



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 305585

(13) B1

(51) Int Cl⁶ A 61 K 38/49, 38/48, 47/12, 47/18,
A 61 K 47/22, 47/26

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19913238	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	19.12.1990, PCT/EP90/02250
(22) Inng. dag	19.08.1991	(85) Videreføringsdag	19.08.1991
(24) Løpedag	19.12.1990	(30) Prioritet	20.12.1989, DE, 3942141
(41) Alm. tilgj.	19.08.1991		
(45) Meddelt dato	28.06.1999		
(73) Patenthaver	Boehringer Mannheim GmbH, D-68298 Mannheim, DE		
(72) Oppfinner	Ulrich Kohnert, Habach, DE Rainer Rudolph, Weilheim, DE		
(74) Fullmektig.	Bryns Patentkontor AS, 0106 Oslo		

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat av et ikke-glykosylert t-PA-derivat**

(56) Anførte publikasjoner EP A 211592, EP 228862, US 4898826, WO 90/08557
Biochemistry, 1989, 28, 4047-4054

(57) Sammendrag

Farmasøytisk preparat av et ikke-glykosylert t-PA-derivat K2P pro med en enzymatisk aktivitet på minst 1,4 MU/ml og en pH-verdi på 4,5 til 6,5, inneholdende sitrat og minst en forbindelse fra følgende gruppe

- a) askorbinssyre,
- b) EDTA,
- c) aminoforbindelser med formel



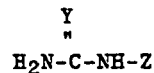
der

X = SO₃H, CH(NH₂)-CO₂H, CO₂H, H, NH₂ eller OH,

R = C₁-C₉-alkylen, fortrinnsvis C₄-C₇-alkylen,

C₃-C₆-cykloalkylen eller benzytiden og R¹ og R² er uavhengig av hverandre H eller C₁-C₃-alkyl,

- d) guanidin-analoge forbindelser med formel



der

Y = H₂N⁺ eller O,

Z = H eller (CH₂)_m V, (CH₂)_mCH(NH₂)-CO₂H,

CH(CO₂H)-(CH₂)_mCO₂H,

V = NH₂ eller CO₂H og

m = 1 til 4

- e) karboksylsyrer substituert med en eller flere hydrokso-, keto- eller/og ytterligere karboksyl-grupper,

- f) dimetylbiguanid,
- g) pyrimidinnukleosider og pyrimidinnukleotider,
- h) trehalose, glukosamin
samt legemiddel på grunnlag av t-PA-derivatet K2P
pro som virkestoff og fremgangsmåte for frem-
stilling, er beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat av et ikke-glykosylert t-PA-derivat.

5 Menneskelig vevs-plasminogenaktivator (t-PA) har en stor terapeutisk betydning ved oppløsning av blodkoagler, f.eks. ved hjerteinfarkt. t-PA bevirker oppløsning av blodkoagler gjennom aktivering av plasminogen til plasmin. Plasmin oppløser deretter fibrin som er hovedkomponenten av protein-

10 matrisen i koagulert blod.

Naturlig t-PA er sammensatt av flere funksjonelle domener F, E, K1, K2 og P. Domene P inneholder det proteolytiske aktive sentrum som bevirker spaltning av plasminogen til plasmin.

15 Genteknologisk fremstilling av t-PA eller forskjellige t-PA-muteiner, der noen av domenene F, E, K1 og K2 er deletert i eukaryote og prokaryote celler, er allerede kjent. t-PA-derivater blir dermed syntetisert fra prokaryoter i forhold til naturlig t-PA i ikke-glykosylert form.

20 Det er videre kjent at sukkerandelen har en betydelig innvirkning på oppløseligheten og aggregasjonen av proteinene (J. Biol. Chem. 263 (1988), 8832-8837). Det ble nå fastslått at et ikke-glykosylert t-PA-mutein med domene-sammensetningen

25 K2P har en mye dårligere oppløselighet enn glykosylerte t-PA-derivater. Disse ikke-glykosylerte t-PA variantene oppløser seg bare i liten grad i de ellers for oppløsning av proteiner anvendte bufferne, som f.eks. 50 mmol/l Na-citrat pH 6. 50 mmol/l fosfatbuffer eller fysiologisk NaCl-oppløsning. For

30 tilsetning som terapeutisk virkestoff skal derimot det ikke-glykosylerte t-PA-derivatet K2P pro foreligge med en tydelig høyere enzymatisk aktivitet på minst 1,4 MU/ml, fortrinnsvis 1,4 MU/ml til 10 MU/ml.

35 Fra EP-A-0.217.379 er det kjent å forhøye oppløseligheten av t-PA fra prokaryoter (t-PA pro) gjennom nøytrale eller lett alkaliske argininformuleringer. En ulempe ved denne frem-

gangsmåten er derimot at god oppløselighet av t-PA pro bare kan oppnås med meget høye argininkonsentrasjoner. Stabiliteten til høykonsentrert t-PA-derivatet K2P pro under nøytrale eller lett alkaliske betingelser, er liten.

5

Hensikten med oppfinnelsen er dermed å utvikle formuleringer som inneholder det ikke-glykosylerte t-PA-derivatet K2P pro med en enzymatisk aktivitet på minst 1,4 MU/ml, der stabiliteten av t-PA-derivatet skal bli beholdt over et lengre tidsrom.

