



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 35 260 T2** 2007.10.18

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 154 796 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 35 260.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/40068**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 907 322.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/048635**

(86) PCT-Anmeldetag: **22.02.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **24.08.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.11.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **20.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 47/10** (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

255279 **22.02.1999** **US**

452752 **01.12.1999** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

**The University of Connecticut, Farmington, Conn.,
US; Baxter International Inc., Deerfield, Ill., US**

(72) Erfinder:

**BESMAN, Marc, Studio City, CA 91604, US;
BJORNSON, Erik, Studio City, CA 91604, US;
JAMEEL, Feroz, Covina, CA 91722, US; KASHI,
Ramesh, Walnut, CA 91798, US; PIKAL, Michael,
Mansfield Center, CT 06250, US; TCHESSALOV,
Serguei, Storrs, CT 06269-2092, US; CARPENTER,
John, Littleton, CO 80127, US**

(74) Vertreter:

**Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European
Patent Attorneys, 81671 München**

(54) Bezeichnung: **NEUE ALBUMINFREIE FAKTOR VIII FORMULIERUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Faktor VIII ist ein Protein, das im Blutplasma gefunden wird, welches als ein Co-Faktor in der Reaktionskaskade wirkt, die zur Blutgerinnung führt. Ein Mangel in der Menge der Faktor VIII-Aktivität im Blut führt zu der Gerinnungsstörung, die als Hämophilie A bekannt ist, einem ererbten Zustand, der hauptsächlich Männer betrifft. Hämophilie A wird zur Zeit mit therapeutischen Präparaten von Faktor VIII behandelt, die von menschlichem Plasma abgeleitet oder unter Verwendung rekombinanter DNA-Technologie hergestellt wurden. Solche Präparate werden entweder als Antwort auf eine Blutungsepisode (Bedarfstherapie) oder in häufigen, regelmäßigen Intervallen verabreicht, um unkontrollierte Blutungen zu verhindern (Prophylaxe).

[0002] Faktor VIII ist bekannt, in therapeutischen Präparaten relativ instabil zu sein. Im Blutplasma wird Faktor VIII normalerweise mit einem anderen Plasmaprotein, dem von Willebrand-Faktor (vWF), komplexgebunden, welcher im Plasma in einem großen molaren Überschuss zu Faktor VIII vorliegt und von dem angenommen wird, dass er den Faktor VIII vor vorzeitigem Abbau schützt. Ein anderes zirkulierendes Plasmaprotein, Albumin, kann ebenfalls eine Rolle beim Stabilisieren von Faktor VIII in vivo spielen. Zur Zeit vermarktete Faktor VIII-Präparate beruhen daher hauptsächlich auf der Verwendung von Albumin und/oder vWF, um den Faktor VIII während des Herstellungsverfahrens und während der Lagerung zu stabilisieren.

[0003] Das Albumin und der vWF, die in zur Zeit vermarkteten Faktor VIII-Präparaten verwendet werden, werden aus menschlichem Blutplasma abgeleitet, jedoch weist die Verwendung eines solchen Materials bestimmte Nachteile auf. Da im Allgemeinen ein großer molarer Überschuss an Albumin verglichen zum Faktor VIII hinzugefügt wird, um die Stabilität des Faktor VIII in solchen Präparaten zu steigern, ist es schwierig, das Faktor VIII-Protein selbst in diesen Präparaten zu charakterisieren. Das Hinzufügen von vom Menschen abgeleitetem Albumin zu Faktor VIII wird ebenfalls als ein Nachteil in Bezug auf rekombinant hergestellte Faktor VIII-Präparate wahrgenommen. Dies liegt daran, dass rekombinant abgeleitete Faktor VIII-Präparate in der Abwesenheit von derart hinzugefügtem Albumin sonst keine vom Menschen abgeleiteten Proteine enthalten würden, und das theoretische Risiko der Übertragung eines Virus würde reduziert werden.

[0004] Es wurden mehrere Versuche beschrieben, Faktor VIII ohne Albumin oder vWF (oder mit relativ geringen Mengen dieser Bindemittel) zu formulieren. Zum Beispiel beschreibt das U.S. Patent Nr. 5,565,427 (EP 508 194) an Freudenberg (übertragen auf Behringwerke), Faktor VIII-Präparate, die bestimmte Kombinationen von Detergenzien und Aminosäuren, insbesondere Arginin und Glycin, zusätzlich zu Bindemitteln, wie Natriumchlorid und Sucrose, enthalten. Das Detergens, Polysorbat 20 oder Polysorbat 80, wird beschrieben, in Mengen zwischen 0,001 bis 0,5 Vol.-% vorzuliegen, während Arginin und Glycin in Mengen zwischen 0,01 bis 1 mol/l vorliegen. Sucrose wird beschrieben, in Mengen zwischen 0,1 und 10 % vorzuliegen. Beispiel 2 dieses Patents stellt fest, dass Lösungen von (1) 0,75 % Sucrose, 0,4 M Glycin und 0,15 M NaCl und (2) 0,01 M Natriumcitrat, 0,08 M Glycin, 0,016 M Lysin, 0,0025 M Calciumchlorid und 0,4 M Natriumchlorid in Lösung über 16 Stunden nicht stabil waren, wobei Lösungen von (3) 1 % Sucrose, 0,14 M Arginin, 0,1 M Natriumchlorid und (4) 1 % Sucrose, 0,4 M Glycin, 0,14 M Arginin, 0,1 M Natriumchlorid und 0,05 % Tween 80 Stabilität aufwiesen.

[0005] Das U.S. Patent Nr. 5,763,401 (EP 818 204) an Nayer (übertragen auf Bayer), beschreibt ebenfalls eine therapeutische Faktor VIII-Formulierung ohne Albumin, die 15–60 mM Sucrose, bis zu 50 mM NaCl, bis zu 5 mM Calciumchlorid, 65–400 mM Glycin und bis zu 50 mM Histidin umfasst. Die folgenden spezifischen Formulierungen wurden als stabil identifiziert: (1) 150 mM NaCl, 2,5 mM Calciumchlorid und 165 mM Mannitol; und (2) 1 % Sucrose, 30 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Calciumchlorid, 20 mM Histidin und 290 mM Glycin. Für eine Formulierung, die höhere Mengen Zucker enthielt (10 % Maltose, 50 mM NaCl, 2,5 mM Calciumchlorid und 5 mM Histidin) wurde gefunden, dass sie verglichen mit Formulierung (2) im lyophilisierten Zustand geringe Stabilität aufwies.

[0006] Das U.S. Patent Nr. 5,733,873 (EP 627 924) an Osterberg (übertragen auf Pharmacia & Upjohn), offenbart Formulierungen, die zwischen 0,01–1 mg/ml eines grenzflächenaktiven Mittels einschließen. Dieses Patent offenbart Formulierungen, die die folgenden Bereiche an Bindemitteln aufweisen: Polysorbat 20 oder 80 in einer Menge von mindestens 0,01 mg/ml, vorzugsweise 0,02–1,0 mg/ml, mindestens 0,1 M NaCl, mindestens 0,5 mM Calciumsalz und mindestens 1 mM Histidin. Insbesondere werden die folgenden spezifischen Formulierungen offenbart: (1) 14,7–50–65 mM Histidin, 0,31–0,6 M NaCl, 4 mM Calciumchlorid, 0,001–0,02–0,025 % Polysorbat 80, mit oder ohne 0,1 % PEG 4000 oder 19,9 mM Sucrose und (2) 20 mg/ml Mannitol, 2,67 mg/ml Histidin, 18 mg/ml NaCl, 3,7 mM Calciumchlorid und 0,23 mg/ml Polysorbat 80.

[0007] Andere Versuche, niedrige oder hohe Konzentrationen Natriumchlorid zu verwenden, wurden ebenfalls beschrieben. Das U.S. Patent Nr. 4,877,608 (EP 315 968) an Lee (übertragen auf Rhone-Poulenc Rorer),

lehrt Formulierungen mit relativ niedrigen Natriumchlorid Konzentrationen, nämlich Formulierungen, die 0,5 mM–15 mM NaCl, 5 mM Calciumchlorid, 0,2 mM–5 mM Histidin, 0,01–10 mM Lysinhydrochlorid und bis zu 10 % Zucker umfassen. Der "Zucker" kann bis zu 10 Maltose, 10 % Sucrose oder 5 % Mannitol betragen.

