM	组氨酸(mM)	蔗糖 (w/v)	聚山梨酯 20(w/v)	VEGFT (mg/mL)	pH
F1(CCC)	50	20	5	0.03	80	5.8
F2(CCC)					100	
F3(CCC)					120	
F4(CCC)					140	

[0541] 表14-2.SE-UPLC分析(2-8℃)

[0542]

	F1 (CCC): 80 mg/mL		F2 (CCC): 100 mg/mL		F4 (CCC): 120 mg/mL		F3 (CCC): 140 mg/mL	
2-8℃下月数	%主峰	%HMW	%主峰	%HMW	%主峰	%HMW	%主峰	%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

[0543] 表14-3.SE-UPLC分析(37℃)

[0544]

	F1 (CCC): 80 mg/mL		F2 (CCC): 100 mg/mL		F4 (CCC): 120 mg/mL		F3 (CCC): 140 mg/mL	
在37C的天数	%主峰	%HMW	%主峰	%HMW	%主峰	%HMW	%主峰	%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

[0545]

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

[0546] 实施例15:在持续的新血管渗漏的D,L-AAA模型中,高剂量的Eylea具有延长的作用持续时间。

[0547] 在该实施例中,确定剂量增加四倍对阿帕西普在D,L-AAA模型中抑制慢性视网膜血管渗漏的作用持续时间的影响。

[0548] 使用的动物是DL-AAA(DL-α-氨基己二酸)疾病诱导后3个月的新西兰白兔。治疗组为:

[0549] • 安慰剂(制剂缓冲液)50mcl/眼;n=6眼

[0550] • 阿帕西普500mcg/眼(在50mcl中);n=7眼

[0551] • 阿帕西普2mcg/眼(在50mcl中);n=8眼

[0552] 每个治疗组中使用的制剂为:10mM组氨酸,8%蔗糖,0.03%PS20,pH 5.8。在基线以及第1、2、4、6、7、9、10、11、13和18周时进行的眼科检查是眼内压(IOP)、无红光(RF)成像(以确定血管形态)、荧光素血管造影(FA;以确定血管渗漏)、光学相干断层扫描(OCT;以确定玻璃体炎症)。在基线以及第1、2、4、6和9周收集血清(ADA)和血浆(药物水平)。

[0553] 每个组的FA检查数据如图21所示。这些数据表明,接受较高剂量的阿帕西普的动物视网膜的血管渗漏抑制作用持续时间比接受较低剂量的动物的更长。在给药后直至18周的所有采样时间,在2mg剂量组中,完全抑制了血管通透性的治疗眼数显著增加。

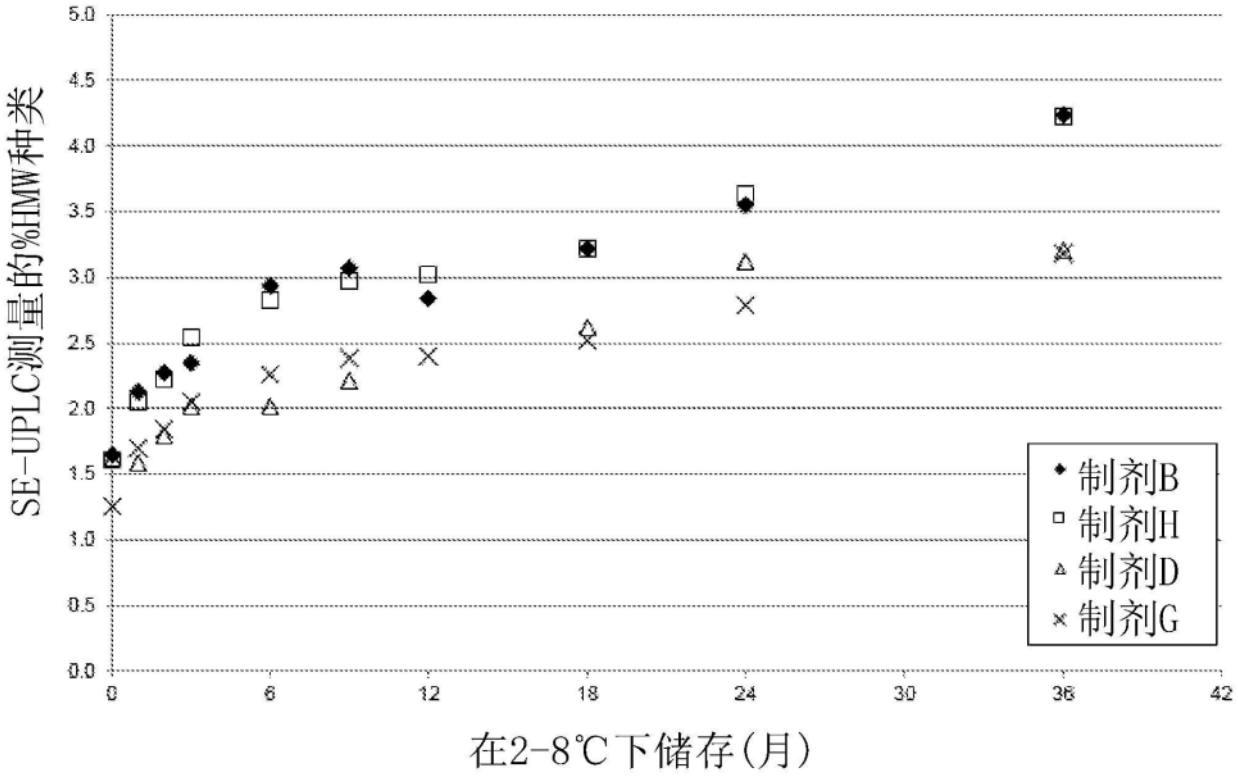

SE-UPLC测量的%HMW种类
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
6
12
18
24
30
36
42
制剂B
制剂H
制剂D
制剂G
在2-8℃下储存(月)

图1A

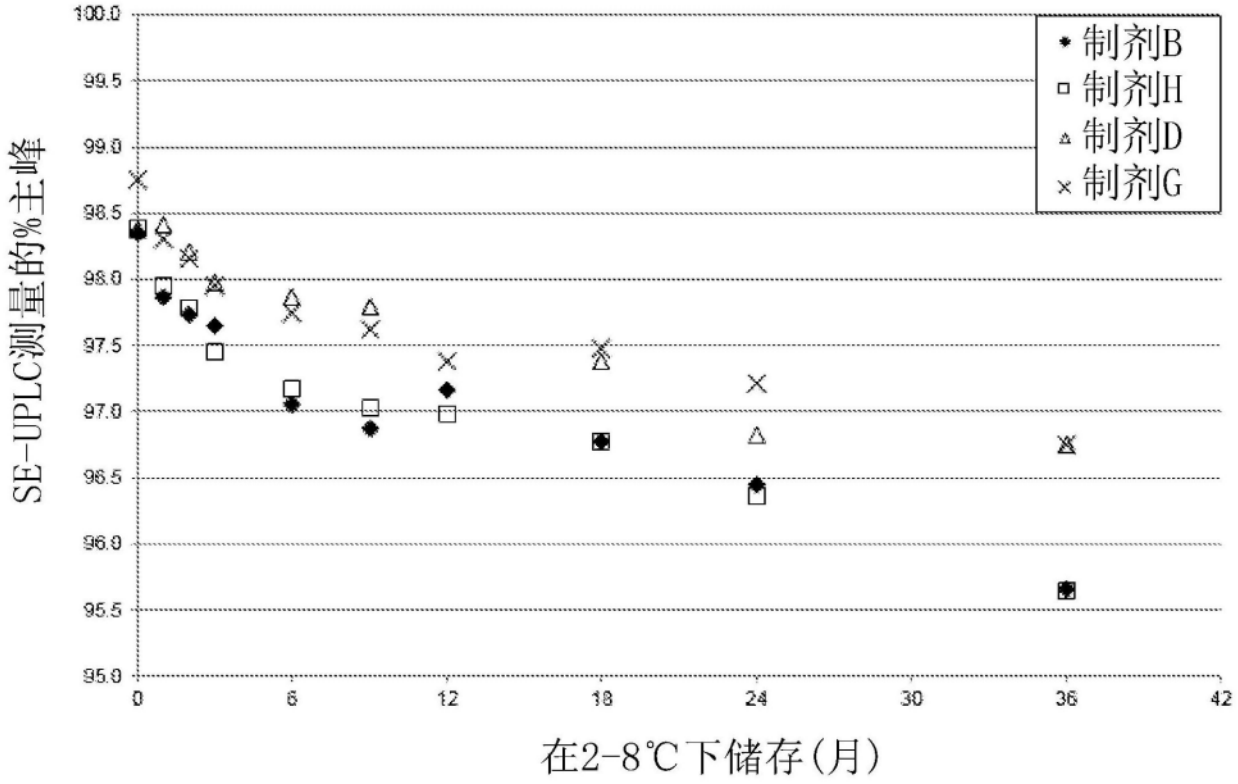

SE-UPLC测量的%主峰
100.0
99.5
99.0
98.5
98.0
97.5
97.0
96.5
96.0
95.5
95.0
0
6
12
18
24
30
36
42
制剂B
制剂H
制剂D
制剂G
在2-8℃下储存(月)

图1B

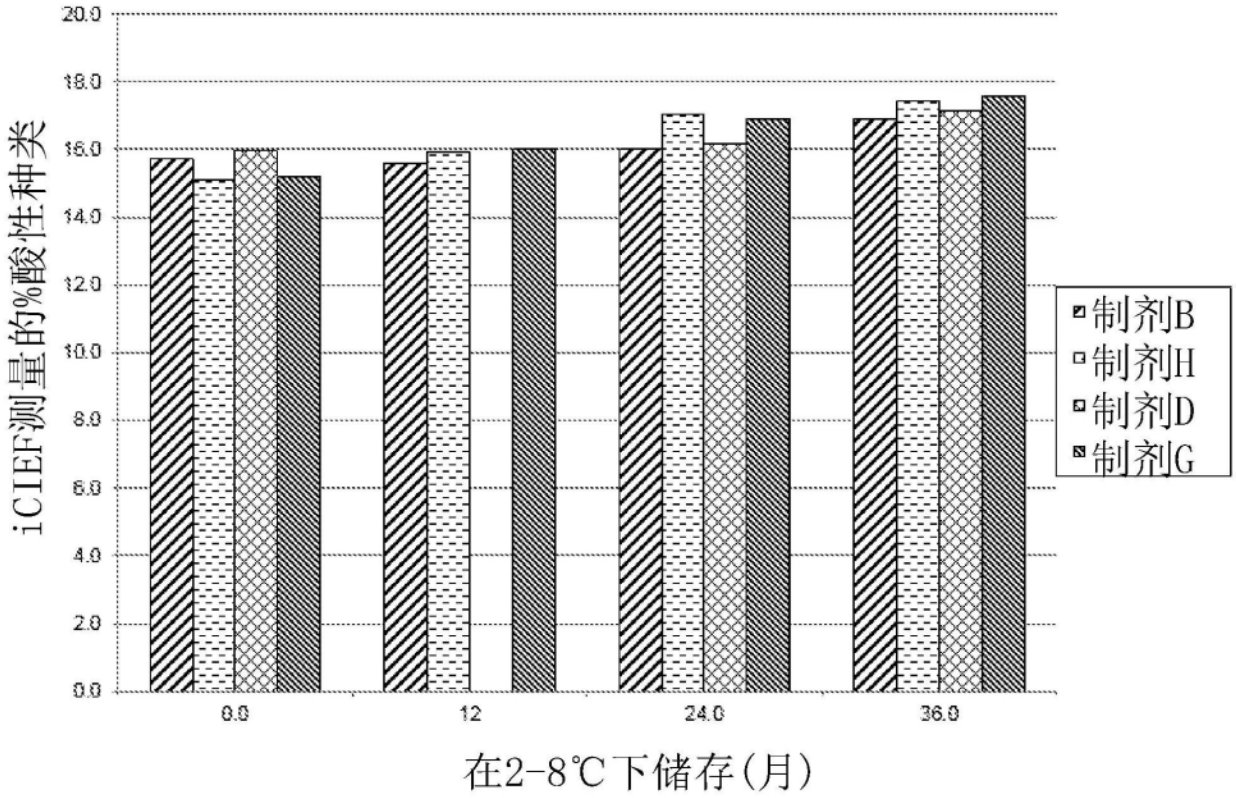

20.0
18.0
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
iCIEF测量的%酸性种类
0.0
12
24.0
36.0
在2-8℃下储存(月)
制剂B
制剂H
制剂D
制剂G

图1C

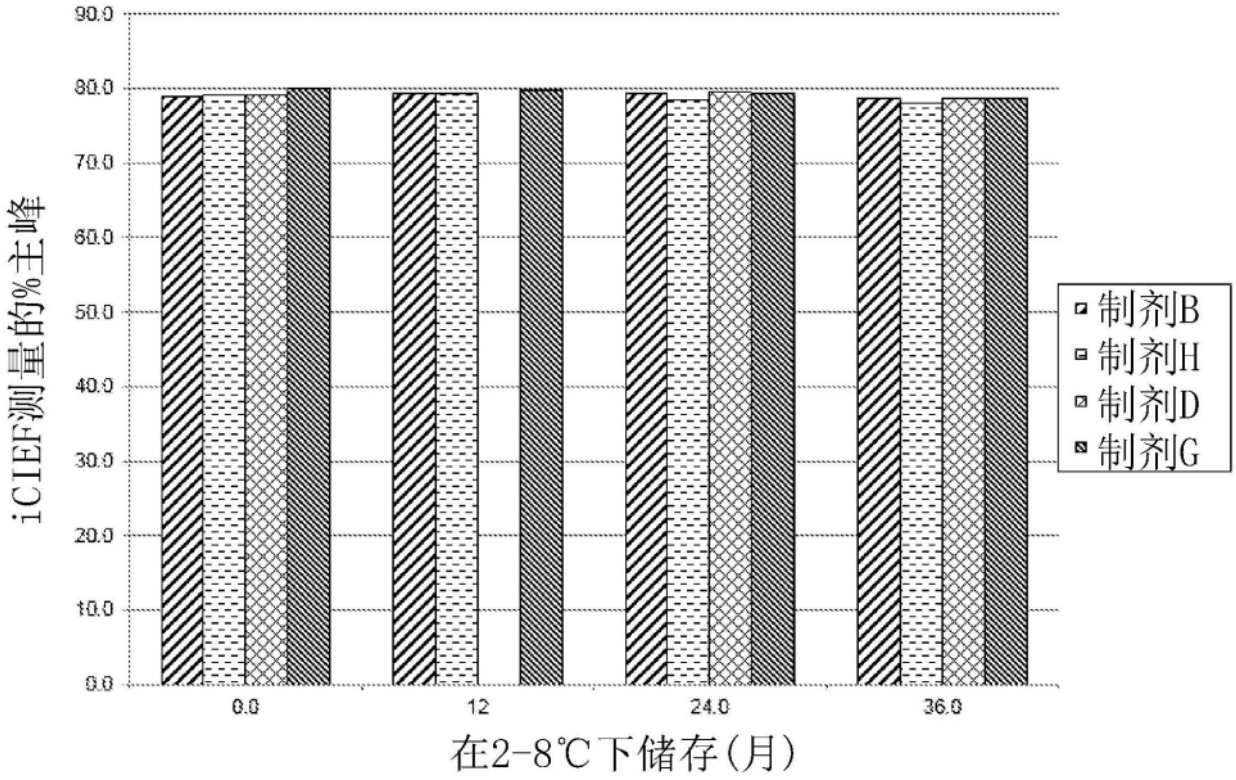

90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
iCIEF测量的%主峰
0.0
12
24.0
36.0
在2-8℃下储存(月)
制剂B
制剂H
制剂D
制剂G