10

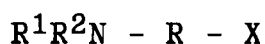
Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer følgelig en fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat av et ikke-glykosylert t-PA-derivat som består av kringle-2 domenen og proteasedomenen og begynner med en av aminosyrene 174-180 og som slutter med aminosyren 527 og som videre kan inneholde aminosyrene -3(Gly) til +5(Ile) hele eller deler av (K2P pro) med en enzymatisk aktivitet på minst 1,4 MU/ml og en pH-verdi på 4,5 til 6,5.

20

Fremgangsmåten er kjennetegnet ved at man omdanner t-PA-derivatet, sammen med sitrat og minst en forbindelse fra gruppen bestående av at man omdanner t-PA derivatet, sammen med sitrat og minst en forbindelse fra gruppen bestående av

25

- a) askorbinsyre,
- b) EDTA,
- c) aminoforbindelser med formelen



30

der

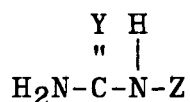
X = SO₃H, CH(NH₂)-CO₂H, CO₂H, H, NH₂ eller OH,

R = C₁-C₉-alkylen, fortrinnsvis C₄-C₇-alkylen, C₃C₆-cykloalkylen eller benzyliden og R¹ og R², er uavhengig av hverandre H eller C₁-C₃-alkyl,

35

- d) guanidinanaloge forbindelser med formel

3



der Y = H₂N⁺ eller O,

Z = H eller (CH₂)_m V, (CH₂)_mCH(NH₂)-CO₂H,
 CH(CO₂H)-(CH₂)_mCO₂H

V = NH₂ eller CO₂H og

m = 1 til 4

e) karboksylsyrer substituert med en eller flere hydroksyl-,
 keto- og/eller ytterligere karboksylgrupper,

f) dimetylbiguanid,

g) pyrimidinnukleosider og pyrimidinnukleotider,

h) trehalose, glukosamin, N-metylglukamin, til en egnet
 farmasøytisk administreringsform, fortrinnsvis en injeksjons-
 oppløsning eller et lyofilisat;

eventuelt sammen med vanlige farmasøytiske tilsetnings-,
 hjelpe- og/eller bærerstoffer.

Under K2P pro i forbindelse med følge foreliggende opp-
 finnelser forstår man et t-PA-derivat, som består av kringle
 2- og proteasedomenet og som dermed begynner med en av
 aminosyrene 174-180 og som slutter med aminosyre 527. K2P pro
 kan i tillegg inneholde delvis eller helt aminosyrene -3
 (Gly) til +5 (Ile). Dermed er et protein foretrukket som
 begynner med aminosyre 176 og eventuelt fra området -3 til +5
 ytterligere aminosyrene Ser, Tyr, Gln. Denne betegnelsen
 følger nomenklaturen angitt i T. J. R. Harris, Protein
 Engineering, bind 1 (1987) 449-458 (for t-PA). Fremstillingen
 av slike t-PA-derivater K2P pro er beskrevet i EP-A

0.382.174. Den enzymatiske aktiviteten for K2P pro er angitt
 som standardenhet U ifølge definisjonen til WHO for t-PA.
 Bestemmelse av aktiviteten foregår ifølge H. Lill, ZGIMAL 42
 (1987) 478-486.

For solubilisering av K2P pro har en sitratbuffer vist seg å
 være spesielt egnet. Sitratkonsentrasjonen skal f.eks.
 utgjøre minst 5 mmol/l, fortrinnsvis 5 til 100 mmol/l,
 spesielt foretrukket er 50 mmol/l. pH-verdien blir alt etter

basisitet av tilsatte forbindelse fortrinnsvis innstilt med HCl eller en base som f.eks. NaOH eller KOH.

5 Det ble overraskende fastslått at oppløseligheten av ikke-glykosylert K2P pro er vesentlig lavere i andre buffersystemer, f.eks. fosfatbuffer, ved lik ionestyrke og lik pH-verdi. Det har vist seg egnet å innstille pH-verdien til alkaliske sitrat-oppløsninger med HCl, dvs. at sammensetningen i tillegg inneholder kloridioner. I nærvær av 10 kloridioner er høykonsentrerte oppløsninger av ikke-glykosylert K2P pro vesentlig mere stabile enn f.eks. i nærvær av fosfationer. pH-verdien til sure sitratoppløsninger blir vanligvis innstilt med NaOH.

15 Egnet for et farmasøytisk preparat ifølge oppfinnelsen er en pH-verdi mellom 4,5 og 6,5, og foretrukket er en pH-verdi på 5 til 6. Det er overraskende at stabiliteten til det ikke glykosylerte t-PA-derivatet K2P pro i oppløsningen reduseres ved nativt t-PA-anvendte forbindelser med en pH-verdi på > 7. 20 Dermed er den enkjedete formen av K2P pro ved pH 7,2 og pH 8 i argininbuffrete oppløsninger bare få dager stabile ved romtemperatur eller høyere temperaturer.

Et farmasøytisk preparat ifølge oppfinnelsen inneholder 25 askorbinsyre, fortrinnsvis 0,1 til 1 mol/l, spesielt foretrukket 0,2 til 0,3 mol/l.