[0008] Das U.S. Patent 5,605,884 (EP 0 314 095) an Lee (übertragen auf Rhone-Poulenc Rorer), lehrt die Verwendung von Formulierungen mit relativ hohen Natriumchlorid Konzentrationen. Diese Formulierungen schließen 0,35 M–1,2 M NaCl, 1,5–40 mM Calciumchlorid, 1 mM–50 mM Histidin und bis zu 10 % eines "Zuckers", wie Mannitol, Sucrose oder Maltose ein. Eine Formulierung, die 0,45 M NaCl, 2,3 mM Calciumchlorid und 1,4 mM Histidin umfasst, wird beispielhaft erläutert.

[0009] Die internationale Patentanmeldung WO 96/22107 an Roser (übertragen auf Quadrant Holdings Cambridge Limited), beschreibt Formulierungen, die den Zucker Trehalose einschließen. Diese Formulierungen umfassen: (1) 0,1 M NaCl, 15 mM Calciumchlorid, 15 mM Histidin und 1,27 M (48 %) Trehalose oder (2) 0,011 % Calciumchlorid, 0,12 % Histidin, 0,002 % Tris, 0,002 % Tween 80, 0,004 % PEG 3350, 7,5 % Trehalose und entweder 0,13 % oder 1,03 % NaCl.

[0010] Andere therapeutische Faktor VIII-Formulierungen des Standes der Technik schließen im Allgemeinen Albumin und/oder vWF für den Zweck des Stabilisierens des Faktor VIII ein und sind daher nicht relevant für die vorliegende Erfindung. Zum Beispiel beschreibt das U.S. Patent Nr. 5,328,694 (EP 511 234), an Schwinn (übertragen auf Octapharma AG), eine Formulierung, die 100–650 mM Disaccharid und 100 mM–1,0 M Aminosäure einschließt. Die folgenden Formulierungen werden spezifisch offenbart: (1) 0,9 M Sucrose, 0,25 M Glycin, 0,25 M Lysin und 3 mM Calciumchlorid und (2) 0,7 M Sucrose, 0,5 M Glycin und 5 mM Calciumchlorid.

[0011] Obwohl mehrere Versuche unternommen wurden, Faktor VIII ohne Albumin oder vWF zu formulieren, bleibt ein Bedarf für therapeutische Faktor VIII-Formulierungen bestehen, welche in der Abwesenheit von Albumin oder anderen Proteinen stabil sind.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft therapeutische Faktor VIII-Zusammensetzungen, die in der Abwesenheit von Albumin stabil sind. Insbesondere umfasst die vorliegende Erfindung eine Faktor VIII-Zusammensetzung, umfassend zusätzlich zu Faktor VIII: 4 % bis 10 % eines Füllmittels, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Mannitol, Glycin und Alanin; 1 % bis 4 % eines Stabilisierungsmittels, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Sucrose, Trehalose, Raffinose, Arginin; 1 mM bis 5 mM Calciumsalz; 100 mM bis 300 mM NaCl und ein Puffermittel zum Beibehalten eines pH-Werts von ungefähr zwischen 6 und 8. Diese Zusammensetzung kann zusätzlich ein grenzflächenaktives Mittel, wie Polysorbat 20, Polysorbat 80, Pluronic F68 oder Brij 35 umfassen. Wenn das grenzflächenaktive Mittel Polysorbat 80 ist, sollte es in einer Menge von weniger als 0,1 % vorliegen.

[0013] Der Puffer der erfindungsgemäßen Faktor VIII-Zusammensetzungen liegt vorzugsweise in einer Konzentration von 10 mM bis 50 mM vor und ist vorzugsweise aus der Gruppe, bestehend aus Histidin, Tris, BIS-Tris-Propan, PIPES, MOPS, HEPES, MES und ACES ausgewählt. Vorteilhafterweise ist das Puffermittel entweder Histidin oder Tris. Die erfindungsgemäße Faktor VIII-Zusammensetzung kann weiterhin ein Antioxidans umfassen.

[0014] Die erfindungsgemäßen Faktor VIII-Zusammensetzungen schließen sowohl ein Füllmittel als auch ein Stabilisierungsmittel ein. Das Füllmittel kann in einer Menge von ungefähr 6 % bis ungefähr 8 %, vorzugsweise von ungefähr 8 % vorliegen. Das Stabilisierungsmittel liegt vorzugsweise in einer Menge von ungefähr 2 % vor. Natriumchlorid liegt ebenfalls in diesen Zusammensetzungen vor, vorzugsweise in einer Menge von 150 bis 250 mM und weiter bevorzugt in einer Menge von ungefähr 225 mM. Das Calciumsalz der Zusammensetzung ist ebenfalls vorzugsweise Calciumchlorid, und die Zusammensetzung selber liegt vorzugsweise in lyophilisierter Form vor.

[0015] Ebenfalls offenbart wird eine Faktor VIII-Zusammensetzung, die ohne das Hinzufügen von Albumin formuliert ist, welche die folgenden Bindemittel zusätzlich zu Faktor VIII einschließt: 2 % bis 6 % Hydroxyethylstärke, 1 % bis 4 % eines Stabilisierungsmittels, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Sucrose, Trehalose, Raffinose, Arginin; 1 mM bis 5 mM Calciumsalz; 100 mM bis 300 mM NaCl und ein Puffermittel zum Beibehalten eines pH-Werts von ungefähr zwischen 6 und 8. Vorzugsweise umfasst so eine Zusammensetzung ungefähr 4 % Hydroxyethylstärke, und das NaCl liegt in einer Menge von 200 mM vor. Das Stabilisierungsmittel liegt ebenfalls vorzugsweise in einer Menge von ungefähr 2 % vor.

[0016] Ebenfalls offenbart wird eine Faktor VIII-Zusammensetzung, die ohne Albumin formuliert ist, umfassend: 300 mM bis 500 mM NaCl; 1 % bis 4 % eines Stabilisierungsmittels, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Sucrose, Trehalose, Raffinose, Arginin; 1 mM bis 5 mM Calciumsalz und ein Puffermittel zum Beibehalten eines pH-Werts von ungefähr zwischen 6 und 8. Vorzugsweise liegt das NaCl in einer Konzentration von ungefähr 400 mM vor.

[0017] Ebenfalls offenbart wird ein Verfahren zum Lyophilisieren einer wässrigen Faktor VIII-Zusammensetzung in einem Behälter unter Verwendung eines Lyophilisierers, wobei das Verfahren einen anfänglichen Gefrierschritt umfasst und der anfängliche Gefrierschritt weiterhin die Schritte des: (a) Absenkens der Temperatur der Lyophilisiererkammer auf mindestens ungefähr -45°C ; (b) Anhebens der Temperatur der Kammer auf zwischen ungefähr -15°C und -25°C und danach des (c) Absenkens der Temperatur der Kammer auf mindestens ungefähr -45°C umfasst. In diesem Verfahren wird die Temperatur der Kammer vorzugsweise mit einer Geschwindigkeit zwischen ungefähr $0,5^{\circ}\text{C}$ und ungefähr $1,0^{\circ}\text{C}$ pro Minute abgesenkt oder angehoben. In Schritt (a) wird die Temperatur vorzugsweise für ungefähr 1 Stunde beibehalten und wird auf ungefähr -55°C abgesenkt. In Schritt (b) wird die Temperatur vorzugsweise zwischen -15°C und -25°C für zwischen 1 und 3 Stunden beibehalten und beträgt weiter bevorzugt -22°C , und die Temperatur in Schritt (c) wird vorzugsweise für ungefähr 1 Stunde beibehalten. Die Faktor VIII-Zusammensetzung, die in diesem Verfahren verwendet wird, umfasst vorzugsweise zwischen 4 % und 10 % eines Mittels, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Mannitol, Glycin und Alanin und umfasst ebenfalls vorzugsweise zwischen 1 und 4 % eines Mittels, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Sucrose, Trehalose, Raffinose und Arginin. Zusätzlich umfasst die Faktor VIII-Zusammensetzung, die in diesem Verfahren verwendet wird, ebenfalls vorzugsweise zwischen 100 mM und 300 mM NaCl.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Definitionen

[0018] So wie hier verwendet, sollen die unten aufgeführten Begriffe und Variationen davon wie folgt definiert sein, wenn nicht anders angegeben:

Faktor VIII – Das Faktor VIII-Molekül Kommt natürlich und in therapeutischen Präparaten als eine heterogene Verteilung von Polypeptiden vor, die aus einem einzelnen Genprodukt entstehen (siehe z.B. Andersson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2979–2983, Mai 1986). So wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Faktor VIII" alle solchen Polypeptide, ob von Blutplasma abgeleitet oder durch die Verwendung von rekombinanten DNA-Techniken hergestellt. Kommerziell erhältliche Beispiele therapeutischer Präparate, die Faktor VIII enthalten, schließen jene ein, die unter den Handelsnamen HEMOFIL M und RECOMBINATE (erhältlich von Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, Illinois, U.S.A.) verkauft werden. Andere Präparate, die sich zur Zeit in Entwicklung befinden, umfassen hauptsächlich eine einzelne Subpopulation von Faktor VIII-Molekülen, denen der Anteil der B-Domäne des Moleküls fehlt.