图1D

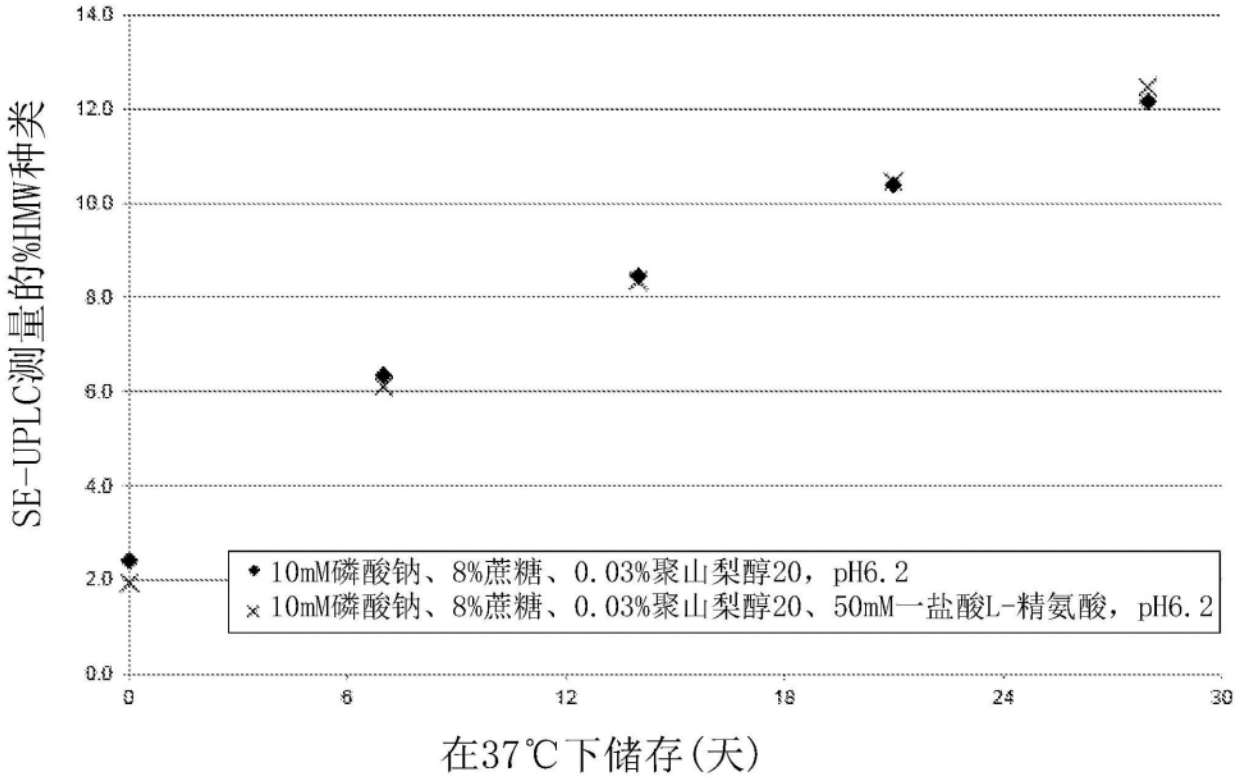

SE-UPLC测量的%HMW种类
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
0
6
12
18
24
30
10mM磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨醇20，pH6.2
10mM磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨醇20、50mM一盐酸L-精氨酸，pH6.2
在37℃下储存(天)

图2A

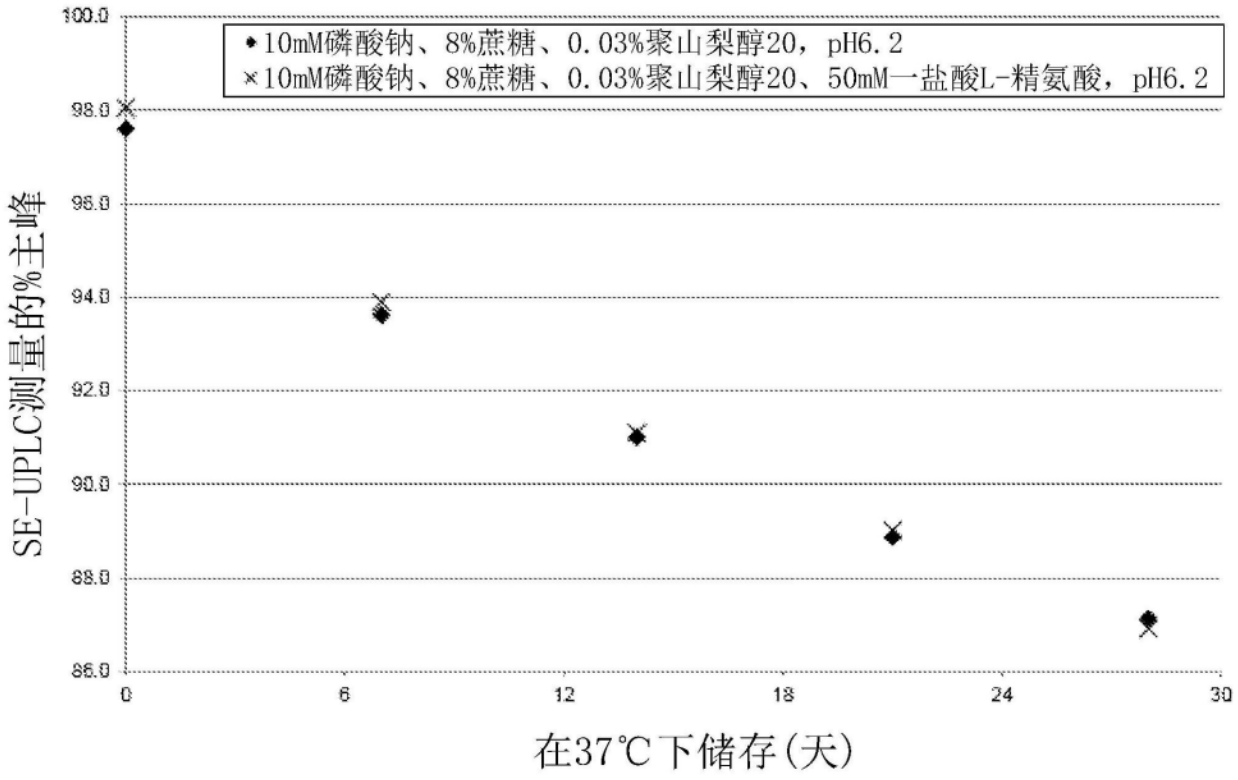

SE-UPLC测量的%主峰
100.0
98.0
96.0
94.0
92.0
90.0
88.0
86.0
0
6
12
18
24
30
10mM磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨醇20，pH6.2
10mM磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨醇20、50mM一盐酸L-精氨酸，pH6.2
在37℃下储存(天)

图2B

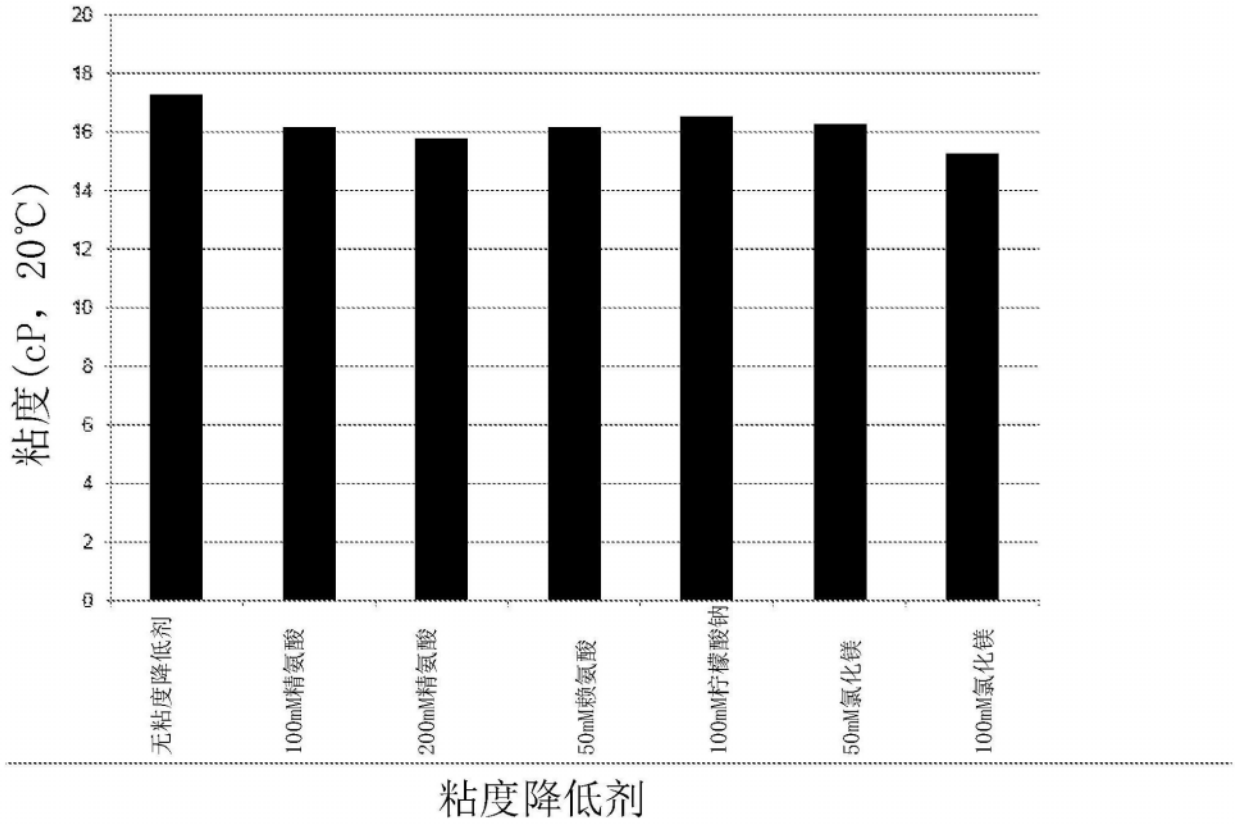

粘度(cP，20℃)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
无粘度降低剂
100mM精氨酸
200mM精氨酸
50mM赖氨酸
100mM柠檬酸钠
50mM氯化镁
100mM氯化镁
粘度降低剂

图3A

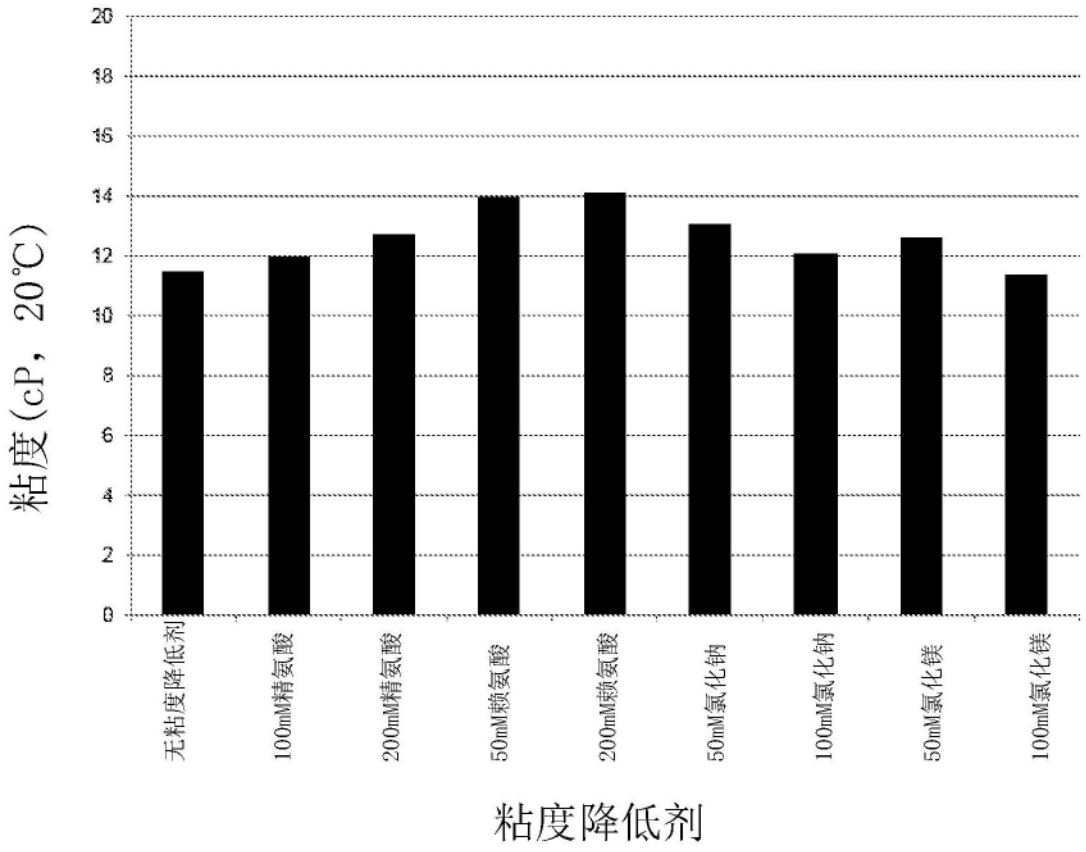

粘度(cP，20℃)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
无粘度降低剂
100mM精氨酸
200mM精氨酸
50mM赖氨酸
200mM赖氨酸
50mM氯化钠
100mM氯化钠
50mM氯化镁
100mM氯化镁
粘度降低剂