Konsentrasjonen av EDTA skal fortrinnsvis utgjøre 1 til 200 mmol/l, spesielt foretrukket er 10 til 100 mmol/l.

30 Forttrinnsvis anvendes for en ifølge oppfinnelsen fremstilt sammensetning som aminoforbindelser taurin, ϵ -aminokapronsyre, traneksamsyre, lysin, ornitin, δ -aminovaleriansyre, p-aminometylbenzosyre, 8-amino-oktansyre elle/og 7-aminoheptansyre. 35 Spesielt foretrukket er anvendelse av ϵ -aminokapronsyre, p-aminometylbenzosyre, 7-aminoheptansyre, 8-aminooktansyre, traneksansyre eller/og lysin. Foretrukne konsentrasjo-

ner utgjør 0,5 til 20 mmol/l, spesielt foretrukket er 1 til 10 mmol/l.

Likeledes er følgende egnede 4-aminobutanol-1, 5-aminopentanol-1, 6-aminoheksanol-1, 1,9-diaminononan, 1,8-diaminooktan, 1,7-diaminoheptan, 1,6-diaminoheksan, 1,5-diaminopentan, 1,4-diaminoburan eller/og 1,3-diaminopropan. Konsentrasjonene til egnede α,ω -diamin og α,ω -aminoalkoholer i et preparat ifølge oppfinnelsen utgjør fortrinnsvis 10 til 100 mmol/l.

Taurin og analoge forbindelser blir fortrinnsvis anvendt med 0,1 til 0,5 mol/l, spesielt foretrukket med 0,1 til 0,3 mol/l.

Videre anvendes for en ifølge oppfinnelsen fremstilt sammensetning som guanidin-analoger forbindelsene urinstoff, guanidinosmørsyre eller/og arginin. Konsentrasjonen av urinstoff utgjør fortrinnsvis 0,1 til 4 mol/l, spesielt foretrukket er 0,5 til 2 mol/l. For andre guanidin-analoge forbindelser utgjør konsentrasjonen fortrinnsvis 10 til 200 mmol/l, spesielt foretrukket er 50 til 100 mmol/l.

Som karboksylsyre, substituert med hydrokso-, keto- eller/og ytterligere karboksylgrupper, er f.eks. eplesyre, melkesyre, fumarsyre eller/og 2-oksoglutarsyre egnet. Konsentrasjonen utgjør fortrinnsvis 0,001 til 1 mol/l, spesielt foretrukket er 0,01 til 0,5 mol/l.

Dimetylbiguanid anvendes fortrinnsvis i konsentrasjoner på 50 til 400 mmol/l, spesielt foretrukket er 100 til 300 mmol/l.

Som pyrimidinnukleosid eller pyrimidinnukleotid er f.eks. tymidin, cytosin og uridin, hhv. tilsvarende nukleotider egnede. Disse forbindelsene blir fortrinnsvis anvendt i konsentrasjoner på 1 til 300 mmol/l, spesielt foretrukket er 10 til 300 mmol/l.

Trehalose, glukosamin og N-metylglukamin anvendes fortrinnsvis i konsentrasjoner på 1 til 500 mmol/l, spesielt foretrukket er 10 til 300 mmol/l.

5

Nedenfor er en rekke spesielt foretrukne preparater fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse oppført. En formulering inneholder 50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6, 2 mol/l urinstoff. En ytterligere formulering inneholder 50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 og 0,5 mol/l til 1 mol/l guanidin. Videre inneholder en ytterligere formulering 50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 og 0,3 mol/l taurin. Videre inneholder en ytterligere formulering 50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 og 0,2 mol/l til 0,3 mol/l askorbin-
10 syre. Videre inneholder en ytterligere formulering 50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 og 300 mmol/l dimetylbiguanid. En ytterligere formulering inneholder 50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 og 10 til 300 mmol/l tymidin, uridin eller cytosin, hhv. 10 til 100 mmol/l av en av de ovennevnte α,ω -diamin eller en av de ovennevnte α,ω -aminoalkoholene. En ytterligere
20 formulering inneholder 50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 og 10 til 300 mmol/l trehalose, glukosamin eller N-metylglukamin.

Videre inneholder en spesielt foretrukket formulering fremstilt ifølge oppfinnelsen 50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 og 1 mmol/l til 10 mmol/l ϵ -aminokapronsyre, δ -aminovaleriansyre, 7-aminoheptansyre, 8-aminooktansyre, p-aminometylbenzosyre, L-lysin, ornitin eller traneksamsyre. Disse forbindelsene oppviser overraskende allerede i lite molart
25 overskudd (10- til 40 ganger) en fremragende oppløselighet av K2P pro.

Videre foretrukket er også formuleringer som inneholder 50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 og en guanidin-analog forbindelse, spesielt arginin og guanidinosmørsyre i en konsentrasjon på
35 50 til 100 mmol/l. En ytterligere formulering inneholder 50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 og 10 til 500 mmol/l eplesyre, melkesyre, fumarsyre eller 2-oksoglutarsyre. Videre innehol-

der en ytterligere formulering 50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 og 10 til 100 mmol/l EDTA.