Internationale Einheit, IE – Eine internationale Einheit oder IE ist eine Maßeinheit für die Blutgerinnungsaktivität (Wirkung) von Faktor VIII, wie durch einen Standardassay gemessen, wie einem der Folgenden:

Einschrittassay. Einschrittassays sind im Stand der Technik bekannt, wie jener, der in Lee, Martin L., et al., An Effect of Predilution on Potency Assays of Faktor VIII Concentrates, Thrombosis Research (Pergamon Press Ltd.) 30, 511–519 (1983) beschrieben wird.

Chromogener Assay. Chromogene Assays können kommerziell erworben werden, wie der Coatest Faktor VIII, erhältlich von Chromogenix AB, Molndal, Schweden.

Anneal – Der Begriff Anneal soll verwendet werden, um einen Schritt im Lyophilisationsverfahren eines pharmazeutischen Präparats zu bezeichnen, der eine Lyophilisation vor dem Gefriertrocknen des Präparats durchläuft, in dem die Temperatur des Präparats von einer niedrigen Temperatur auf eine höhere Temperatur angehoben wird und nach einem Zeitraum anschließend wieder abgekühlt wird.

Füllmittel – Für die Zwecke dieser Anmeldung sind Füllmittel jene chemischen Gebilde, die dem "Kuchen" (engl.: "cake") oder der restlichen festen Masse eines pharmazeutischen Präparats Struktur verleihen, nachdem er/sie lyophilisiert wurde und welche/r ihn/sie gegen Kollabieren schützen. Ein kristallisierbares Füllmittel soll ein wie hier beschriebenes Füllmittel bedeuten, welches während der Lyophilisation kristallisiert werden kann, welches nicht Natriumchlorid ist. HES ist nicht in diese Gruppe kristallisierbarer Füllmittel eingeschlossen.

Gefriertrocknen, Gefrieren, Lyophilisieren – Wenn nicht durch den Zusammenhang, in dem es vorkommt, anders angegeben, soll "Gefriertrocknen" verwendet werden, um den Anteil eines Lyophilisationsverfahrens zu bezeichnen, in dem die Temperatur eines pharmazeutischen Präparats angehoben wird, um Wasser aus dem Präparat zu entfernen. Die "Gefrier"-Schritte eines Lyophilisationsverfahrens sind jene Schritte, die vor dem Gefriertrocknungsstadium stattfinden. Wenn nicht anders angegeben, soll "Lyophilisieren" das gesamte Verfahren der Lyophilisation bezeichnen, einschließlich sowohl der Gefrierschritte, als auch der Gefriertrocknungsschritte.

Wenn nicht anders angemerkt, bezeichnen Prozentangaben Gewicht pro Volumen Prozente, und Temperaturen sind in der Celsius Skala angegeben.

Formulierungsverbindungen

[0019] Die erfindungsgemäßen Faktor VIII-Zusammensetzungen schließen Füllmittel, Stabilisierungsmittel, Puffermittel, Natriumchlorid, Calciumsalze und vorteilhafterweise andere Bindemittel ein. Diese Bindemittel wurden ausgewählt, um die Stabilität des Faktor VIII in lyophilisierten Präparaten zu maximieren. Die erfindungsgemäßen Faktor VIII-Zusammensetzungen weisen jedoch ebenso im flüssigen Zustand Stabilität auf.

[0020] Die in den erfindungsgemäßen Formulierungen verwendeten Füllmittel, die den kristallinen Anteil des lyophilisierten Produkts bilden (außer im Fall von HES), werden aus der Gruppe, bestehend aus Mannitol, Glycin, Alanin und Hydroxyethylstärke (HES) ausgewählt. Mannitol, Glycin oder Alanin liegen in einer Menge von 4–10 %, vorzugsweise 6–9 % und weiter bevorzugt von ungefähr 8 % vor. Wenn HES als Füllmittel verwendet wird, liegt es in einer Menge von 2–6 %, vorzugsweise 3–5 % und weiter bevorzugt von ungefähr 4 % vor.

[0021] Die in den erfindungsgemäßen Formulierungen verwendeten Stabilisierungsmittel werden aus der Gruppe, bestehend aus Sucrose, Trehalose, Raffinose und Arginin, ausgewählt. Diese Mittel liegen in den erfindungsgemäßen Formulierungen in einer Menge zwischen 1–4 %, vorzugsweise 2–3 %, weiter bevorzugt ungefähr 2 vor. Sorbitol und Glycerin wurden als mögliche Stabilisatoren überprüft, aber stellten sich als schwache Stabilisatoren in den erfindungsgemäßen Formulierungen heraus.

[0022] Natriumchlorid ist in den erfindungsgemäßen Formulierungen in einer Menge von 100–300 mM, vorzugsweise 150–250 mM und am meisten bevorzugt ungefähr 225 mM eingeschlossen. Es wird offenbart, dass Natriumchlorid selbst ohne irgendeines der vorher erwähnten Füllmittel verwendet werden kann, in welchem Fall es in der Formulierung in einer Menge zwischen 300 mM und 500 mM NaCl, vorzugsweise 350 bis 450 mM NaCl und am meisten bevorzugt ungefähr 400 mM NaCl eingeschlossen sein würde.

[0023] Zusätzlich liegen in diesen Formulierungen Puffer vor, da angenommen wird, dass das Faktor VIII-Molekül durch pH-Wert Verschiebungen während der Lyophilisation ungünstig beeinflusst werden kann. Der pH-Wert sollte während der Lyophilisation vorzugsweise im Bereich zwischen 6 und 8 gehalten werden und weiter bevorzugt bei einem pH-Wert von ungefähr 7. Das Puffermittel kann jedes physiologisch verträgliche chemische Gebilde oder jede Kombination aus chemischen Gebilden sein, welche/s die Eigenschaft aufweist/en, als Puffer zu wirken, einschließlich Histidin, Tris, BIS-Tris-Propan, PIPES, MOPS, HEPES, MES und ACES. Die vollständigen chemischen Bezeichnungen dieser Puffermittel werden in Tabelle 1 unten aufgeführt. Typischerweise wird das Puffermittel in einer Konzentration von 10–50 mM eingeschlossen. Wenn Histidin zu den Formulierungen hinzugefügt wird, werden Konzentrationen von über 20 mM und vorzugsweise von ungefähr 25 mM verwendet, alleine oder in Kombination mit anderen Puffern wie Tris. Histidin wird insbesondere für die Verwendung in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen bevorzugt, wie detaillierter unten beschrieben wird.

Tabelle 1 - Puffermittel

Tris	tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
BIS-Tris-Propan	1,3-bis-[tris-(Hydroxymethyl)methylamino]propan
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
MOPS	3-(N-Morpholin)propansulfonsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
MES	2-(N-Morpholin)ethansulfonsäure
ACES	N-2-Acetamido-2-aminoethansulfonsäure

[0024] Um die Aktivität des Faktor VIII zu erhalten, ist es wichtig, dass die erfindungsgemäßen Formulierungen ebenfalls Calcium oder ein anderes divalentes Kation einschließen, welches in der Lage ist, mit Faktor VIII zu interagieren und seine Aktivität aufrecht zu erhalten, vermutlich durch Aufrechterhalten der Assoziation der schweren und leichten Ketten des Faktor VIII. Zwischen 1 mM und 5 mM eines Calciumsalzes können verwendet werden, weiter bevorzugt 3–4 mM und am meisten bevorzugt ungefähr 4 mM. Das Calciumsalz ist vorzugsweise Calciumchlorid, aber kann ebenfalls ein anderes Calciumsalz, wie Calciumgluconat, Calciumglubionat oder Calciumgluceptat, sein.