图3B

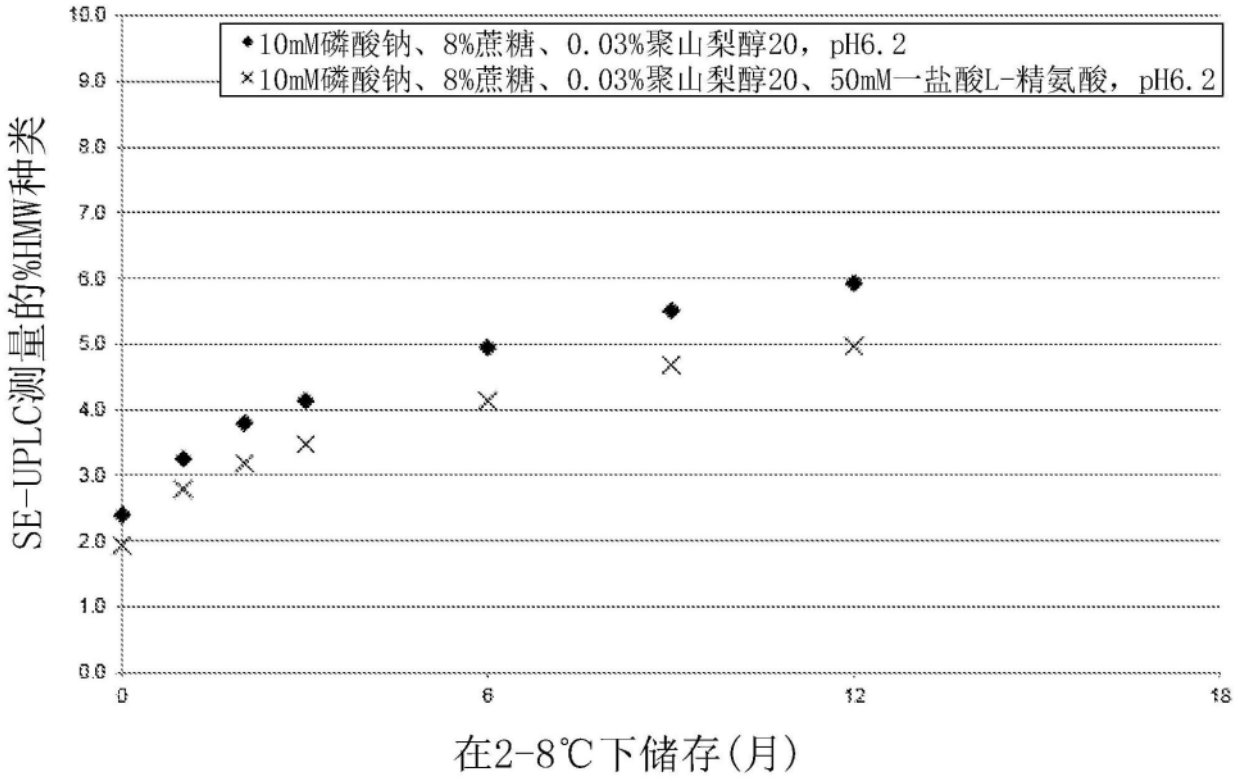

◆10mM磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨醇20，pH6.2
×10mM磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨醇20、50mM一盐酸L-精氨酸，pH6.2
SE-UPLC测量的%HMW种类
10.0
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
6
12
18
在2-8℃下储存(月)

图4A

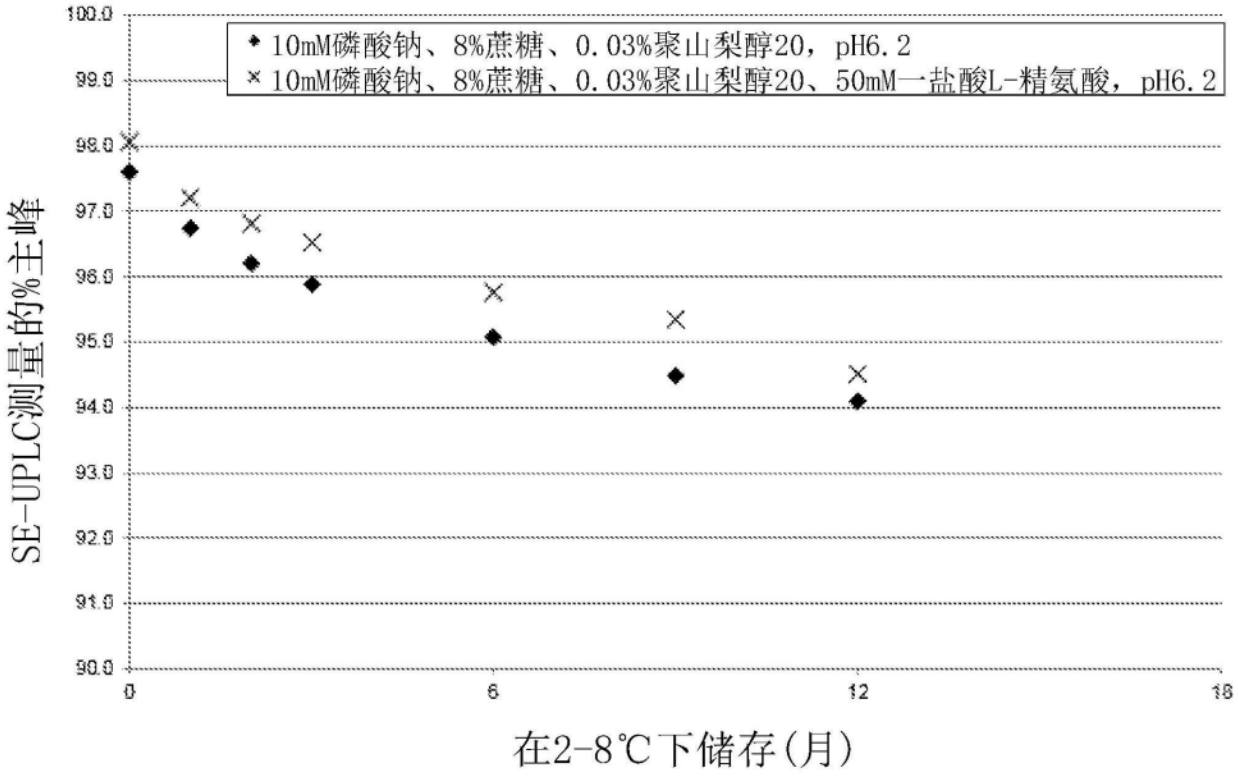

◆10mM磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨醇20，pH6.2
×10mM磷酸钠、8%蔗糖、0.03%聚山梨醇20、50mM一盐酸L-精氨酸，pH6.2
SE-UPLC测量的%主峰
100.0
99.0
98.0
97.0
96.0
95.0
94.0
93.0
92.0
91.0
90.0
0
6
12
18
在2-8℃下储存(月)

图4B

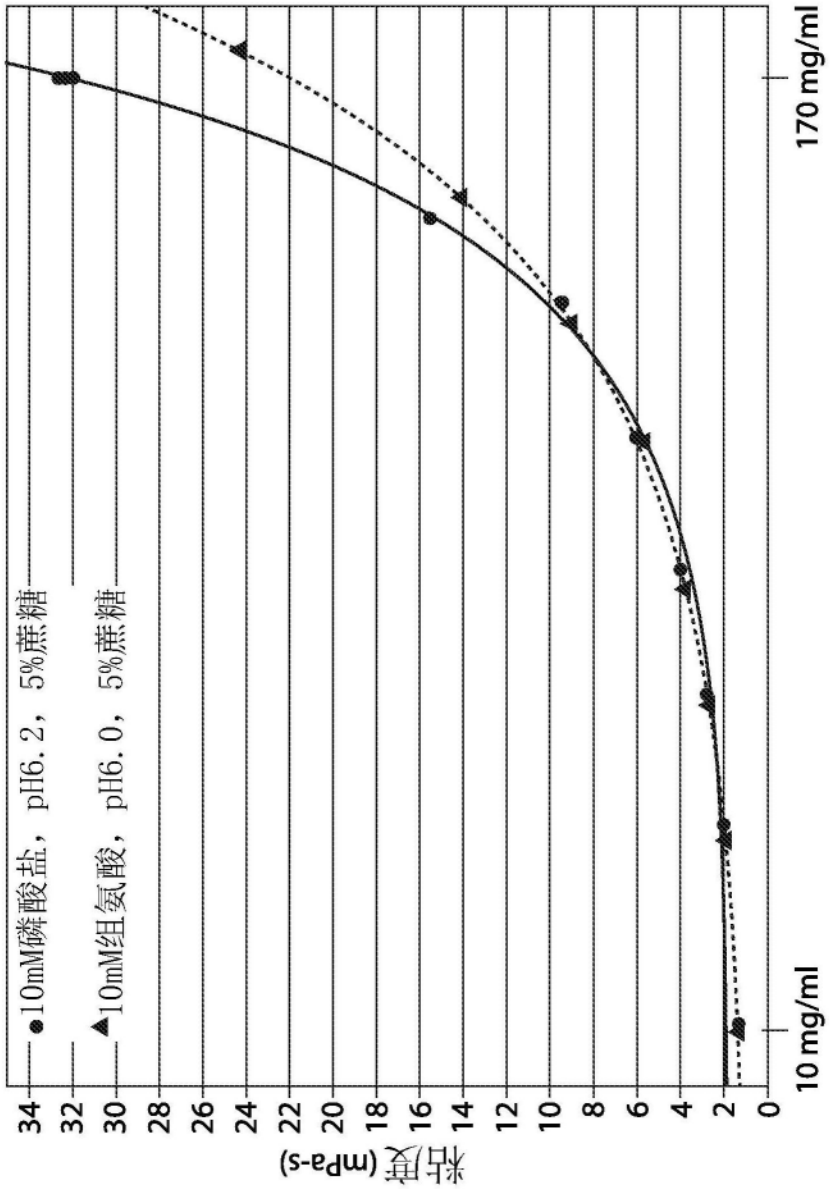

粘度 (mPa-s)
34
32
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
170 mg/ml
10 mg/ml
●10mM磷酸盐，pH6.2，5%蔗糖
▲10mM组氨酸，pH6.0，5%蔗糖

图5

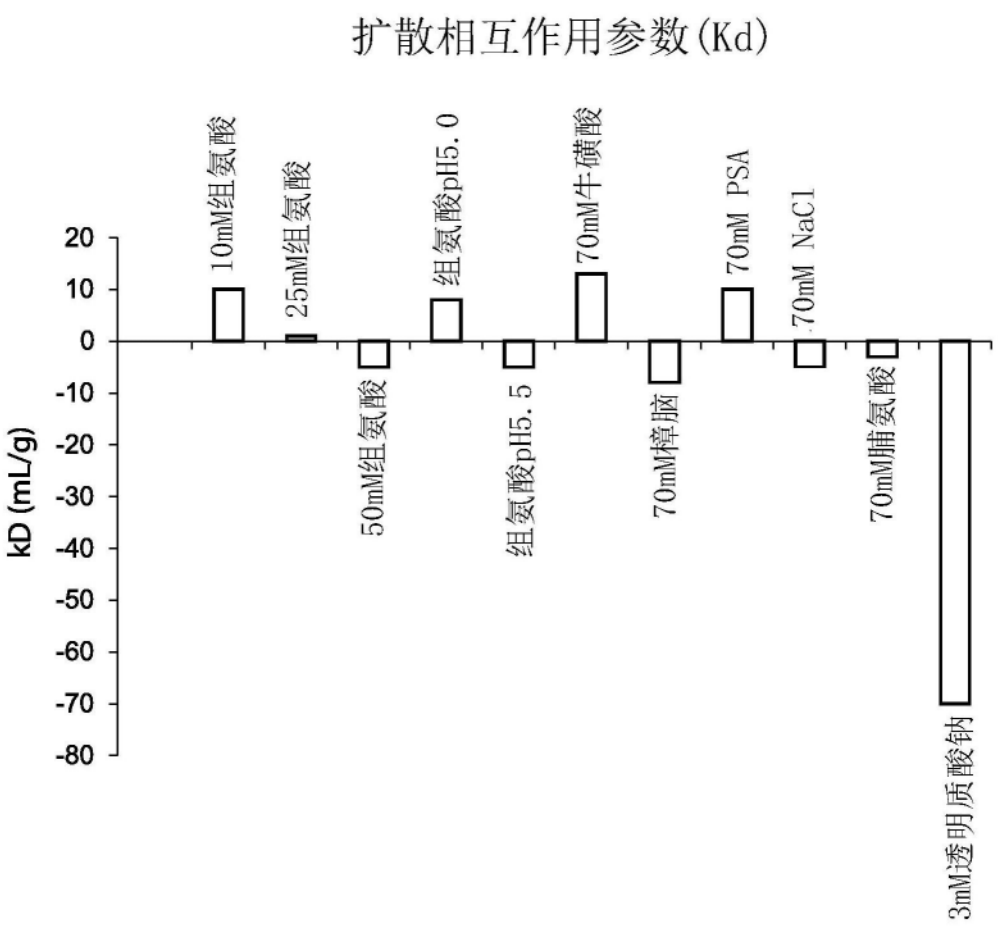

扩散相互作用参数(Kd)
kD (mL/g)
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
10mM组氨酸
25mM组氨酸
50mM组氨酸
组氨酸pH5.0
组氨酸pH5.5
70mM牛磺酸
70mM樟脑
70mM PSA
70mM NaCl
70mM脯氨酸
3mM透明质酸钠