Som det fremgår av eksemplene bevirker også kombinasjonen av flere av de ovennevnte forbindelsene med sitrat en meget god oppløselighet av K₂P pro. Egnet er f.eks. kombinasjoner av lysin med arginin, ornitin, glukosamin eller/og tymidin eller av EDTA med ϵ -aminokapronsyre, lysin, arginin, glukosamin eller/og tymidin. Like egnet er også andre kombinasjoner av minst 2 av de ovennevnte forbindelsene med sitrat.

De farmasøytiske preparatene fremstilt ifølge oppfinnelsen anvendes fortrinnsvis som injeksjons- og infusjonsoppløsninger. Dette kan skje ved at en sprøyteferdig oppløsning blir stilt til rådighet som har sammensetningen angitt ved oppfinnelsen. Det er også mulig å stille til rådighet de farmasøytiske preparatene i form av lyofilisater. Disse blir da rekonstituert ved hjelp av egnede midler eller oppløsninger for injeksjonsformål. Som injeksjonsmedium anvendes fortrinnsvis vann som ved siden av injeksjonsoppløsninger inneholder vanlige tilsetningsstoffer som stabiliseringsmiddel, oppløsningsformidler, buffer og isotoniske tilsetningsstoffer, eksempelvis en fysiologisk NaCl-konsentrasjon. Slike tilsetningsstoffer er eksempelvis mannitt, tartrat- eller sitratbuffer, etanol, kompleksdanner som f.eks. etylendiamintetraeddiksyre og deres ikke-toksiske salter, samt høymolekylære polymerer som flytende polyetylenoksid for viskositetsregulering. Flytende bærerstoffer for injeksjonsoppløsninger må være sterile og blir fortrinnsvis fylt i ampuller.

Følgende eksempler beskriver konkrete utførelsesformer ifølge oppfinnelsen.

EKSEMPEL 1

Innvirkning av urinstoff på oppløseligheten til et ikke-glykosylert t-PA-mutein med domenesammensetningen K2P.

5

I dette eksemplet beskrives innvirkningen av urinstoff på oppløseligheten av K2P pro (fremstilling ifølge EP-A 0.382.174) i sitrat-buffrede oppløsninger ved pH 6,0. Som det fremgår av tabell 1 er K2P pro bare betinget oppløselig i 50 mmol/l sitratbuffer ved pH 6,0. Gjennom tilsetning av urinstoff kan oppløseligheten bli betraktelig forbedret. Optimum ligger ved omtrent 2 mol/l urinstoff.

10

Gjennomføring.

170 ml rensed K2P pro (oppløst i 0,5 mol/l arginin/H₃PO₄, pH 7,2) blir konsentrert gjennom ultrafiltrering over en Amicon YM 10-membran. 1 ml av konsentratet (aktivitet 5,8 MU/ml) blir dialysert mot den i tabell 1 oppførte bufferen. Etter sentrifugering av proben blir enzymaktiviteten bestemt i den klare supernatanten.

20

Den enzymatiske aktiviteten er angitt som volumaktivitet i MU/ml og som totalaktivitet i MU.

Måling av K2P-aktiviteten kan bestemmes på vanlig måte gjennom spaltning av et kromogent substrat (H. Lill, ZGIMAL 42 (1978), 478-486). Enheten U er en aktivitetsenhet for t-PA ifølge definisjonen til WHO, National Institute for Biological Standards and Control.

30

35

TABELL 1

Buffer	Aktivitet	
	MU/ml	MU
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 8 mol/l urinstoff	1,03	1,24
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 6 mol/l urinstoff	2,76	3,59
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 4 mol/l urinstoff	3,46	4,67
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 2 mol/l urinstoff	4,20	5,67
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 1 mol/l urinstoff	2,62	3,27
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0	0,32	0,93

EKSEMPEL 2

Innflytelse som forskjellige forbindelser har på oppløselig-
heten til K2P pro

I dette eksemplet blir innflytelsen av forskjellige forbindelser på oppløseligheten av K2P pro i sitrat-buffrete oppløsninger ved pH 6 beskrevet. Fremragende oppløselighet (> 2 MU/ml) ble oppnådd med taurin, askorbinsyre, lysin, EACA, traneksamsyre, dimetylbiquanid, glukosam, trehalose, N-metylglukam, uridin, cytidin, p-aminometylbenzosyre, fumarsyre og oksoglutarsyre. Videre fremkommer det at sitratbufferen ved lik molar konsentrasjon bevirker en bedre oppløselighet av t-PA-derivatet enn en $\text{NH}_4\text{HCO}_3^-$, Tris- eller fosfatbuffer.

Gjennomføring:

Se eksempel 1.