[0025] Die erfindungsgemäßen Faktor VIII-Zusammensetzungen schließen vorzugsweise ebenfalls ein grenzflächenaktives Mittel, vorzugsweise in einer Menge von 0,1 oder weniger und weiter bevorzugt in einer Menge von ungefähr 0,03 % ein. Das grenzflächenaktive Mittel kann zum Beispiel aus der Gruppe, bestehend aus Polysorbat 20, Polysorbat 80, Pluronic Polyolen und Brij 35 (Polyoxyethylen 23 Laurylether) ausgewählt werden. Verschiedene Sorten von Pluronic Polyolen sind erhältlich (verkauft unter dem Handelsnamen Pluronic, hergestellt durch die BASF Wyandotte Corporation). Diese Polyole mit unterschiedlichem Molekulargewicht (von 1.000 bis über 16.000) und physikochemischen Eigenschaften, wurden als grenzflächenaktive Mittel verwendet. Pluronic F-38 mit einem Molekulargewicht von 5.000 und Pluronic F-68, Molekulargewicht 9.000, enthalten beide 80 Gew.-% hydrophile Polyoxyethylengruppen und 20 Prozent hydrophobe Polyoxypropylengruppen. Tween-80, ein kommerzielles Polysorbat, wird jedoch in den erfindungsgemäßen Formulierungen bevorzugt, insbesondere von Pflanzen abgeleitetes Tween-80.

[0026] Die erfindungsgemäßen Faktor VIII-Formulierungen schließen vorzugsweise ebenfalls ein Antioxidans ein. Es wurde gefunden, dass das Hinzufügen von Antioxidantien zu den lyophilisierten erfindungsgemäßen Formulierungen die Stabilität dieser Formulierungen verbessert und daher ihre Lagerdauer verlängert. Die verwendeten Antioxidantien sollten mit der Verwendung mit einem pharmazeutischen Präparat kompatibel sein und zusätzlich vorzugsweise wasserlöslich sein. Wenn Antioxidantien zu einer Formulierung hinzugefügt werden, ist es vorzuziehen, solche Antioxidantien so spät wie möglich in dem Verfahren vor der Lyophilisation hinzuzufügen, um spontane Oxidation des Antioxidans zu vermeiden. Tabelle 2 unten führt geeignete Antioxidantien auf, die kommerziell von Firmen wie Calbiochem und Sigma erhältlich sind.

Tabelle 2 - Antioxidantien

N-Acetyl-L-Cystein/Homocystein
Glutathion
6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox)
Liponsäure
Methionin
Natriumthiosulfat
Platin
Glycin-Glycin-Histidin (Tripeptid)
Butylhydroxytoluol (BHT)

[0027] Von den vorangegangenen Antioxidantien wird Glutathion bevorzugt. Von allen Konzentrationen im Bereich von ungefähr 0,05 mg/ml bis mehr als 1,0 mg/ml wurde gefunden, dass sie die Stabilität von Faktor VIII-Zusammensetzungen verstärken, und es wird angenommen, dass höhere Konzentrationen ebenfalls geeignet wären (bis zu dem Punkt irgendwelcher toxischer Wirkungen oder nachteiliger Herstellungswirkungen, wie einer Erniedrigung der Glasübergangstemperatur des lyophilisierten Produkts).

[0028] Es wurde insbesondere gefunden, dass die Kombination von Histidin und Glutathion synergetisch günstige Wirkungen auf die Stabilität von Faktor VIII-Zusammensetzungen erzeugt. Histidin kann, während es als Puffer wirkt, ebenfalls als ein Metallchelator wirken. In dem Umfang, in dem Faktor VIII-Inaktivierung durch Metall induzierte Oxidation verursacht wird, kann Histidin daher durch Binden solcher oxidierenden Metallionen wirken, um Faktor VIII zu stabilisieren. Es wird geglaubt, dass durch das Binden dieser Metalle das Glutathion (oder tatsächlich jedes andere vorliegende Antioxidans) dadurch in der Lage ist, weiteren antioxidativen Schutz zu verleihen, da die oxidative Wirkung der durch das Histidin gebundenen Metallionen zurückgehalten wurde.

[0029] Andere Chelatbildner könnten in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen ebenfalls verwendet werden. Solche Mittel sollten vorzugsweise Metalle wie Kupfer und Eisen mit größerer Affinität binden als Calcium, wenn ein Calciumsalz in der Zusammensetzung verwendet wird. Ein solcher Chelator ist Deferoxamin, ein Chelatbildner, der die Entfernung von Al^{++} und Eisen erleichtert. Deferoxaminmesylat, $C_{25}H_{48}N_6O_8 \cdot CH_4O_3S$, kann von Sigma (Sigma Prod. Nr. D9533) bezogen werden. Es ist ein Aluminium- und Eisen(II)-Chelator, welcher Eisen (als einen 1:1 Chelatkomplex) nur in der +3 Oxidationsstufe, nicht in der +2 Oxidationsstufe chelatisiert und welcher ebenfalls das Manganion und andere Metalle binden kann. Deferoxamin kann vorteilhafterweise in einer Menge von 0,25 mg/l verwendet werden.

[0030] Der in den erfindungsgemäßen Formulierungen verwendete Faktor VIII kann entweder ein hoch aufgereinigter von menschlichem Plasma abgeleiteter Faktor VIII sein oder weiter bevorzugt ein rekombinant hergestellter Faktor VIII. Rekombinanter Faktor VIII kann aus Zellen chinesischer Hamster Ovarien (CHO), die mit einem Vektor transfiziert wurden, der eine DNA-Sequenz trägt, die für das Faktor VIII-Molekül kodiert, hergestellt werden. Verfahren zum Erzeugen solcher transfizierten CHO-Zellen werden inter alia in dem U.S. Patent Nr. 4,757,006 an Toole, Jr., beschrieben, obwohl alternative Verfahren im Stand der Technik ebenfalls bekannt sind (siehe z.B. das U.S. Patent Nr. 4,868,112, ebenfalls an Toole, Jr. und die PCT internationale Anmeldung WO-A-91/09122). Die verwendeten Verfahren zum Kultivieren solcher CHO-Zellen, um Faktor VIII herzustellen, sind im Stand der Technik ebenfalls bekannt, zum Beispiel in der europäischen Patentanmeldung Nr. 0 362 218 an das Genetics Institute, mit dem Titel "Improved method for producing Factor VIII : C-type proteins". Rekombinanter Faktor VIII kann jedoch ebenfalls in anderen Zelllinien hergestellt werden, wie Babyhamster Nierenzellen (engl. baby hamster kidney cells). Das Faktor VIII-Molekül selber kann, wenn es rekombinant hergestellt wird, entweder Faktor VIII in vollständiger Länge oder ein Deletionsderivat davon sein, wie ein Faktor VIII-Molekül mit deletierter B-Domäne.

[0031] Während die Faktor VIII-Zusammensetzungen, die in dieser Anmeldung beschrieben werden, lyophilisiert und in den angegebenen Konzentrationen wiederhergestellt werden können, wird der Fachmann verste-

hen, dass diese Präparate ebenfalls in stärker verdünnter Form hergestellt werden können. Zum Beispiel kann ein erfindungsgemäßes Präparat, welches lyophilisiert und/oder in 2 ml einer Lösung normal wiederhergestellt wurde, ebenfalls in einem größeren Volumen eines Verdünnungsmittels, wie 5 ml wiederhergestellt werden. Dies ist insbesondere angemessen, wenn das Faktor VIII-Präparat sofort in einen Patienten injiziert wird, da in diesem Fall der Faktor VIII weniger wahrscheinlich die Aktivität verliert, was schneller in stärker verdünnten Lösungen des Faktor VIII auftreten kann.