图6

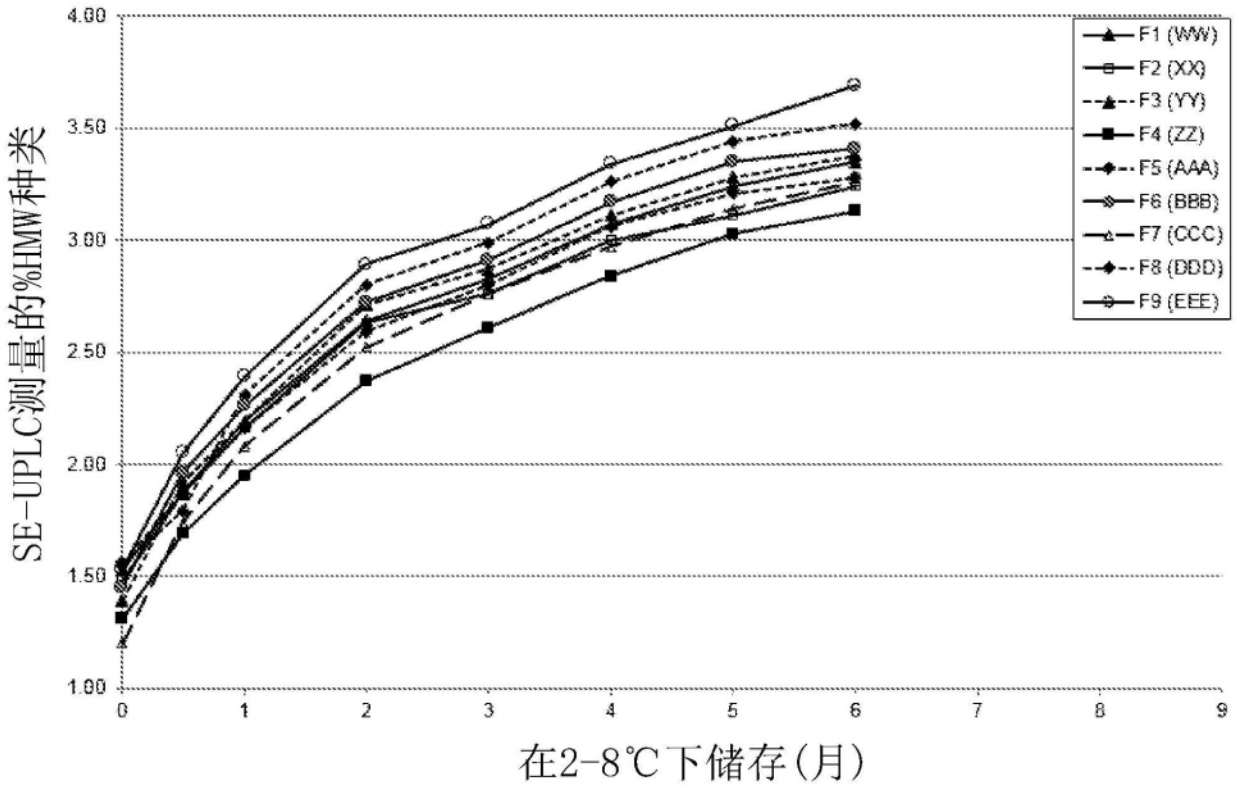

SE-UPLC测量的%HMW种类
在2-8℃下储存(月)
F1 (WW)
F2 (XX)
F3 (YY)
F4 (ZZ)
F5 (AAA)
F6 (BBB)
F7 (CCC)
F8 (DDD)
F9 (EEE)

图7

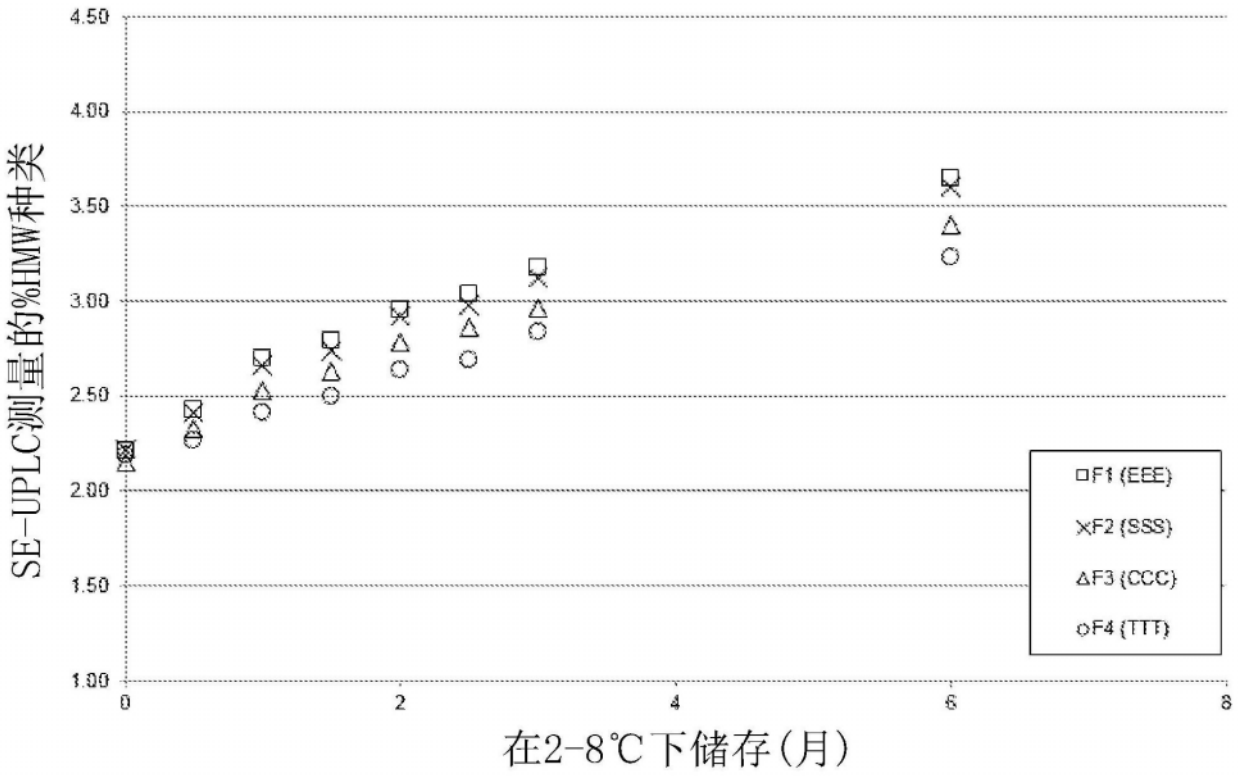

SE-UPLC测量的%HMW种类
在2-8℃下储存(月)
F1 (EEE)
F2 (SSS)
F3 (CCC)
F4 (TTT)

图8A

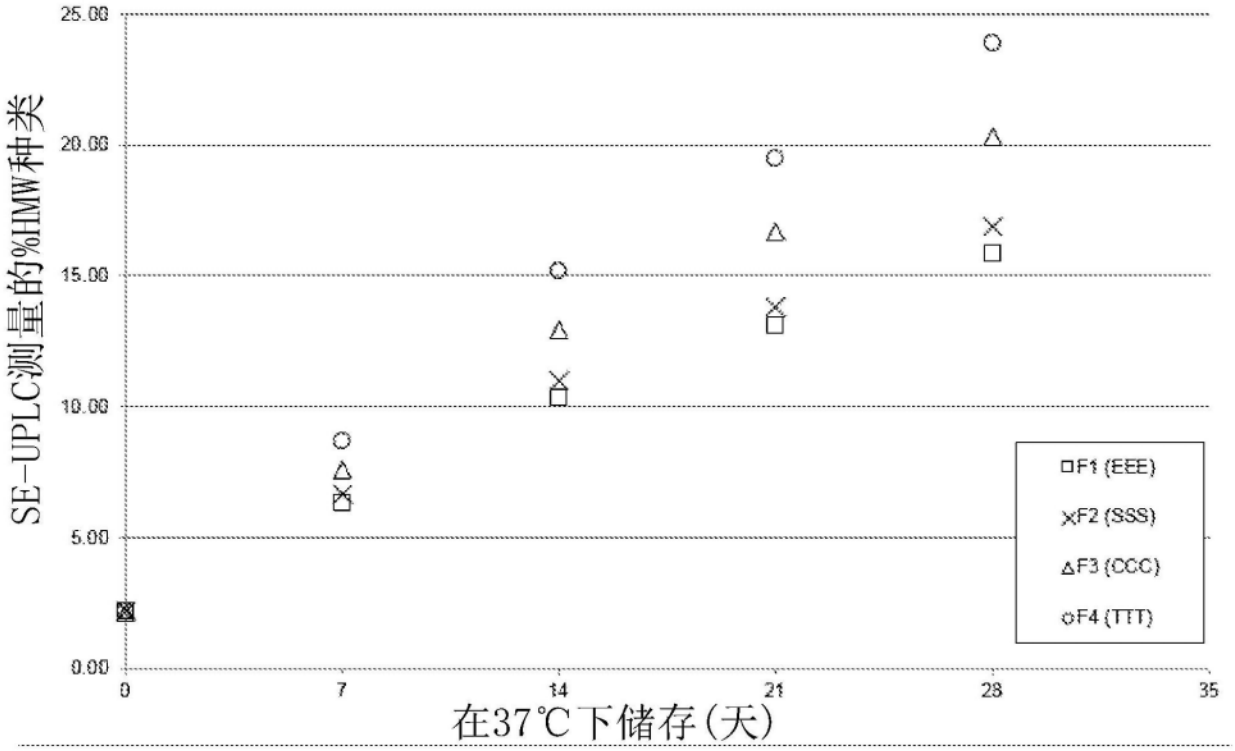

SE-UPLC测量的%HMW种类
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
0
7
14
21
28
35
在37℃下储存(天)
F1 (EEE)
F2 (SSS)
F3 (CCC)
F4 (TTT)

图8B

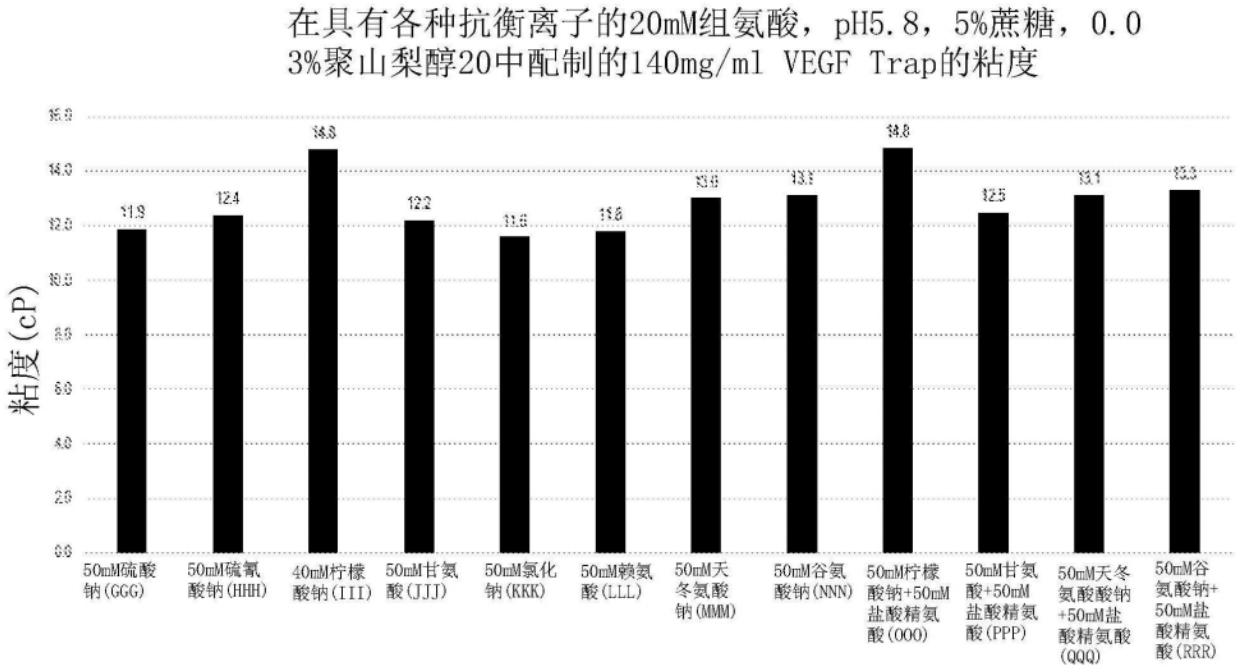

在具有各种抗衡离子的20mM组氨酸，pH5.8，5%蔗糖，0.03%聚山梨醇20中配制的140mg/ml VEGF Trap的粘度
粘度(cP)
11.9
12.4
14.8
12.2
11.6
11.8
13.0
13.1
14.8
12.5
13.1
13.3
50mM硫酸钠(GGG)
50mM硫氰酸钠(HHH)
40mM柠檬酸钠(III)
50mM甘氨酸(JJJ)
50mM氯化钠(KKK)
50mM赖氨酸(LLL)
50mM天冬氨酸钠(MMM)
50mM谷氨酸钠(NNN)
50mM柠檬酸钠+50mM盐酸精氨酸(OOO)
50mM甘氨酸+50mM盐酸精氨酸(PPP)
50mM天冬氨酸钠+50mM盐酸精氨酸(QQQ)
50mM谷氨酸钠+50mM盐酸精氨酸(RRR)