Konsentrat:

Aktivitet: 5,8 MU/ml

5

TABELL 2

	Buffer	Aktivitet	
		MU/ml	MU
10	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 50 mmol/l ornitin	1,92	2,11
	50 mmol/l Na-sitrat/NaOH, pH 6,0 0,3 mol/l taurin	2,67	4,00
	50 mmol/l Na-sitrat/NaOH, pH 6,0 0,3 mol/l askorbinsyre	4,00	4,20
15	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 10 mmol/l EACA	3,88	5,80
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 10 mmol/l L-lysin	2,46	3,32
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 10 mmol/l traneksamsyre	5,54	7,36
20	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 0,3 mol/l dimetylbiguanid	2,96	3,40
	50 mmol/l Tris/HCl, pH 7,2	0,04	0,06
	50 mmol/l NH ₄ HCO ₃	0,12	0,19
	50 mmol/l Na ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ , pH 7,2	0,15	0,23
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0	0,32	0,93
25	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 0,3 mol/l glukosamin	2,02	2,02
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 0,3 mol/l trehalose	3,52	3,17
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 0,1 mol/l tymidin	1,57	1,88
30	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 0,3 mol/l uridin	6,32	7,58
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 30 mmol/l cytosin	3,8	4,94
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 10 mmol/l p-aminometylbenzosyre	3,46	5,03
35	50 mmol/l Na-sitrat/NaOH, pH 6 0,3 mol/l eplesyre	1,53	1,68

forts.:

tabell 2 (forts.)

Buffer	Aktivitet	
	MU/ml	MU
50 mmol/l Na-sitrat/NaOH, pH 6 0,3 mol/l melkesyre	1,59	1,98
50 mmol/l Na-sitrat/NaOH, pH 6 0,3 mol/l fumarsyre	4,32	5,16
50 mmol/l Na-sitrat/NaOH, pH 6 0,3 mol/l 2-oksoglutarsyre	4,24	4,66
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 0,3 mol/l N-metylglukamin	3,36	3,70

EKSEMPEL 3

Innvirkning av ϵ -aminokapronsyre (EACA) på oppløseligheten til K2P pro

Gjennomføring:

Se eksempel 1

Konsentrat:

Aktivitet: 6,3 MU/ml

TABELL 3

Buffer	Aktivitet	
	MU/ml	MU
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0	0,34	0,48
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 10 mmol/l EACA	3,81	4,57
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 5 mmol/l EACA	3,52	4,86
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 1 mmol/l EACA	2,70	3,83
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0 0,1 mmol/l EACA	0,58	0,75

Tabell 3 viser at EACA allerede i en konsentrasjon på 1-10 mmol/l (10-40 ganger molart overskudd sammenlignet med K2P pro) bevirker en betydelig forbedring av oppløseligheten i sitrat-buffrete oppløsninger ved pH 6,0.

5

EKSEMPEL 4

Innvirkning av askorbinsyre på oppløseligheten av K2P pro

10

Gjennomføring:

Se eksempel 1

Konsentrat:

15

Aktivitet: 6,3 MU/ml

TABELL 4

20

Buffer	Aktivitet	
	MU/ml	MU
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6,0	0,34	0,48
50 mmol/l Na-sitrat/NaOH, pH 6,0 0,3 mol/l askorbinsyre	4,04	4,24
50 mmol/l Na-sitrat/NaOH, pH 6,0 0,2 mol/l askorbinsyre	2,40	2,93

25

30

Resultatene i tabell 4 viser at i sitrat-buffrete oppløsninger blir oppløseligheten til K2P pro ytterligere forhøyet gjennom tilsetning av askorbinsyre.

35

EKSEMPEL 5

pH-avhengigheten av stabiliteten til K2P pro i argininholdige oppløsninger

5 Renset K2P pro blir dialysert mot 0,5 mol/l Arg/H₃PO₄-bufferen oppført i tabell 5, og porsjonsvis lagret ved -20, 25 og 37°C. Etter 3, 7, 14 og 21 dager blir hver gang en probe testet med hensyn på aktivitet og stimulerbarhet gjennom tilsetning av fibrin og analysert SDS-elektroforetisk

10 (utgangsverdier: aktivitet; 1,3 MU/ml, stimulerbarhet: 28). De i tabell 5 sammenfattede dataene viser at probene lagret ved pH 8 og pH 7,2 oppviser etter 3 hhv. 7 dagers lagring ved 37°C en tydelig forhøyning av aktiviteten under samtidig reduksjon av stimulerbarheten. Ved 25°C kommer det, til tross

15 for tidsmessig forsinket, likeledes til en økning av aktiviteten og reduksjon av stimulerbarheten. Etter 14 til 21 dager blir også en reduksjon av aktiviteten oppdaget.

TABELL 5

Tid	Aktivitet (MU/ml) /stimulerbarhet		
	-20 °C	25°C	37°C
pH 8,0			
3 dager	1,22/36	1,47/24	1,45/15
7 dager	1,23/44	1,84/15	2,38/13
25 14 dager	1,37/33	2,08/9	1,1/10
21 dager	1,37/-	2,14/10	1,0/7
pH 7,2			
3 dager	1,12/39	1,5/27	1,7/20
7 dager	1,16&45	1,7/21	2,1/13
14 dager	1,38/32	1,7/9	1,9/9
21 dager	1,22/25	1,7/11	1,52/8
pH 6,0			
3 dager	0,93/34	1,43/31	1,54/34
7 dager	1,05/46	1,27/42	1,58/36
14 dager	1,23/39	1,04/20	1,45/14
21 dager	1,43/26	0,95/16	1,00/8
pH 5,5			
35 3 dager	0,85/32	1,47/40	1,08(39
7 dager	1,4/47	1,53/68	1,54/48
14 dager	1,2/32	1,3/26	1,3/24
21 dager	1,36/26	0,95/25	0,95/21

Parallelt med disse endringene blir en reduksjon av molekylvekten til K2P pro (elektroforese med SDA-PAGE) oppdaget.