Formulierungs- und Lyophilisationsentwicklung

[0032] Um maximale Stabilität zu erreichen, werden die erfindungsgemäßen Faktor VIII-Zusammensetzungen vorzugsweise lyophilisiert. Während der Lyophilisation wird Faktor VIII von einer wässrigen Phase in eine amorphe feste Phase konvertiert, von dem angenommen wird, dass es das Protein vor chemischer und/oder Konformationsinstabilität zu schützen. Das lyophilisierte Präparat enthält nicht nur eine amorphe Phase, sondern schließt ebenfalls eine Komponente ein, welche während der Lyophilisation kristallisiert. Hiervon wird angenommen, dass es die schnelle Lyophilisation der Faktor VIII-Zusammensetzung und die Bildung eines besseren Kuchens erlaubt (das heißt, eines Kuchens mit minimaler Schrumpfung von den Seiten des Behälters, in dem er lyophilisiert wurde). In den erfindungsgemäßen Formulierungen wurden die Stabilisierungsmittel ausgewählt, um hauptsächlich in einer amorphen Phase des lyophilisierten Produkts aufzutreten, während die Füllmittel (außer HES) ausgewählt wurden, um während des Gefrierens zu kristallisieren.

[0033] Sowohl der Faktor VIII als auch der Stabilisator sind vorzugsweise in der amorphen Phase des lyophilisierten Kuchens verteilt. Die Masse des Stabilisators ist vorzugsweise ebenfalls groß, verglichen mit den anderen Bindemitteln in der amorphen Form. Zusätzlich ist die sichtbare Glasübergangstemperatur (T_g) der amorphen Phase vorzugsweise relativ hoch während des Gefriertrocknens, und die Glasübergangstemperatur (T_g) des Feststoffs ist vorzugsweise ähnlich hoch während der Lagerung. Es wurde gefunden, dass eine Kristallisation von Natriumchlorid in dem Produkt wünschenswert ist, da amorphes Natriumchlorid die T_g der amorphen Phase erniedrigt.

[0034] Um das Zusammenfallen des Kuchens einer bestimmten Zusammensetzung zu vermeiden, wird das erste Trocknen vorzugsweise bei einer Produkttemperatur unter der sichtbaren Glasübergangstemperatur des Gefrierkonzentrats durchgeführt. Ein Anstieg der Trockenzeit kann ebenfalls benötigt werden, um eine Verringerung in T_g auszugleichen. Weitere Information über Lyophilisation kann in Carpenter, J.F. und Chang, B.S., *Lyophilization of Protein Pharmaceuticals, Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing and Preservation*, K.E. Avis und V.L. Wu, Hrsg. (Buffalo Grove, IL: Interpharm Press, Inc.), S. 199–264 (1996) gefunden werden.

Beispiel 1

[0035] Die Wirkungen der Konzentration von Faktor VIII und des Hinzufügens eines Stabilisators auf die Ausbeute des Faktor VIII wurden in mehreren Studien untersucht. Diese Studien wurden unter Verwendung von Mannitol als einem Modellfüllmittel und Sucrose als einem Modellstabilisator durchgeführt. Die in Tabelle 3 unten beschriebenen drei Probenformulierungen wurden in diesen Studien verwendet. Alle in diesen Studien verwendeten Formulierungen schlossen 10 mM Tris, 200 mM NaCl, 8 % Mannitol, 4 mM CaCl_2 und 0,02 % Tween-80 ein und wurden bei pH-Wert 7,0 durchgeführt.

Tabelle 3

Proben-Nr.	anfänglicher Faktor VIII (IE/ml)	Sucrose %
IA	600	-
IB	60	-
IC	60	2

[0036] Diese Proben wurden unter Verwendung des in Tabelle 4 unten gezeigten Gefriertrocknungszyklus lyophilisiert, um eine Produkttemperatur unterhalb der sichtbaren Glasübergangstemperatur (T_g) beizubehalten. Dynamische Differenzkalorimetrische Untersuchungen (DSC, für engl. differential scanning calorimetry) wiesen auf das Vorliegen eines Übergangs bei ungefähr -40°C in den Mannitol-Formulierungen hin. Um eine Produkttemperatur unter diesem Wert beizubehalten, wurde die Plattentemperatur auf -32°C während des ersten

Trocknens gesetzt. Das erste Trocknen unter diesen Bedingungen wurde für ungefähr 55 Stunden mit einer Gesamtzykluszeit von ungefähr 80 Stunden durchgeführt.

Tabelle 4

Gefrieren/Verfahren der Bearbeitung	Beschreibung
I (Gefrieren)	Abkühlen auf +5°C; Abkühlen auf -5°C bei 1°C/Minute, für 20 Minuten gehalten; Abkühlen auf -20 ± 5°C bei 1°C/Minute, für 1 Stunde gehalten (bis zu 3 Stunden); Abkühlen auf -45°C bei 0,5°C/Minute, für 1 Stunde gehalten.
II	Gefrieren nach Verfahren I Bei -35°C für 48 Stunden gehalten.
III	Gefrieren nach Verfahren I Bei -35°C für 48 Stunden gehalten; bei -20°C für 48 Stunden gehalten.
IV (Gefriertrocknen)	Platte -32°C während des ersten Trocknens für ungefähr 55 Stunden (bis zu 100 Stunden); Produkt < -40°C während des ersten Trocknens; Steigerung von -32°C bis +40°C bei 0,2°C/Minute; Platte +40°C während des zweiten Trocknens für 3 Stunden.

[0037] Die Faktor VIII-Aktivität dieser Proben, bestimmt mit dem Einschnitt Gerinnungsassay wurde mit einer Kontrolle, die bei -45°C gehalten wurde, verglichen. Die Assayergebnisse sind in Tabelle 5 unten gezeigt.

Tabelle 5

Verfahren der Bearbeitung	% Verlust der Faktor VIII-Aktivität während jedes Schrittes		
	Formulierung IA (600 IE/ml)	Formulierung IB (60 IE/ml)	Formulierung IC (60 IE/ml, 2 % Sucrose)
I	6,7	37,5	41,7
II	2,0	9,3	3,9
III	7,3	11,6	5,0
IV (Lyophilisation)	20,0	24,2	18,3

[0038] Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Protein Konzentration eine Wirkung auf die Ausbeute des Faktor VIII während des Gefrierens hat. Formulierungen, die 60 IE/ml enthielten, verloren ungefähr 37 %–42 % der anfänglichen Faktor VIII-Aktivität während des Gefrierschritts, während 6,7 % der Faktor VIII-Aktivität von der Formulierung verloren wurde, die 600 IE/ml enthielt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine höhere Protein Konzentration eine schützende Wirkung während des Gefrierens aufweist. Obwohl Sucrose dem Faktor VIII sowohl während der dazwischenliegenden Temperaturhaltezeiten, als auch während des Gefriertrocknens einigen Schutz verlieh, versagte es, das Protein während des anfänglichen Gefrierschritts zu schützen.

Beispiel 2

[0039] Der Entwicklung des in Beispiel 1 beschriebenen Lyophilisationsverfahrens folgend, wurde eine weitere Optimierung dieses Verfahrens durchgeführt. Es wurde gefunden, dass eine lyophilisierte Zusammensetzung, die eine höhere Glasübergangstemperatur aufweist (und theoretisch eine bessere Faktor VIII-Stabilität) durch: (1) Absenken der Gefriertemperatur anfänglich auf -45°C oder niedriger (wie Absenken bis ungefähr -50°C oder -55°C); (2) durch Anheben der Temperatur auf -20°C oder -22°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) und anschließend (3) Absenken der Temperatur wiederum auf -45°C oder niedriger, hergestellt werden kann. Die Temperatur wird je nach Lage des Falls mit einer Geschwindigkeit zwischen ungefähr $0,5^{\circ}\text{C}$ und ungefähr $1,0^{\circ}\text{C}$ pro Minute abgesenkt oder angehoben. Sobald die gewünschte Temperatur erreicht ist, wird die Zusammensetzung bei dieser Temperatur für zwischen 1 und 3 Stunden gehalten. Dieser verbesserte Gefrierzyklus ist in Tabelle 6 unten gezeigt.