图9

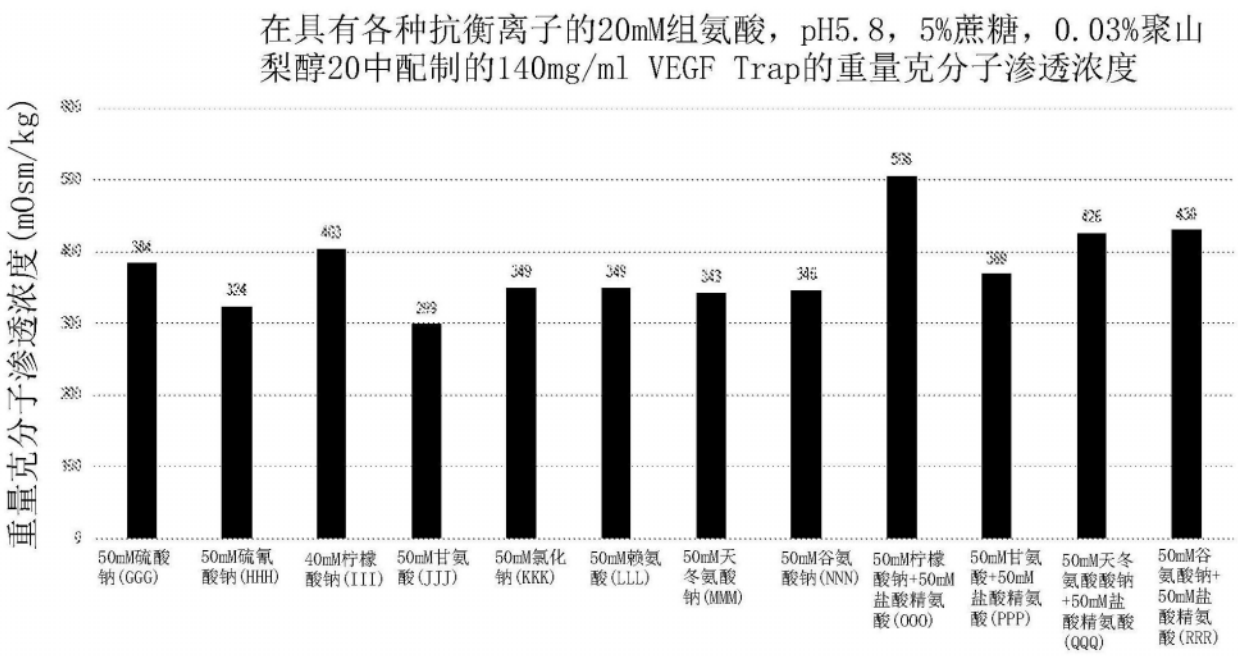

在具有各种抗衡离子的20mM组氨酸，pH5.8，5%蔗糖，0.03%聚山梨醇20中配制的140mg/ml VEGF Trap的重量克分子渗透浓度
重量克分子渗透浓度(mOsm/kg)
384
334
403
299
349
348
343
345
508
388
426
438
50mM硫酸钠(GGG)
50mM硫氰酸钠(HHH)
40mM柠檬酸钠(III)
50mM甘氨酸(JJJ)
50mM氯化钠(KKK)
50mM赖氨酸(LLL)
50mM天冬氨酸钠(MMM)
50mM谷氨酸钠(NNN)
50mM柠檬酸钠+50mM盐酸精氨酸(OOO)
50mM甘氨酸+50mM盐酸精氨酸(PPP)
50mM天冬氨酸钠+50mM盐酸精氨酸(QQQ)
50mM谷氨酸钠+50mM盐酸精氨酸(RRR)

图10

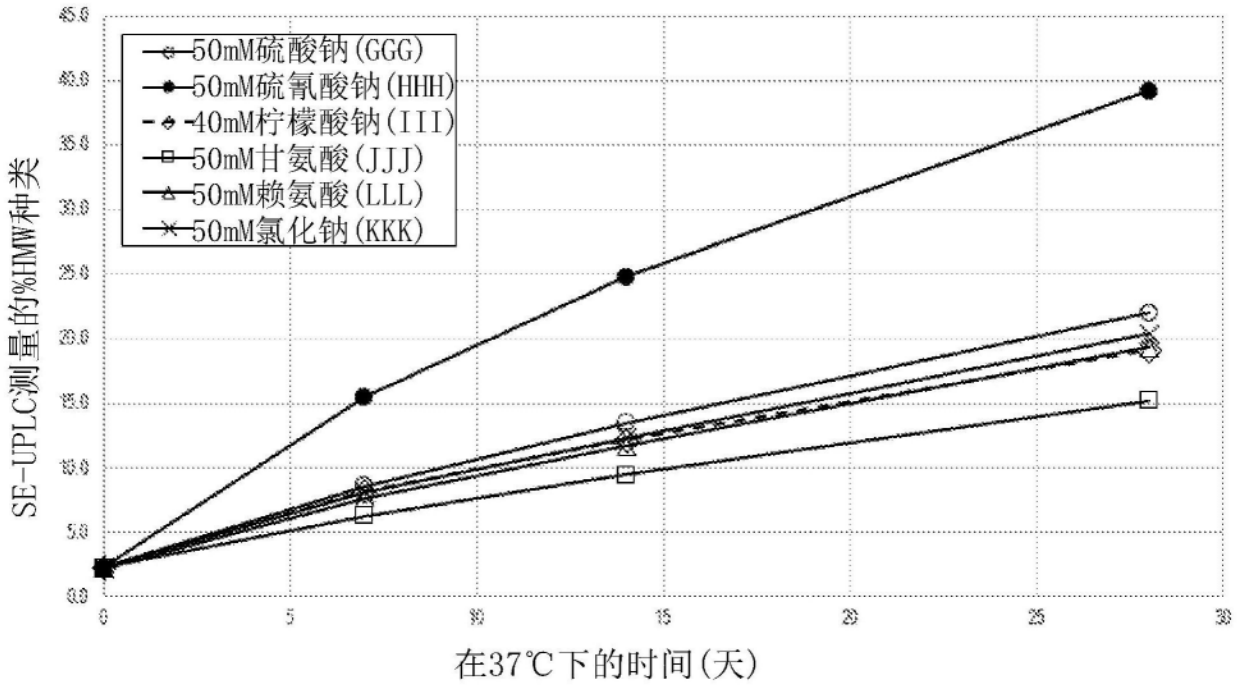

50mM硫酸钠(GGG)
50mM硫氰酸钠(HHH)
40mM柠檬酸钠(III)
50mM甘氨酸(JJJ)
50mM赖氨酸(LLL)
50mM氯化钠(KKK)
SE-UPLC测量的%HMW种类
在37℃下的时间(天)

图11A

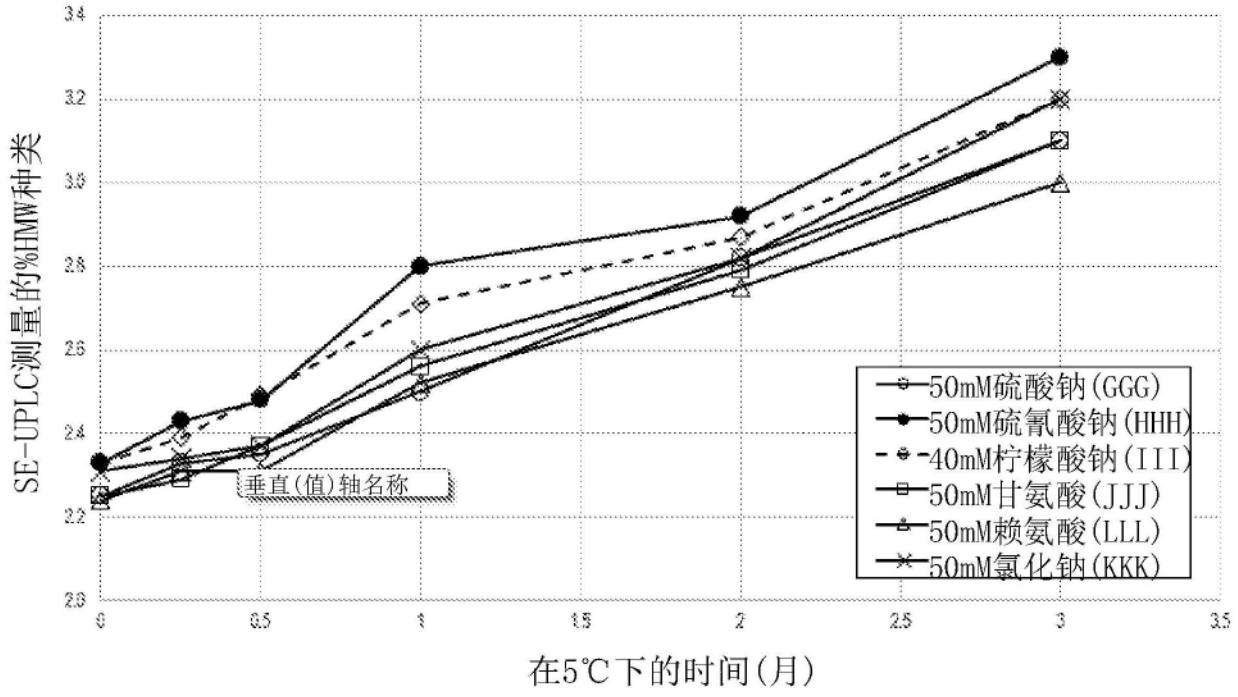

SE-UPLC测量的%HMW种类
在5℃下的时间(月)
垂直(值)轴名称
50mM硫酸钠(GGG)
50mM硫氰酸钠(HHH)
40mM柠檬酸钠(III)
50mM甘氨酸(JJJ)
50mM赖氨酸(LLL)
50mM氯化钠(KKK)

图11B

制剂	扩散系数 (cm2/sec)	半径 (nm)	% Pd
F1 (50mM 硫酸钠)	3.32E-07	7.4	15.3
F2(50mM 硫氰酸钠)	2.98E-07	8.2	14.7
F3 (50mM 柠檬酸钠)	3.20E-07	7.7	16.3
F4 (50mM 甘氨酸)	3.89E-07	6.3	18.9
F5 (50mM 氯化钠)	3.24E-07	7.6	13.8
F6 (50mM 赖氨酸)	3.17E-07	7.7	13.5
F7 (50mM 天冬氨酸钠)	3.32E-07	7.4	18.2
F8 (50mM 谷氨酸钠)	3.32E-07	7.4	15.0
F9 (50mM 柠檬酸钠 +50mM 精氨酸 HCl)	3.31E-07	7.4	14.4
F10 (50mM赖氨酸+ 50mM 精氨酸 HCl)	3.31E-07	7.4	14.3
F11 (50mM 天冬氨酸钠 + 50mM 精氨酸HCl)	3.24E-07	7.6	14.8
F12 (50mM 谷氨酸钠+ 50mM 精氨酸 HCl)	3.22E-07	7.6	13.3