5

EKSEMPEL 6

Innvirkningen av klorid- og fosfationer på stabiliteten til K2P pro i arginin (Arg)-holdige oppløsninger

10

Renset K2P pro blir dialysert mot nedenfor oppførte argininholdige buffere og lagret fordelt ved -20, 25 og 37°C. Etter 2, 7 og 14 dager blir hver gang en probe analysert SDS-elektroforetisk. Det viser seg at i nærvær av kloridioner er den enkjedete formen vesentlig mer stabil enn i nærvær av fosfationer. Mens i kloridionholdige oppløsninger etter 7 dagers lagring ved 37°C ved pH 7,2 og 8 blir bare 10% til 20% av proben spaltet, utgjør i de fosfatbuffrete oppløsninger andelen av spaltete materialer 60% til 90%.

20

Buffer:

0,5 mol/l Arg/H₃PO₄, pH 8,0

0,5 mol/l Arg/HCl, pH 8,0

0,5 mol/l Arg/H₃PO₄, pH 7,2

25

0,5 mol/l Arg/HCl, pH 7,2

EKSEMPEL 7

30

Innvirkning av E-aminokapronsyre på oppløseligheten av K2P pro i sitrat- og fosfatbuffrete oppløsninger.

35

Renset K2P pro blir konsentrert gjennom ultrafiltrering på 4,2 MU/ml og dialysert mot bufferen angitt i tabell 8 og sentrifugert. Etter sentrifugering av proben blir aktiviteten målt i den klare supernatanten.

TABELL 6

5	Buffer	Aktivitet	
		MU/ml	MU
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6	0,32	0,93
	50 mmol/l Na ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ , pH 6	0,07	0,10
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 2 mmol/l EACA	3,30	4,60
10	50 mmol/l Na ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ , pH 6 2 mmol/l EACA	0,90	1,39
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 2 mmol/l EACA 0,15 mol/l NaCl	2,43	3,52
15	50 mmol/l Na ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ , pH 6 2 mmol/l EACA 0,15 mol/l NaCl	1,08	1,57

Tabell 6 viser at forbedringen i oppløselighet gjennom EACA i sitrat-buffrete oppløsninger er vesentlig bedre enn i fosfatbuffere.

20

EKSEMPEL 8

Innvirkning av traneksamsyre (TES) på oppløseligheten på K2P
25 pro

Gjennomføring:

Se eksempel 1

30

Konsentrat:

Aktivitet: 4,2 MU/ml

35

TABELL 7

Buffer	Aktivitet	
	MU/ml	MU
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 10 mmol/l TES	2,66	3,60
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 5 mmol/l TES	2,54	3,30
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 1 mmol/l TES	2,35	3,29

Resultatene viser at det er mulig med traneksamsyre (TES)¹⁾ å oppnå en lignende oppløselighet av K2P pro som med EACA.

1) trans-4-aminometylcykloheksankarboksylysye

EKSEMPEL 9

Innvirkning av ω -aminokarboksylysyrer på oppløseligheten til K2P pro

Gjennomføring:

Se eksempel 1

Konsentrat:

Aktivitet: 4,2 MU/ml

TABELL 8

	Buffer	Aktivitet	
		MU/ml	MU
5	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6	0,32	0,93
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 10 mmol/l 8-aminooktansyre	3,12	4,05
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 10 mmol/l 7-aminoheptansyre	3,54	4,42
10	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 10 mmol/l EACA	4,22	2,90
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 10 mmol/l δ -aminovalerinsyre	1,83	2,47

15 EKSEMPEL 10

Innvirkning av guanidinanaloger på oppløseligheten til K2P
pro

20 Gjennomføring:

Se eksempel 1

Konsentrat:

Aktivitet: 4,2 MU/ml

25

TABELL 9

	Buffer	Aktivitet	
		MU/ml	MU
30	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 50 mmol/l arginin	1,42	2,06
35	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 50 mmol/l guanidinsmørsyre	2,21	3,08

Resultatene viser at med en guanidinogruppe blir oppløselig-
heten av K2P pro tydelig forbedret.

5

EKEMPEL 11

Innvirkning av EDTA på oppløselighetsforholdet til K2P pro

10

Gjennomføring:

Se eksempel 1

Konsentrat:

Aktivitet: 4,2 MU/ml

15

TABELL 10

20

Buffer

Aktivitet

	MU/ml	MU
10 mmol/l EDTA/NaOH, pH 6	0,02	0,03
0,3 mol/l EDTA/NaCH, pH 6	1,95	1,95
50 mmol/l Na-sitrat/NaOH, pH 6	1,80	2,25
50 mmol/l EDTA		
50 mmol/l Na-sitrat/NaOH, pH 6	3,36	4,03
100 mmol/l EDTA		
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6	0,32	0,93

25

30

Tabell 10 viser at kombinasjonen av EDTA med sitrat har en
mer enn additiv effekt på oppløseligheten til K2P pro.