Tabelle 6

Gefrierverfahren	Beschreibung
I	<p>Abkühlen auf $+5^{\circ}\text{C}$;</p> <p>Abkühlen auf -5°C bei $0,5 - 1^{\circ}\text{C/Minute}$, für 20 Minuten gehalten;</p> <p>Abkühlen auf zwischen -55°C und -45°C bei $0,5 - 1^{\circ}\text{C/Minute}$, für ungefähr 1 Stunde gehalten;</p> <p>Erwärmen auf -22°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) bei $0,5 - 1^{\circ}\text{C/Minute}$, für 1 bis 3 Stunden gehalten;</p> <p>Abkühlen auf -45°C bei $0,5 - 1^{\circ}\text{C/Minute}$, für ungefähr 1 Stunde gehalten.</p>

[0040] Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Temperaturen, auf die in diesem Beispiel und in anderen Beispielen Bezug genommen wird, auf die Plattentemperatur des Lyophilisierers und nicht auf die Temperatur des Produktes selbst. Dem verbesserten Gefrierzyklus folgend, kann der Rest des Lyophilisationsverfahrens wie in Beispiel 1 oben beschrieben oder ansonsten wie weiterhin hier beschrieben oder wie durch einen Fachmann bestimmt, durchgeführt werden.

[0041] Es wurde gefunden, dass dieses verbesserte Lyophilisationsverfahren für Formulierungen geeignet ist, die Glycin als Füllmittel einschließen, sowie für jene, die Mannitol verwenden. Es wird weiterhin angenommen, dass es ebenso eine Eignung für Formulierungen aufweist, die die anderen erfindungsgemäßen Füllmittel verwenden.

Beispiel 3

[0042] Um ein gefriergetrocknetes Produkt mit annehmbarer Kuchenerscheinung und Glasübergangstemperatur herzustellen, wird angenommen, dass es nötig sein kann, das Füllmittel der lyophilisierten pharmazeutischen Präparate, die Natriumchlorid enthalten, wie Glycin oder Mannitol, zu kristallisieren. Daher wurde das folgende verbesserte Lyophilisationsverfahren für kristallisierbare Füllmittel entwickelt.

Tabelle 7a - Gefrierschritte

Verfahrensschritt	Temperatur	Dauer des Schrittes
Anfängliches Gefrieren	-40°C oder weniger	1 Stunde
Erstes Annealing	zwischen -23°C und -27°C	3 Stunden
Zweites Gefrieren	-55°C	1 Stunde
Zweites Annealing	-36°C	4 Stunden
Drittes Gefrieren	-50°C	1 Stunde

Tabelle 7b - Gefriertrocknungsschritte

Verfahrensschritt	Temperatur	Dauer des Schrittes
Erstes Trocknen	-35°C	bis zu 100 Stunden
Zweites Trocknen: erster Schritt	40°C	3 Stunden
Zweites Trocknen: zweiter Schritt	45°C	3 Stunden
Zweites Trocknen: dritter Schritt	50°C	3 Stunden

[0043] In den Gefrierschritten fanden die Änderungen in den Temperaturen mit einer Geschwindigkeit zwischen ungefähr 0,5°C/Minute und 1°C/Minute statt. Es wird angenommen, dass Schritte von längerer Dauer ebenfalls wirksam sind.

[0044] Vor dem ersten Gefrierschritt wird die Temperatur auf zwischen ungefähr 2°C und 8°C für ungefähr eine Stunde gebracht, für den Zweck, alle Röhrchen auf ungefähr die gleiche Temperatur zu bringen. Danach wird der Lyophilisierer auf -5°C abgekühlt. Der erste Gefrierschritt sollte bei einer Temperatur niedriger als -30°C, vorzugsweise unter -35°C und am meisten bevorzugt bei ungefähr -40°C durchgeführt werden. Dem folgend sollte der erste Annealingschritt bei einer Temperatur zwischen -30°C und -19°C, weiter bevorzugt entweder zwischen ungefähr -25°C und -28°C (wenn Glycin das Füllmittel ist) oder zwischen -21°C und -24°C (wenn Mannitol das Füllmittel ist) stattfinden, wobei die Temperaturen von -23°C und -26°C am meisten bevorzugt werden, da angenommen wird, dass bei diesen Temperaturen die kristallisierbaren Füllmittel zumindest zum Teil kristallisieren. Der niedrigere Bereich um -27°C wird jedoch für Formulierungen, die Mannitol und Arginin enthalten, nicht empfohlen. Dieser Schritt wird vorzugsweise für ungefähr 3 Stunden durchgeführt.

[0045] Dem ersten Annealingschritt folgend, wird die Temperatur für ungefähr 1 Stunde abgesenkt, vorzugsweise auf weniger als ungefähr -50°C und weiter bevorzugt auf weniger als -55°C. Es wird angenommen, dass das Natriumchlorid in dem Präparat zu diesem Zeitpunkt Kristallisationskeime bildet.

[0046] Während des zweiten Annealingschrittes wird die Temperatur des pharmazeutischen Präparats auf zwischen ungefähr -30°C und -39°C angehoben und vorzugsweise auf ungefähr -33°C für Mannitol enthaltende Zusammensetzungen und -36°C für Glycin enthaltene Zusammensetzungen. Es wird angenommen, dass das NaCl-Kristallwachstum, zumindest zum Teil, zu diesem Zeitpunkt stattfindet. Dieser Schritt wird vorzugsweise für ungefähr 4 Stunden durchgeführt. Dem folgend wird die Temperatur des Lyophilisierers auf ungefähr -50°C gesenkt, vorzugsweise für ungefähr 1 Stunde, um die Temperatur des Präparats zu senken.

[0047] In den Gefriertrocknungsschritten, die folgen, finden die Temperaturänderungen bei einer Geschwindigkeit zwischen ungefähr 0,1°C/Minute und 0,5°C/Minute statt. Nach dem Absenken des Druckes im Lyophilisierer auf ungefähr 65 m Torr wird die Temperatur zum ersten Trocknen auf zwischen ungefähr -32°C und -35°C angehoben. Bei dieser Temperatur werden Eiskristalle in dem Präparat sublimieren. Dieser Schritt wird für bis zu ungefähr 100 Stunden durchgeführt oder bis das meiste Eis aus dem Präparat sublimiert ist. Der Punkt, an dem das meiste Eis sublimiert ist, kann zum Beispiel durch Verwendung eines Taupunktsensors bestimmt werden, welcher das Ende der Sublimation des Eises anzeigt, wenn die Messwerte abnehmen (der Wendepunkt).

[0048] Dem ersten Trocknen folgend, wird die Temperatur auf +40°C angehoben, vorzugsweise bei einer Geschwindigkeit von 0,2°C/Minute, um das zweite Trocknen einzuleiten, um weiteres Wasser aus dem Präparat zu entfernen. Diese Temperatur wird vorzugsweise für ungefähr 3 Stunden beibehalten. Zweite und dritte zweite Trocknungsschritte folgen diesem ersten Schritt, wobei die Temperatur auf ungefähr +45°C für ungefähr drei Stunden angehoben wird und anschließend auf ungefähr +50°C für weitere drei Stunden, um die Feuchtigkeit im lyophilisierten Kuchen auf weniger als 2 Gew.-% zu senken.

Beispiel 4

[0049] Es wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um spezifisch die Wirkung von Histidin auf lyophilisierte Faktor VIII-Zusammensetzungen zu untersuchen, die Glycin oder Mannitol als Füllmittel enthielten. Nicht umkehrender Wärmestrom (modulierte DSC, mDSC) wurde verwendet, um die Kristallisation dieser Füllmittel während des Abkühlens festzustellen. Sowohl die Temperatur der Kristallisation als auch die gesamte Wärme

der Kristallisation wurden aus der Kristallisationsabwärme bestimmt. Das Auftreten der Wärmeaufnahme des eutektischen Schmelzens des NaCl während des Erwärmens wurde verwendet, um die NaCl-Kristallisation festzustellen. In der mDSC wurde das Ausmaß der Kristallisation als das Verhältnis der Enthalpie des Schmelzens der Formulierung zu der Enthalpie des Schmelzens von reiner NaCl-Lösung unter Verwendung des gesamten Wärmestromsignals bestimmt. Zusätzlich wurden Röntgenbeugungsanalysen durchgeführt, um das Ausmaß der Kristallisation in den lyophilisierten Formulierungen zu bestimmen.