图12

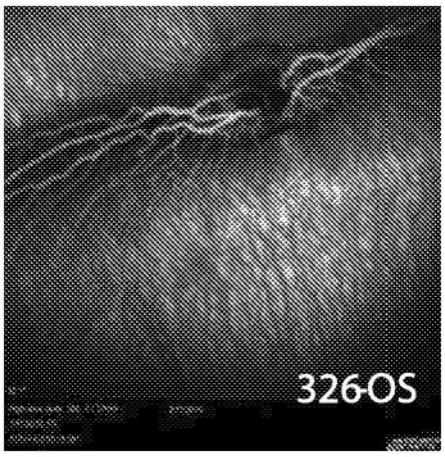


图13A

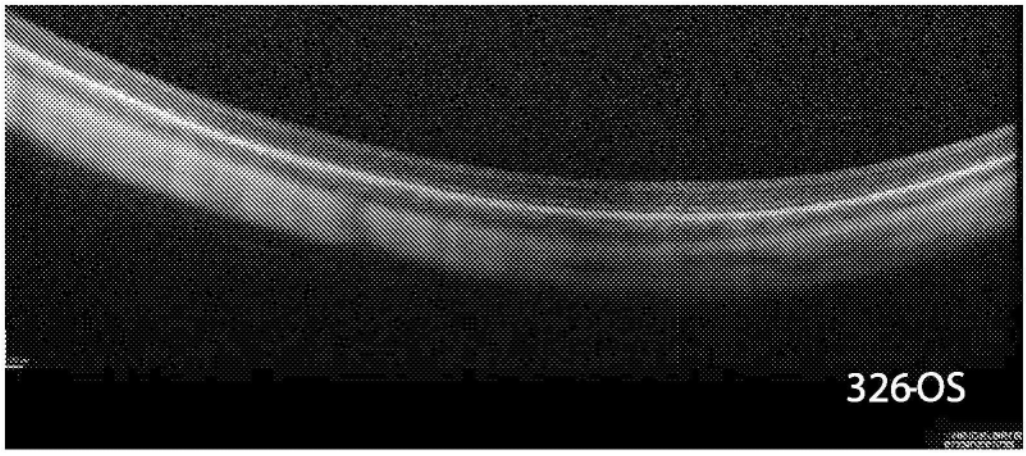


图13B

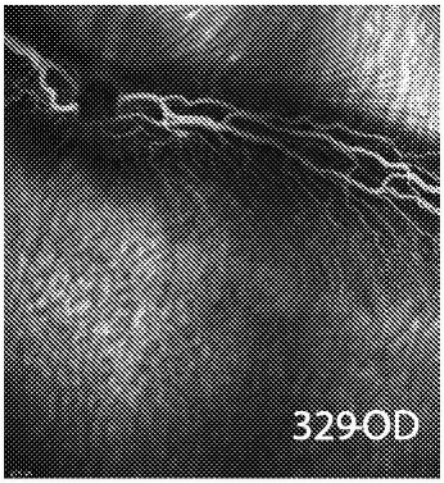


图13C

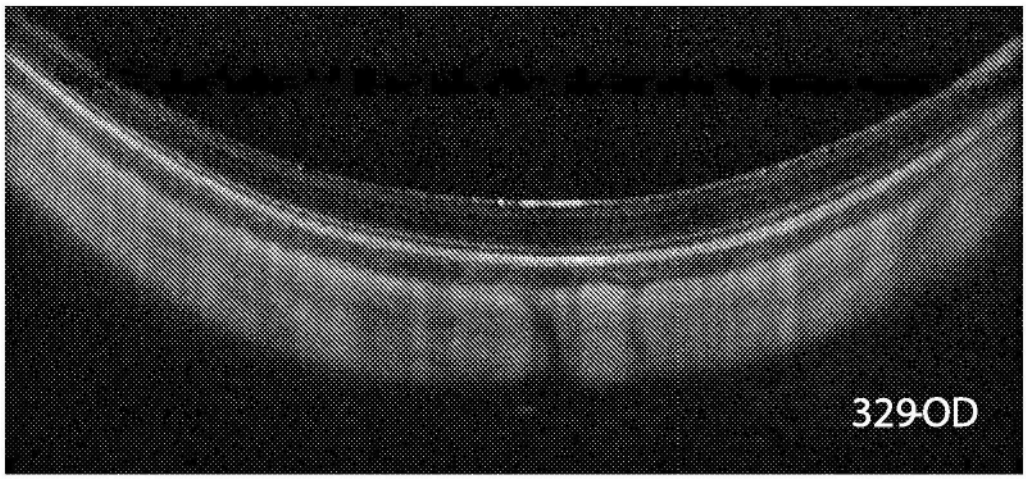


图13D

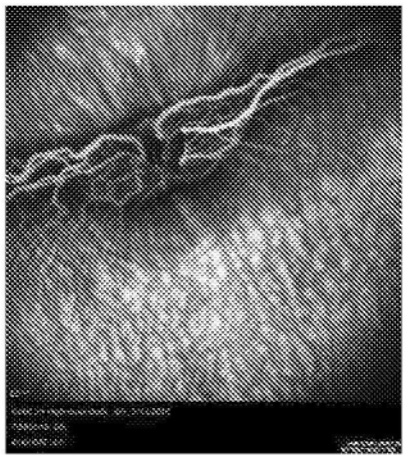


图14A

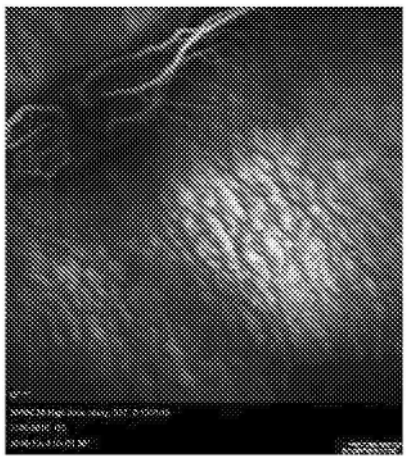


图14B

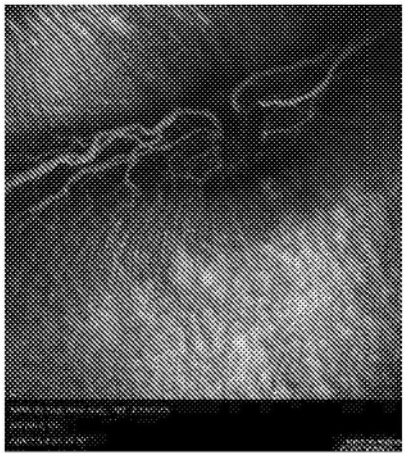


图14C

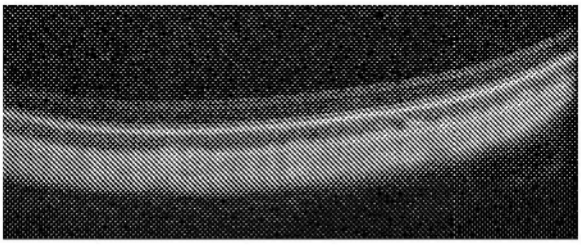


图14D

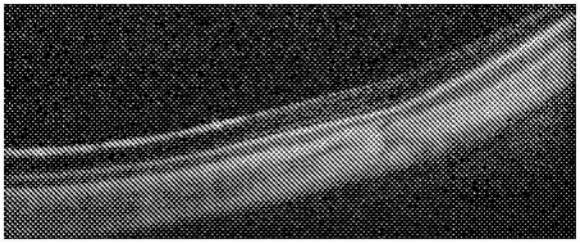


图14E

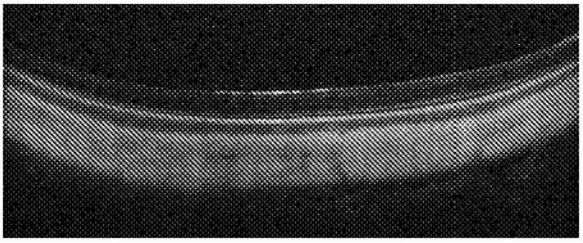


图14F

FA

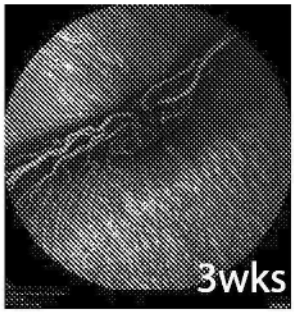


图15A

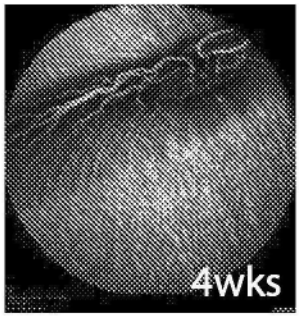


图15B

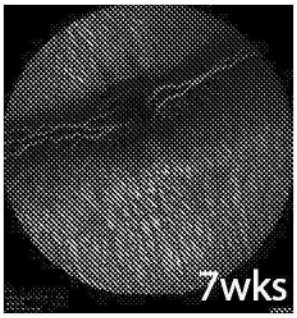


图15C

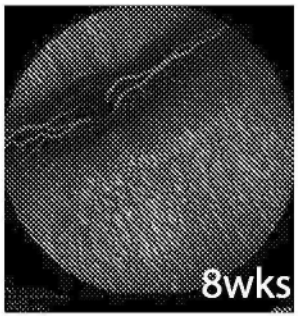


图15D

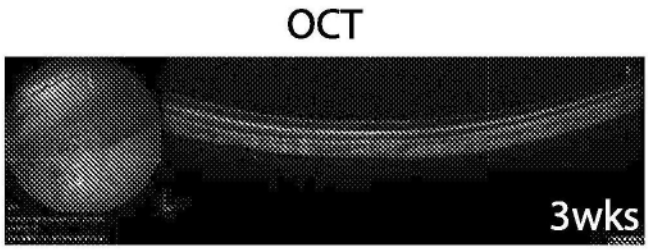


图15E

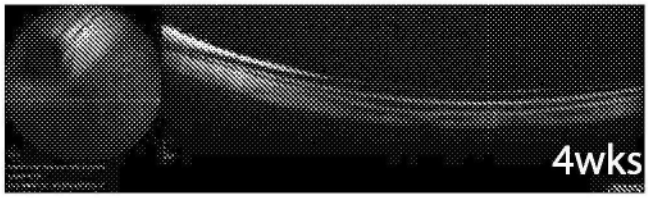


图15F

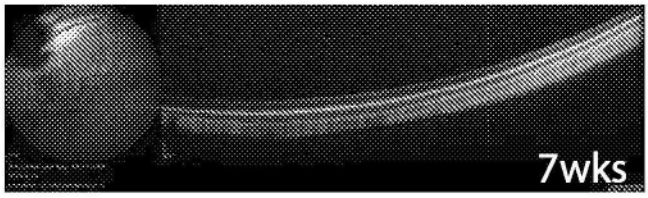


图15G

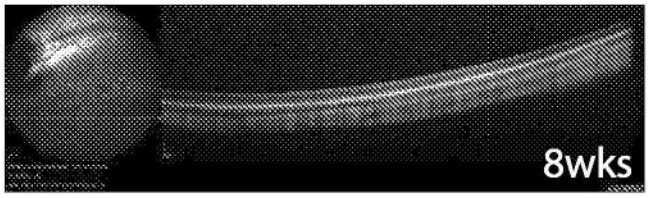


图15H

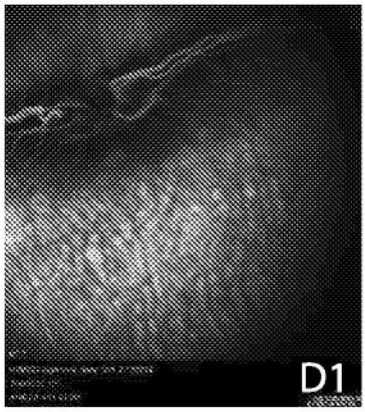


图16A

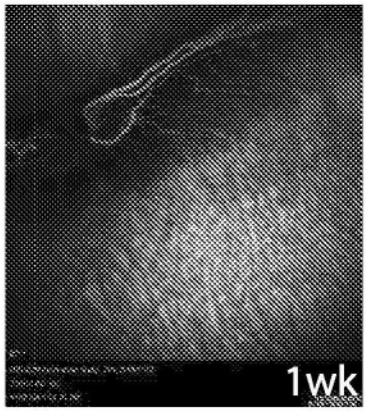


图16B



图16C

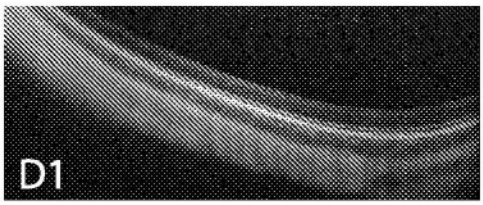


图16D

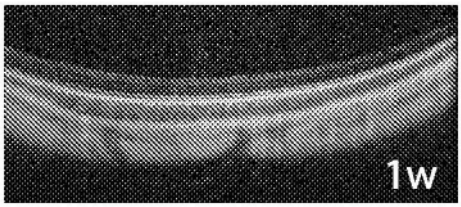


图16E

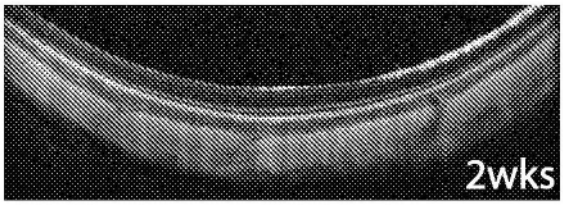


图16F

FA

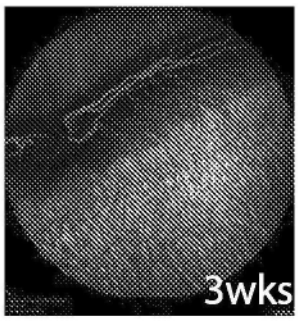


图17A

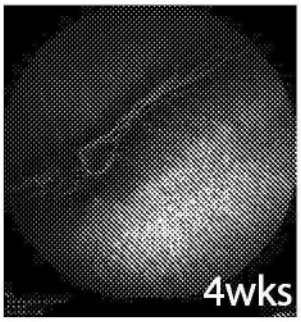


图17B

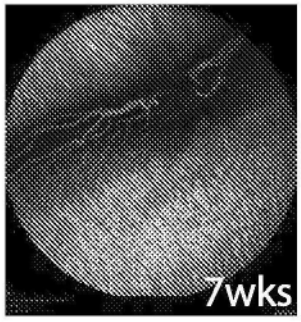


图17C

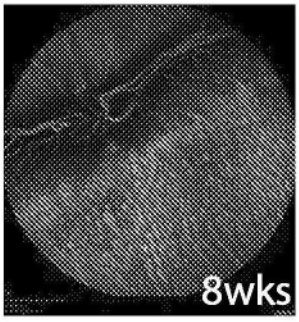


图17D

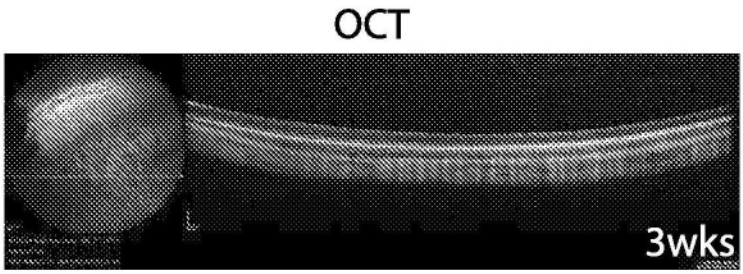


图17E

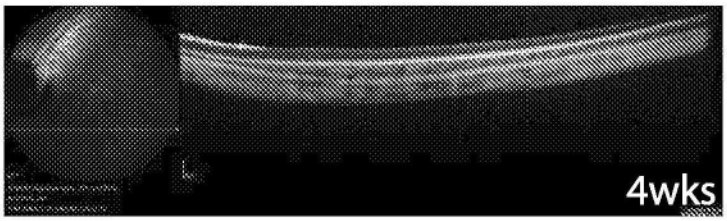


图17F

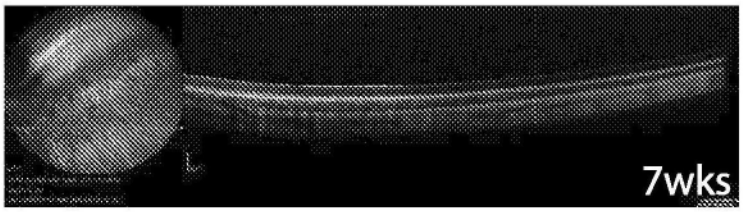


图17G

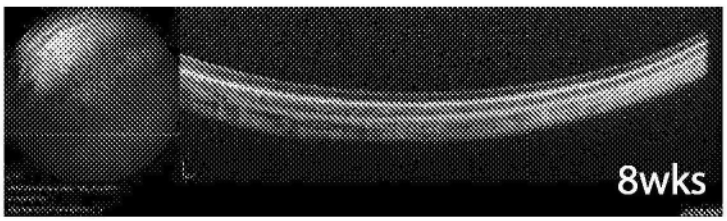


图17H

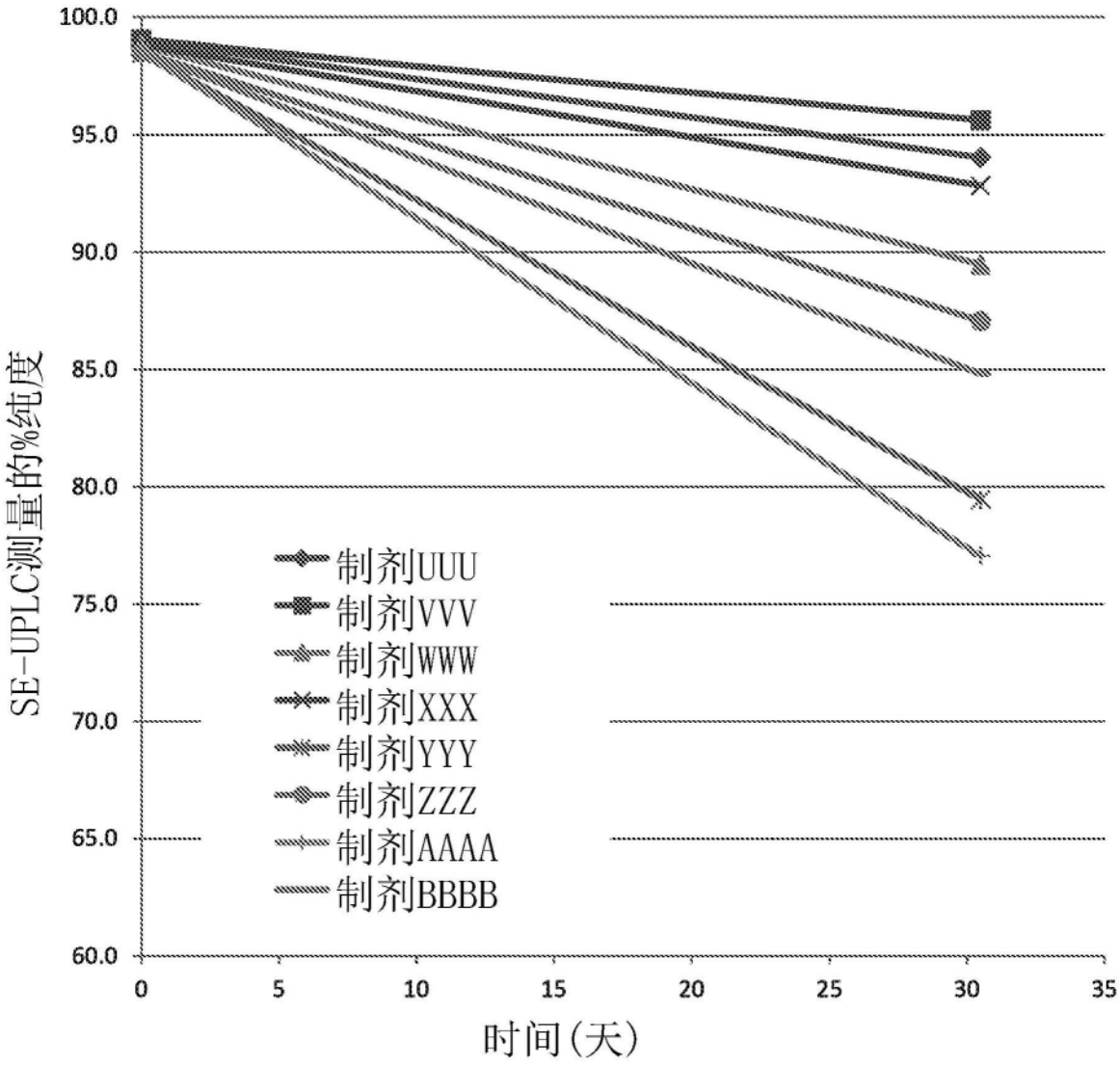

100.0
95.0
90.0
85.0
80.0
75.0
70.0
65.0
60.0
SE-UPLC测量的%纯度
0
5
10
15
20
25
30
35
时间(天)
制剂UUU
制剂VVV
制剂WWW
制剂XXX
制剂YYY
制剂ZZZ
制剂AAAA
制剂BBBB