EKSEMPEL 12

35

Innvirkning av aminosyrer alene eller i kombinasjon på
oppløseligheten til K2P pro

Giennomføring:

Se eksempel 1

Konsentrat:

5 Aktivitet: 4,2 MU/ml

TABELL 11

10	Buffer	Aktivitet	
		MU/ml	MU
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 50 mmol/l arginin	1,42	2,06
15	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 10 mmol/l L-lysin	2,81	3,94
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 1 mmol/l L-lysin	2,00	2,6
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 10 mmol/l L-lysin 10 mmol/l arginin	2,56	3,84
20	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 10 mmol/l lysin 50 mmol/l arginin	3,27	4,9
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 10 mmol/l lysin 10 mmol/l arginin 10 mmol/l ornitin	3,18	4,13
25	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 10 mmol/l lysin 50 mmol/l arginin 10 mmol/l orinitin	2,70	3,78
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 10 mmol/l lysin	3,34	4,30
30	50 mmol/l arginin 50 mmol/l ornitin		

35

EKSEMPEL 13

Innvirkning av ω -aminoalkoholer på oppløseligheten på K2P pro

Gjennomføring:

5 Se eksempel 1

Konsentrat:

Aktivitet: 4,9 MU/ml

10

TABELL 12

Buffer	Aktivitet	
	MU/ml	MU
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 50 mmol/l 4-aminobutanol-1	1,84	2,4
50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 50 mmol/l 5-aminopentanol-1	2,54	3,55

20

EKSEMPEL 14

25 Innvirkning av forskjellige forbindelser i kombinasjon på
oppløseligheten på K2P pro

Gjennomføring:

Se eksempel 1

30

Konsentrat:

Aktivitet: 5,5 MU/ml

35

TABELL 13

	Buffer	Aktivitet	
		MU/ml	MU
5	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6, 50 mmol/l EDTA 1 mmol/l EACA 50 mmol/l glukosamin	4,24	5,08 pH
	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 10 mmol/l EDTA 1 mmol/l EACA 10 mmol/l glukosamin	3,63	5,08
10	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 10 mmol/l EDTA 1 mmol/l EACA 10 mmol/l glukosamin 50 mmol/l tymidin	3,70	5,14
15	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 50 mmol/l EDTA 1 mmol/l lysin 50 mmol/l glukosamin	4,00	5,40
	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 50 mmol/l EDTA 1 mmol/l lysin 10 mmol/l glukosamin	3,04	3,95
20	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 10 mmol/l EDTA 1 mmol/l lysin 10 mmol/l glukosamin 10 mmol/l tymidin	3,12	4,52
25	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 10 mmol/l EDTA 1 mmol/l lysin 10 mmol/l arginin 10 mmol/l glukosamin 10 mmol/l tymidin	2,60	3,77
30	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 10 mmol/l EDTA 1 mmol/l lysin 25 mmol/l arginin 10 mmol/l glukosamin 10 mmol/l tymidin	2,94	4,12

forts.:

tabell 13 (forts.:)

	Buffer	Aktivitet	
		MU/ml	MU
5	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 1 mmol/l lysin 10 mmol/l arginin 10 mmol/l glukosamin 10 mmol/l tymidin	2,80	3,64
10	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 10 mmol/l EDTA 1 mmol/l lysin 25 mmol/l arginin 10 mmol/l glukosamin 25 mmol/l tymidin	3,20	4,32
15	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 10 mmol/l EDTA 1 mmol/l lysin 25 mmol/l arginin 10 mmol/l glukosamin 50 mmol/l tymidin	4,56	5,90
20	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 1 mmol/l lysin 25 mmol/l arginin 10 mmol/l glukosamin 50 mmol/l tymidin	3,24	4,54
25	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 1 mmol/l lysin 25 mmol/l arginin 10 mmol/l glukosamin 25 mmol/l tymidin	3,54	4,95
30	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 1 mmol/l lysin 25 mmol/l arginin 50 mmol/l glukosamin 25 mmol/l tymidin	3,60	4,68
35	50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 1 mmol/l lysin 25 mmol/l arginin 100 mmol/l glukosamin 25 mmol/l tymidin	5,85	5,85

EKSEMPEL 15

Innvirkning av α,ω -diaminer på oppløseligheten på K2P pro

5 Gjennomføring:

Se eksempel 1

Konsentrat:

Aktivitet: 4,9 MU/ml

10

TABELL 14

15	Buffer	Aktivitet	
		MU/ml	MU
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 50 mmol/l, 1,9-diaminonan	3,12	4,05
20	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 50 mmol/l 1,8-diaminooktan	2,80	3,64
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 50 mmol/l 1,6-diaminoheksan	3,42	4,45
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 50 mmol/l, 1,5-diaminopentan	3,52	4,40
25	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 50 mmol/l 1,4-diaminobutan	3,96	5,15
	50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 50 mmol/l 1,3-diaminopropan	3,33	4,23