[0050] Während Histidin Konzentrationen von weniger als 20 mM die Kristallisation von Glycin nicht signifikant beeinflussten, senkten 50 mM Histidin das Ausmaß der Glycin Kristallisation. Eindeutige NaCl-Kristallisationswärmeabgaben wurden während des Abkühlens der Formulierungen, die Glycin enthielten, nicht beobachtet. Jedoch wiesen die Wärmeaufnahmen des eutektischen Schmelzens während des Erwärmens darauf hin, dass NaCl nach Abkühlen auf weniger als -50°C und Annealing bei -30°C , -35°C und -40°C kristallisiert wurde ($> 50\%$). Das Einschließen von 50 mM Histidin in die Glycin enthaltende Formulierung verzögerte die NaCl-Kristallisation. Infolgedessen wurde die Annealingzeit für solche Formulierungen 3-fach erhöht, um eine entsprechende Kristallinität zu erreichen.

[0051] Die Wirkung von 20 mM Histidin auf die Kristallisation von NaCl in den Glycin enthaltenden Formulierungen war jedoch minimal. In Gefriertrocknungsuntersuchungen wurde ein Kollaps des lyophilisierten Kuchens visuell in Glycin enthaltenden Formulierungen beobachtet, die 50 mM Histidin enthielten. Röntgenpulververfahrensdaten wiesen auf eine Abnahme in der Kristallinität des NaCl in Proben hin, die Histidin enthielten. In Mannitol enthaltenden Formulierungen kristallisierte typischerweise 83 %–90 % des Natriumchlorids während des Abkühlens auf zwischen -40°C und -50°C ohne einen Bedarf des Annealings. Während Einschließen von 20 mM Histidin in die Formulierung eine NaCl-Kristallisation während des Abkühlens unterdrückt, führt ein Annealing zu ungefähr 40 % Kristallisation des NaCl.

[0052] Daher kann in Formulierungen, die ein kristallisierbares Füllmittel, wie Glycin oder Mannitol, und NaCl enthalten, das Einschließen von Histidin das Ausmaß der Kristallisation des NaCl vermindern. Obwohl dies in einigen Fällen zum Kollaps des Kuchens, der während der Lyophilisation gebildet wurde, führen könnte, kann die Verwendung von relativ niedrigeren Konzentrationen an Histidin in solchen Formulierungen diese Wirkung abschwächen. Dennoch wurden annehmbare Kuchen mit Histidin Konzentrationen von 35 mM und 50 mM gebildet. Histidin kann gegenüber HEPES als ein Puffer in Mannitol und Glycin basierten Formulierungen ebenfalls bevorzugt sein, da für die Verwendung von HEPES beobachtet wurde, dass es die T_g in einem größeren Ausmaß absenkt, als eine ähnliche Menge an Histidin.

Beispiel 5

[0053] Die physikalischen Eigenschaften einer Anzahl möglicher Faktor VIII-Formulierungen, einschließlich sieben Stabilisator- und fünf Füllmittelkandidaten, wurden in einer anderen Untersuchung überprüft. Zusätzlich zu einem Füllmittel und einem Stabilisator enthielten alle Formulierungen, die in Tabelle 8 unten aufgeführt sind (außer Formulierung 11) 10 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 0,02 % Tween-80, 4 mM CaCl_2 und wiesen einen pH-Wert von 7,0 auf. Formulierung 11 enthielt 10 mM Tris-HCl, 0,02 % Tween-80 und 4 mM CaCl_2 , ebenfalls bei einem pH-Wert von 7,0. Alle pH-Wert Messungen wurden bei Umgebungstemperatur durchgeführt. Die Formulierungen 8 und 11 werden nur für vergleichende Zwecke beschrieben.

Tabelle 8

Proben-Nr.	Füllmittel	Proteinstabilisator
1	8 % Mannitol	2 % Sucrose
2	8 % Mannitol	2 % Trehalose
3	8 % Mannitol	2 % Raffinose
4	8 % Mannitol	2 % Arginin
5	8 % Mannitol	2 % Lysin
6	8 % Mannitol	2 % Sorbitol
7	8 % Mannitol	2 % Glycerin
8	4 % Hydroxyethylstärke	2 % Sucrose
9	8 % Glycin	2 % Sucrose
10	8 % Glycin	2 % Trehalose
11	400 mM NaCl	2 % Sucrose
12	8 % Alanin	2 % Sucrose

[0054] Temperaturmessungen des Kollapses durch Gefriertrockenmikroskopie und thermische Übergangsmessungen durch DSC wurden verwendet, um das Gefriertrocknungsverhalten vorherzusagen. DSC, Röntgenpulververfahren und Mikroskopie mit polarisiertem Licht wurden ebenfalls verwendet, um die Kristallinität der lyophilisierten Proben zu bestimmen. Die Wiederherstellungszeit und die Erscheinung der Proben wurden ebenfalls überprüft. Die Ergebnisse all dieser Messungen sind in Tabelle 9 unten zusammengefasst.

Tabelle 9

Proben-Nr.	T _{pc} (°C)	T _c (°C)	T _g (°C)	Wiederherstellung (Sekunden)	Wassergehalt (%)	Erscheinung
1	-14	-10	54	64	n/c	gut
2	-20	-15	53	62	1,4	Oberfläche teilweise kollabiert
3	-15	-10	54	77	1,7	gut
4	-	-	-	-	-	Teilkollaps
5	-	-	-	-	-	kollabiert
6	n/c	n/c	<10°C*	63	0,6	gut
7	-	-	<10°C*	-	-	gut
8	-	-	86	49	0,7	gut, aber von den Seiten geschrumpft
9	-	-	54	22	0,8	gut
10	-	-	63	18	-	gut
11	-	-	66	11	0,4	gut (Schicht am Boden)
12	-	-	-	57	0,5	gut

* Sorbitol und Glycerin weisen Glasübergänge bei < 10°C auf. Der DSC Scanbereich schließt Temperaturen in diesem Bereich nicht ein.

n/c = nicht eindeutig (für engl. not clear)

T_{pc} = Temperatur, bei der ein teilweiser Kollaps im Gefriertrockenmikroskop auftritt

T_c = Temperatur, bei der ein vollständiger Kollaps im Gefriertrockenmikroskop auftritt

T_g = Glasübergangstemperatur

[0055] Mit der Ausnahme von Mannitol:Lysin schienen alle Formulierungen adäquate physische Erscheinungen aufzuweisen. Lysin interferiert mit der Kristallisation von sowohl Mannitol als auch Glycin, was eine Erniedrigung in der Glasübergangstemperatur und einen Kollaps des lyophilisierten Kuchens verursacht.

Beispiel 6

[0056] Die in Tabelle 8 oben beschriebenen Faktor VIII-Zusammensetzungen wurden bei -70°C , 25°C , 40°C und 50°C für unterschiedliche Zeiträume gelagert, um ihre Stabilität zu überprüfen. Die Faktor VIII-Aktivitätsspiegel wurden nach 2 Wochen, 1 Monat, 2 Monaten und 3 Monaten überprüft, und die Ergebnisse sind in Tabelle 10 unten zusammengefasst. Zwei der Proben, wovon eine Mannitol als Füllmittel und Sorbitol als Stabilisator verwendete und die andere Mannitol als Füllmittel und Glycerin als Stabilisator verwendete, zeigten geringe Stabilität. Die übrigen Formulierungen zeigten alle die Fähigkeit, Faktor VIII zu stabilisieren.