图18A

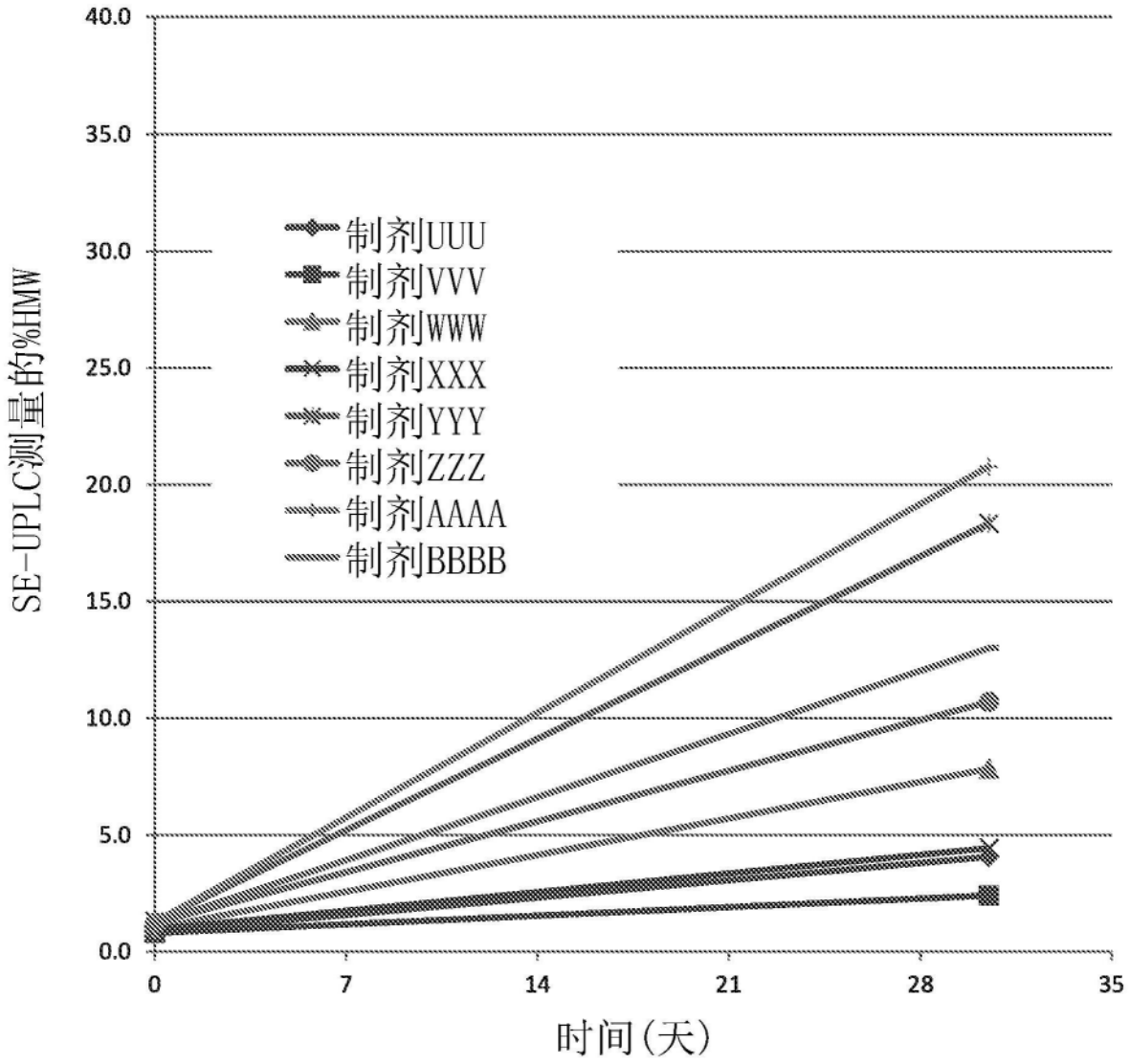

40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
SE-UPLC测量的%HMW
制剂UUU
制剂VVV
制剂WWW
制剂XXX
制剂YYY
制剂ZZZ
制剂AAAA
制剂BBBB
0
7
14
21
28
35
时间(天)

图18B

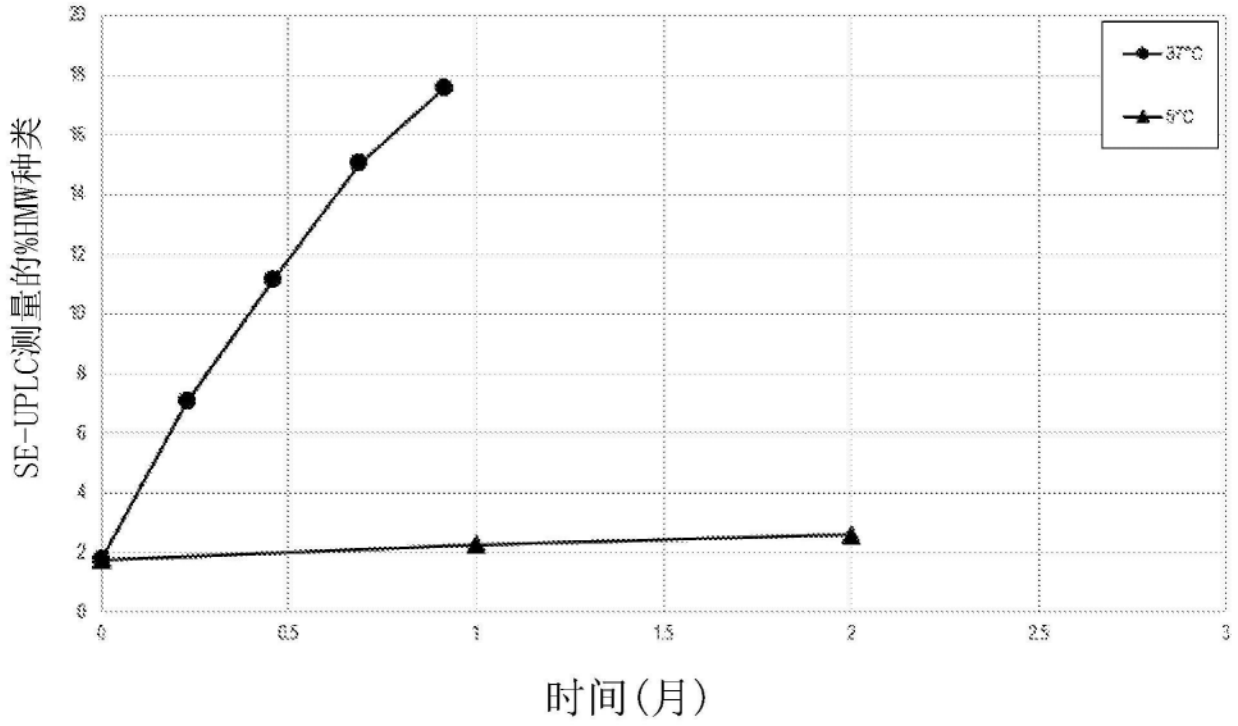

SE-UPLC测量的%HMW种类
37°C
5°C
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
时间(月)

图19A

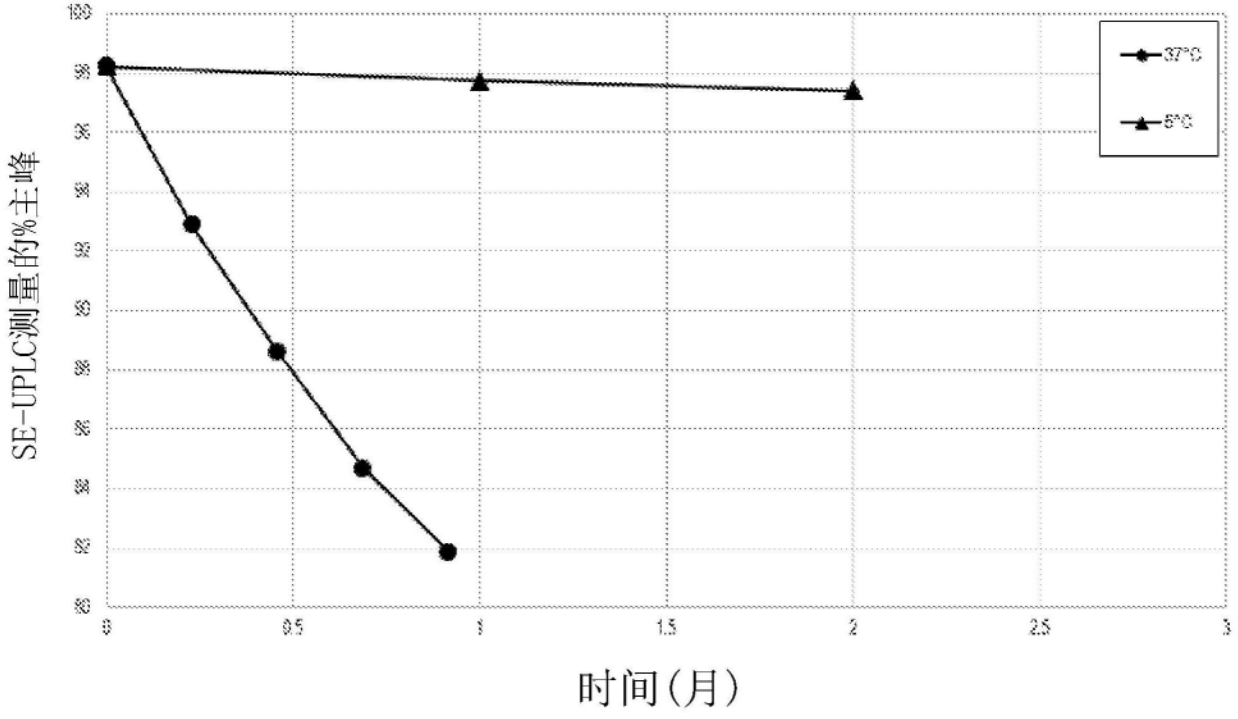

SE-UPLC测量的%主峰
37°C
5°C
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
时间(月)

图19B

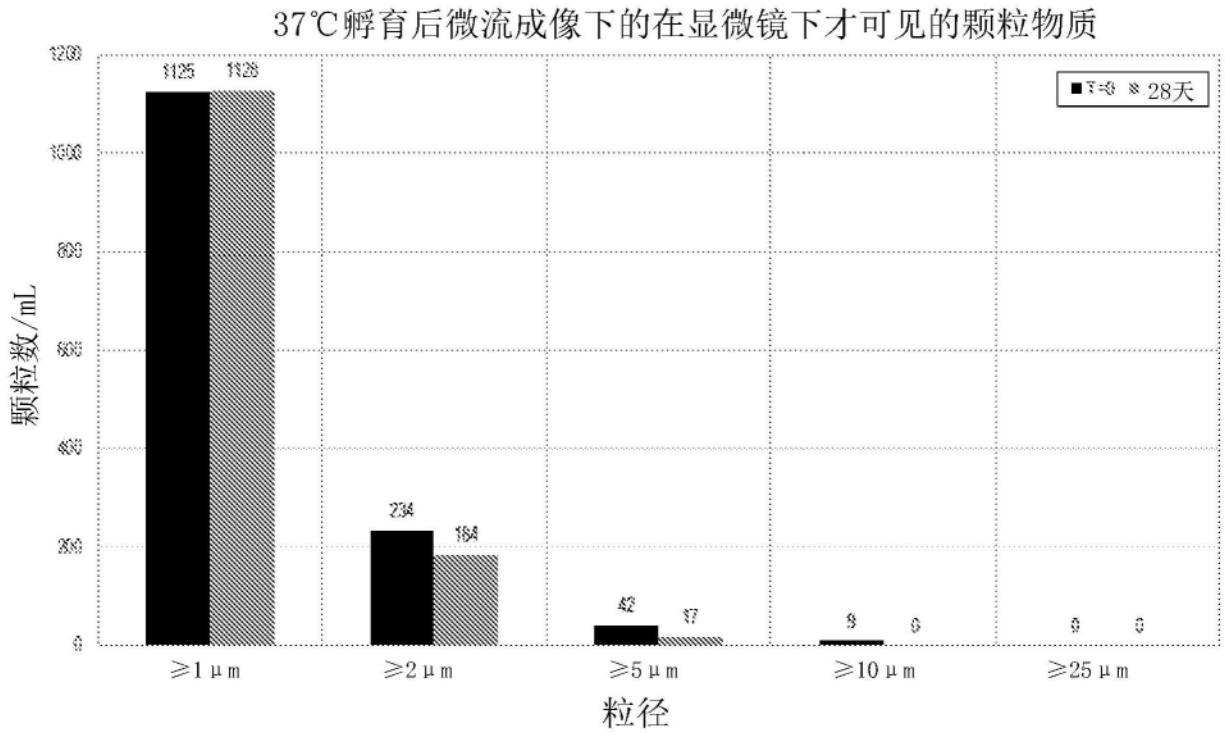

37℃孵育后微流成像下的在显微镜下才可见的颗粒物质
颗粒数/mL
1125
1126
234
164
42
17
9
6
0
0
≥1μm
≥2μm
≥5μm
≥10μm
≥25μm
粒径

图19C

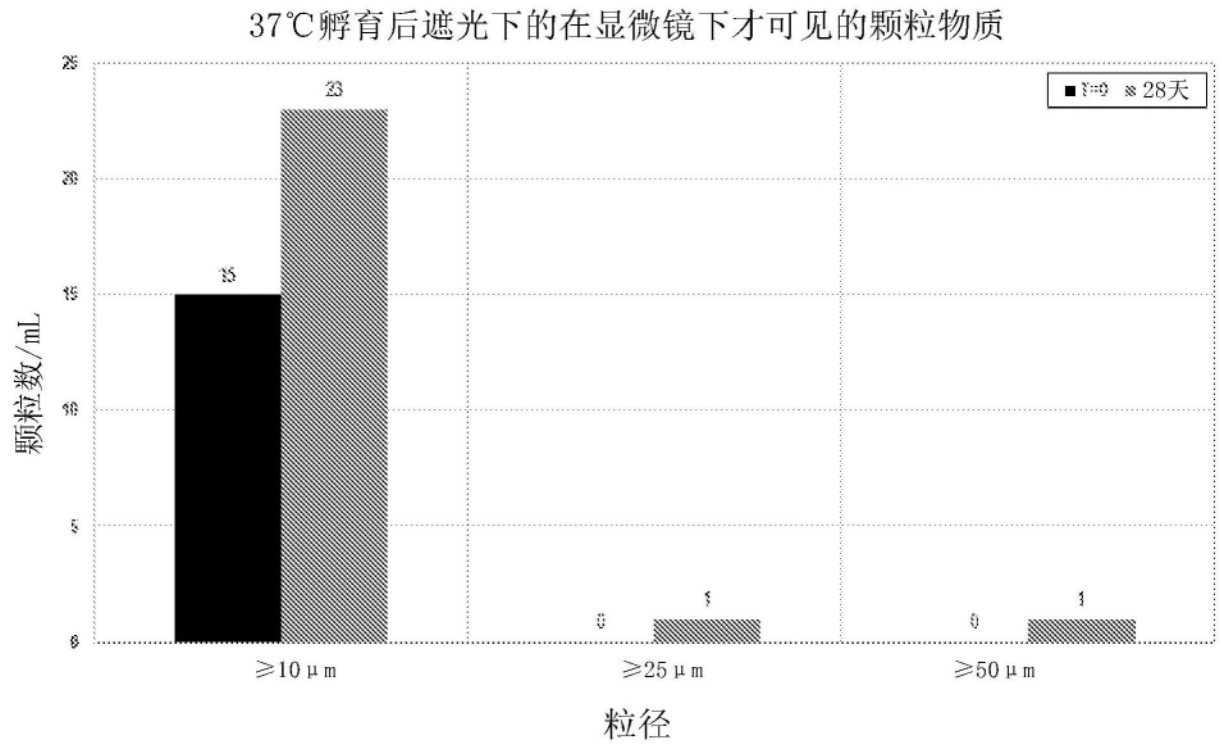

37℃孵育后遮光下的在显微镜下才可见的颗粒物质
颗粒数/mL
15
33
0
1
0
1
≥10μm
≥25μm
≥50μm
粒径

图19D

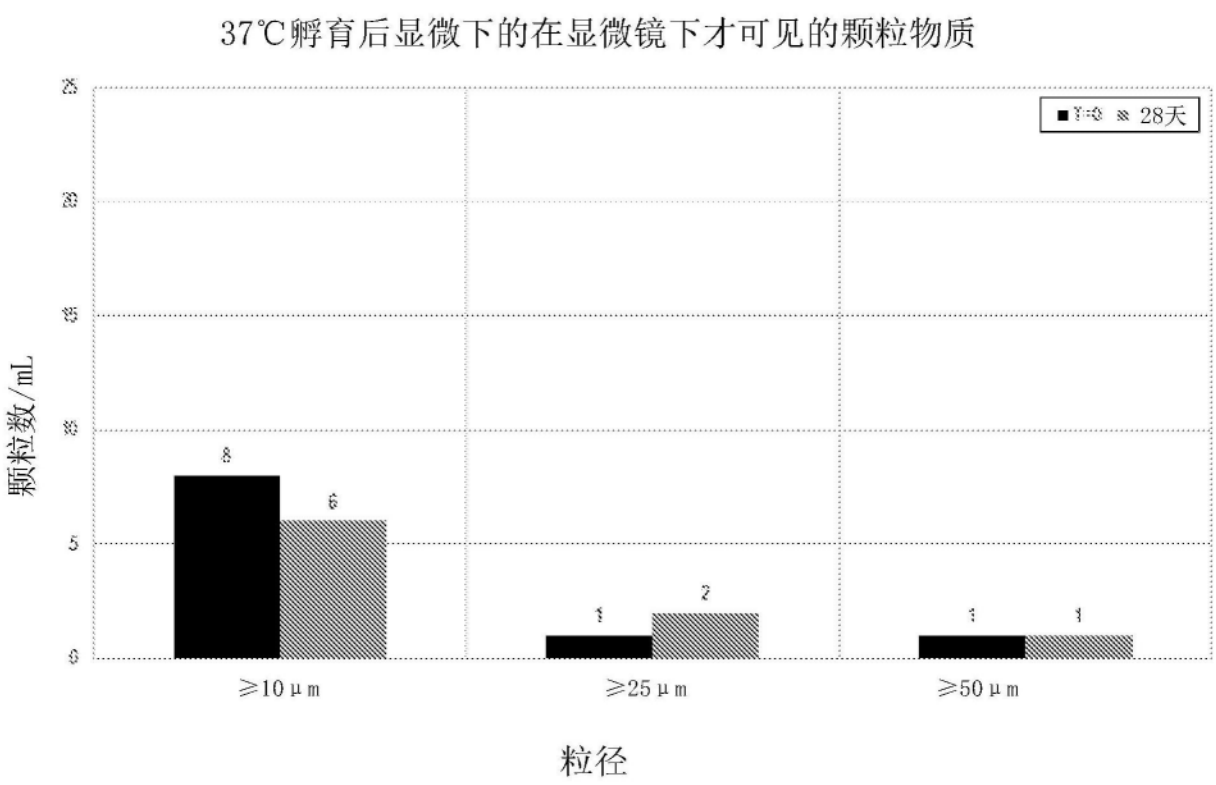

37℃孵育后显微下的在显微镜下才可见的颗粒物质
■T=0 ■28天
颗粒数/mL
8
6
1
2
1
1
≥10μm
≥25μm
≥50μm
粒径

图19E

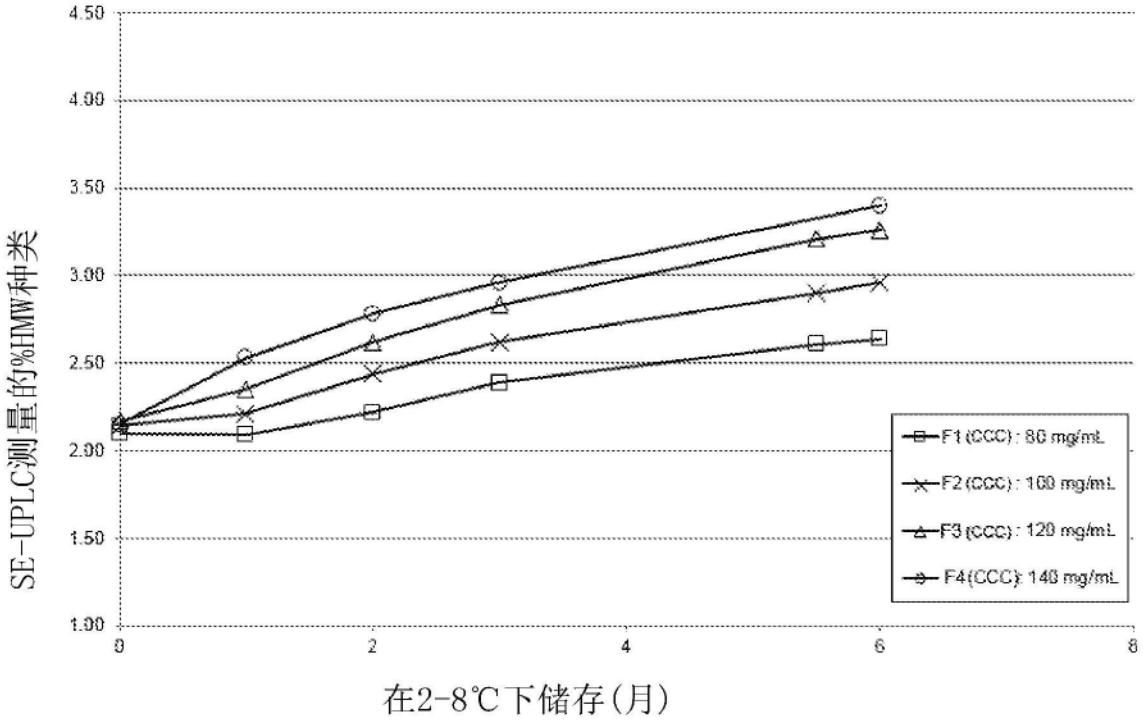

SE-UPLC测量的%HMW种类
4.50
4.00
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0
2
4
6
8
F1(CCC): 80 mg/mL
F2(CCC): 100 mg/mL
F3(CCC): 120 mg/mL
F4(CCC): 140 mg/mL
在2-8℃下储存(月)

图20A

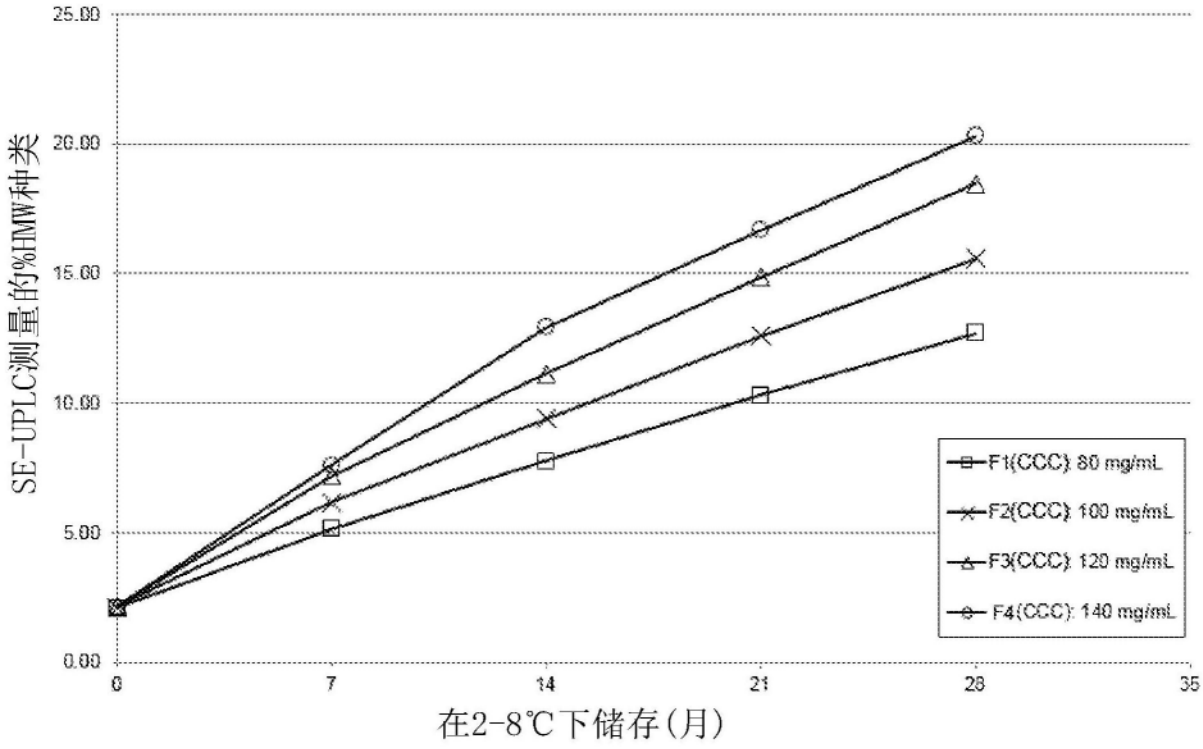

SE-UPLC测量的%HMW种类
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
0
7
14
21
28
35
在2-8℃下储存(月)
F1(CCC): 80 mg/mL
F2(CCC): 100 mg/mL
F3(CCC): 120 mg/mL
F4(CCC): 140 mg/mL

图20B

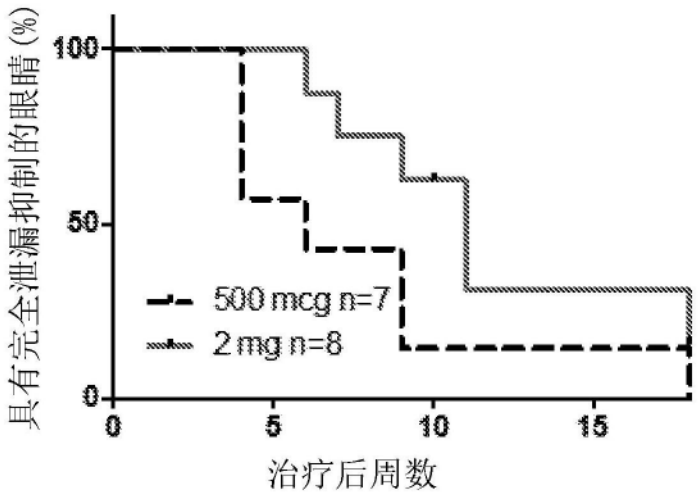

具有完全泄漏抑制的眼睛(%)
100
50
0
0
5
10
15
治疗后周数
500 mcg n=7
2 mg n=8

图21