30

35

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat av et ikke-glykosylert t-PA-derivat som består av kringle-2 domenen og proteasedomenen og begynner med en av aminosyrene 174-180 og som slutter med aminosyren 527 og som videre kan inneholde aminosyrene -3(Gly) til +5(Ile) hele eller deler av
 10 (K2P pro) med en enzymatisk aktivitet på minst 1,4 MU/ml og en pH-verdi på 4,5 til 6,5, k a r a k t e r i s e r t v e d at man omdanner t-PA derivatet, sammen med sitrat og minst en forbindelse fra gruppen bestående av

a) askorbinsyre,

15 b) EDTA,

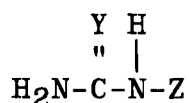
c) aminoforbindelser med formelelen



20 der

X = SO₃H, CH(NH₂)-CO₂H, CO₂H, H, NH₂ eller OH,R = C₁-C₉-alkylen, fortrinnsvis C₄-C₇-alkylen, C₃C₆-cykloalkylen eller benzytiden og R¹ og R², er uavhengig av hverandre H eller C₁-C₃-alkyl,

25 d) guanidinanalogue forbindelser med formel

der Y = H₂N⁺ eller O,30 Z = H eller (CH₂)_m V, (CH₂)_mCH(NH₂)-CO₂H,
CH(CO₂H)-(CH₂)_mCO₂HV = NH₂ eller CO₂H og

m = 1 til 4

35 e) karboksylsyrer substituert med en eller flere hydroksyl-, keto- og/eller ytterligere karboksylgrupper,

f) dimetylbiguanid,

g) pyrimidinnukleosider og pyrimidinnukleotider,

h) trehalose, glukosamin, N-metylglukamin, til en egnet farmasøytisk administreringsform, fortrinnsvis en injeksjonsoppløsning eller et lyofilisat; eventuelt sammen med vanlige farmasøytiske tilsetnings-,
5 hjelpe- og/eller bærerstoffer.

2.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
10 aminoforbindelsen er taurin, ϵ -aminokapronsyre, traneksamsyre, lysin, ornitin, δ -aminolvaleriansyre, p-aminometylbenzosyre, 4-aminobutanol-1, 5-aminopentanol-1, 6-aminoheksanol-1, 1,9-diaminononan, 1,8-diaminooktan,
15 1,7-diaminoheptan, 1,6-diaminoheksan, 1,5-diaminopentan, 1,4-diaminobutan, 1,3-diaminopropan, 8-aminooktansyre eller/og 7-aminoheptansyre.

20 3.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n g u a n i d i n - a n a l o g e f o r b i n d e l s e n e r u r i n s t o f f , g u a n i d i n o s m ø r s y r e e l l e r / o g a r g i n i n .

25

4.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n s u b s t i t u e r t e k a r b o k s y l s y r e n e r e p l e s y r e , m e l k e s y r e , f u m a r s y r e
30 eller/og 2-oksoglutarsyre.

5.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e t i
35 tillegg inneholder en eller flere α -aminokarboksylysyre, fortrinnsvis histidin.

6.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge et av kravene 1 til 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av sitrat utgjør 5 til 100 mmol/l, fortrinnsvis 50 mmol/l.

7.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge et av kravene 1 til 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at det i tillegg inneholder kloridioner.

8.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder 50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 og 0,1 til 1 mol/l, fortrinnsvis 0,2 til 0,3 mol/l askorbinsyre.

9.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder 50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 og 1 til 200 mmol/l, fortrinnsvis 10 til 100 mmol/l EDTA.

10.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder 50 mmol/l Na-sitrat, pH 6, og 0,1 til 0,5 mol/l, fortrinnsvis 0,1 til 0,3 mol/l taurin.

11.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder 50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6, og 0,5 til 20 mmol/l, fortrinnsvis 1 til 10 mmol/l ϵ -aminokapronsyre, α -aminovaleriansyre, lysin, ornitin, traneksamsyre, p-amino-metylbenzosyre, 7-aminoheptansyre eller 8-aminooktansyre.

12.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, karakterisert ved at det inneholder 50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 og 10 til 100 mmol/l 4-aminobutanol-1, 5-aminopentanol-1, 6-aminoheksanol-1, 1,9-diaminononan, 1,8-diaminooktan, 1,7-diaminoheptan, 1,6-diaminoheksan, 1,5-diaminopentan, 1,4-diaminobutan eller 1,3-diaminopropan.

13.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, karakterisert ved at det inneholder 50 mmol/l Na-sitrat/HCl, Ph 6 og 0,1 til 4 mol/l, fortrinnsvis 0,5 til 2 mol/l urinstoff.

14.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, karakterisert ved at det inneholder 50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6, 10 til 200 mmol/l, fortrinnsvis 50 til 100 mmol/l guanidinosmørsyre eller arginin.

15.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, karakterisert ved at det inneholder 50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 og 0,001 til 1 mol/l, fortrinnsvis 0,01 til 0,5 mol/l eplesyre, melkesyre, fumarsyre eller 2-oksoglutarsyre.

16.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, karakterisert ved at det inneholder 50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6 og 50 til 400 mmol/l, fortrinnsvis 100 til 300 mmol/l dimetylbiganid.

17.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder 50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6, 1 til 300 mmol/l, fortrinnsvis 10 til 300 mmol/l tymidin, cytosin eller uridin.

5

18.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder 50 mmol/l Na-sitrat/HCl, pH 6, og 1 til 500 mmol/l, fortrinnsvis 10 til 300 mmol/l trehalose, glukosamin eller N-metylglukamin.

10

19.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder 50 mmol/l Na-sitrat, pH 6 og en kombinasjon av forbindelser fra gruppen a) til h) ifølge krav 1.

15

20

25

30

35