Tabelle 10

Formulierungs- beschreibung	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	% des Anfangswertes in Monat				
		0	0,5	1	2	3
Glycin:Sucrose	-70	100,00	97,43	101,71	99,89	97,97
	25	100,00				85,44
	40	100,00		79,87	71,52	63,06
	50	100,00	76,34	67,99	52,14	47,64
Glycin:Trehalose	-70	100,00	89,22	96,00	95,90	94,64
	25	100,00				83,17
	40	100,00		79,93	72,42	68,03
	50	100,00	80,97	64,28	57,60	50,92
Mannitol:Trehalose	-70	100,00	91,32	97,72	96,10	98,26
	25	100,00				85,79
	40	100,00		82,54	70,72	59,44
	50	100,00	66,16	65,51	48,81	52,06
Mannitol:Sucrose	-70	100,00	100,45	100,56	105,47	99,22
	25	100,00				87,04
	40	100,00		85,59	80,78	55,42
	50	100,00	81,68	75,53	57,88	43,46
Mannitol:Arginin	-70	100,00	102,26	105,53	103,72	105,08
	25	100,00				95,15
	40	100,00		91,53	80,93	69,19
	50	100,00	82,28	68,06	56,32	45,94
Mannitol:Raffinose	-70	100,00	93,88	98,41	100,68	103,62
	25	100,00				83,13
	40	100,00		81,09	73,61	67,16
	50	100,00	71,69	68,52	54,25	47,11
Mannitol:Glycerin	-70					
	25					
	40					
	50					
Mannitol:Sorbitol	-70	100,00	104,06			
	25	100,00				

	40	100,00				
	50	100,00	32,73			
HES: Sucrose	-70	100,00	102,74	103,03	100,90	
	25	100,00				
	40	100,00		76,89	77,47	
	50	100,00	71,47	67,40	30,02	
NaCl: Sucrose	-70	100,00	88,54	88,44	95,58	
	25	100,00				
	40	100,00		71,56	58,30	
	50	100,00	52,71	37,90	30,34	
Alanin: Sucrose	-70	100,00	109,78	109,67	108,96	
	25	100,00				
	40	100,00		92,99	73,03	
	50	100,00	83,25	74,91	57,65	
Glycin: Raffinose	-70	100,00	111,57	114,51	105,25	
	25	100,00				
	40	100,00		89,20	82,10	
	50	100,00	93,21	72,22	53,24	

Beispiel 7

[0057] Basierend auf der Information, die während der in den Beispielen 5 und 6 beschriebenen Untersuchungen entwickelt wurde, wurde beschlossen, dass Kandidatenformulierungen, die die in Tabelle 11 unten gezeigten Bindemittel aufweisen, weiter entwickelt werden.

Tabelle 11

Bindemittel	Konzentration
Mannitol oder Glycin	6 - 9 %
Arginin oder Trehalose	1 - 3 %
Tween 80	0,005 - 0,04 %
NaCl	200 - 250 mM
CaCl ₂	3 - 5 mM
TRIS	20 - 30 mM
Histidin oder HEPES	10 - 50 mM
Glutathion	0,15 - 0,25 mg/ml

[0058] Basierend auf diesen Parametern wurden die folgenden spezifischen Formulierungen entwickelt:

Tabelle 12

Formulierung #1	Formulierung #2	Formulierung #3
10 mM HEPES 20 mM Tris 225 mM NaCl 0,03 Vol.-% Tween-80 8 % (Gew./Vol.) Mannitol 2 % (Gew./Vol.) Trehalose 0,2 mg/ml reduziertes Glutathion 4 mM CaCl ₂	10 mM HEPES 20 mM Tris 225 mM NaCl 0,03 Vol.-% Tween-80 8 % (Gew./Vol.) Glycin 2 % (Gew./Vol.) Trehalose 0,2 mg/ml reduziertes Glutathion 4 mM CaCl ₂	10 mM HEPES 20 mM Tris 225 mM NaCl 0,03 Vol.-% Tween-80 8 % (Gew./Vol.) Mannitol 2 % (Gew./Vol.) Arginin 0,2 mg/ml reduziertes Glutathion 4 mM CaCl ₂

Formulierung #4	Formulierung #5
25 mM Histidin 20 mM Tris 225 mM NaCl 0,03 Vol.-% Tween-80 8 % (Gew./Vol.) Mannitol 2 % (Gew./Vol.) Trehalose 0,2 mg/ml reduziertes Glutathion 4 mM CaCl ₂	25 mM Histidin 20 mM Tris 225 mM NaCl 0,03 Vol.-% Tween-80 8 % (Gew./Vol.) Glycin 2 % (Gew./Vol.) Trehalose 0,2 mg/ml reduziertes Glutathion 4 mM CaCl ₂

Patentansprüche

1. Faktor VIII-Zusammensetzung, welche ohne das Zufügen von Albumin zu der Zusammensetzung formuliert ist, umfassend die folgenden Formulierungsbindemittel zusätzlich zu Faktor VIII:
4% bis 10% (Gewicht pro Volumen) eines Füllmittels, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Mannitol, Glycin und Alanin;
1 % bis 4% (Gewicht pro Volumen) eines Stabilisierungsmittels, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Sucrose, Trehalose, Raffinose und Arginin;
1 mM bis 5 mM Calciumsalz;
100 mM bis 300 mM NaCl; und
ein Puffermittel zum Beibehalten eines pH-Werts zwischen 6 und 8.
2. Faktor VIII-Zusammensetzung nach Anspruch 1, zusätzlich umfassend eine grenzflächenaktive Substanz.
3. Faktor VIII-Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei die grenzflächenaktive Substanz aus der Gruppe, bestehend aus Polysorbat 20, Polysorbat 80, Pluronic F68 und Brij 35, ausgewählt ist.
4. Faktor VIII-Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei die grenzflächenaktive Substanz Polysorbat 80 ist und wobei das Polysorbat 80 in einer Menge von weniger als 0,1% (Gewicht pro Volumen) vorliegt.
5. Faktor VIII-Zusammensetzung nach den Ansprüchen 1 bis 4, wobei die grenzflächenaktive Substanz in einer Menge von 0,03% (Gewicht pro Volumen) vorliegt.
6. Faktor VIII-Zusammensetzung nach den Ansprüchen 1 bis 5, wobei das Puffermittel aus der Gruppe, bestehend aus Tris, BIS-Tris-Propan, Histidin, PIPES, MOPS, HEPES, MES und ACES, ausgewählt ist.
7. Faktor VIII-Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei das Puffermittel Tris umfaßt.
8. Faktor VIII-Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das Tris in einer Menge von 20 mM vorliegt.
9. Faktor VIII-Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei das Puffermittel von 10 mM bis 50 mM Histidin umfaßt.

10. Faktor VIII-Zusammensetzung nach Anspruch 9, wobei das Histidin in einer Menge von 25 mM vorliegt.
11. Faktor VIII-Zusammensetzung nach den Ansprüchen 1 bis 10, weiter umfassend ein Antioxidans.
12. Faktor VIII-Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei das Antioxidans Glutathion ist.
13. Faktor VIII-Zusammensetzung nach Anspruch 12, wobei das Glutathion in einer Menge von 0,05 mg/ml bis 1,0 mg/ml vorliegt.
14. Faktor VIII-Zusammensetzung nach den Ansprüchen 1 bis 13, wobei das Füllmittel in einer Menge von 8% (Gewicht pro Volumen) vorliegt.
15. Faktor VIII-Zusammensetzung nach den Ansprüchen 1 bis 14, wobei das Füllmittel Mannitol ist.
16. Faktor VIII-Zusammensetzung nach den Ansprüchen 1 bis 14, wobei das Füllmittel Glycin ist.
17. Faktor VIII-Zusammensetzung nach den Ansprüchen 1 bis 16, wobei das Stabilisierungsmittel in einer Menge von 2% (Gewicht pro Volumen) vorliegt.
18. Faktor VIII-Zusammensetzung nach den Ansprüchen 1 bis 17, wobei das Stabilisierungsmittel Sucrose ist.
19. Faktor VIII-Zusammensetzung nach den Ansprüchen 1 bis 17, wobei das Stabilisierungsmittel Arginin ist.
20. Faktor VIII-Zusammensetzung nach den Ansprüchen 1 bis 17, wobei das Stabilisierungsmittel Trehalose ist.
21. Faktor VIII-Zusammensetzung nach den Ansprüchen 1 bis 20, wobei das NaCl in einer Menge von 200 mM bis 250 mM vorliegt.
22. Faktor VIII-Zusammensetzung nach Anspruch 21, wobei das NaCl in einer Menge von 225 mM vorliegt.
23. Faktor VIII-Zusammensetzung nach den Ansprüchen 1 bis 22, wobei das Calciumsalz Calciumchlorid ist.
24. Faktor VIII-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 23, wobei die Faktor VIII-Zusammensetzung zur Lyophilisation geeignet ist.
25. Lyophilisierte Faktor VIII-Zusammensetzung, erhältlich durch Lyophilisieren der Faktor VIII-Zusammensetzung nach Anspruch 24.
26. Verwendung einer Faktor VIII-Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 25 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Hämophilie.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen