

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

290 342

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1994 - 1328

(22) Přihlášeno: 01.10.1993

(30) Právo přednosti:

02.10.1992 SE 1992/9202878

07.05.1993 SE 1993/9301580

11.06.1993 SE 1993/9302006

(40) Zveřejněno: 16.11.1994

(Věstník č. 11/1994)

(47) Uděleno: 15.05.2002

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.07.2002

(Věstník č. 7/2002)

(86) PCT číslo: PCT/SE93/00793

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 94/07510

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 35/16

A 61 K 38/37

A 61 P 7/04

(73) Majitel patentu:

GENETICS INSTITUTE INC., Cambridge, MA,
US;

(72) Původce vynálezu:

Österberg Thomas, Stockholm, SE;
Fatouros Angelica, Stockholm, SE;

(74) Zástupce:

Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název vynálezu:

**Kompozice stabilní při skladování, obsahující
koagulační faktor VIII a neiontovou povrchově
aktivní látku a způsob její výroby**

(57) Anotace:

Je popsána kompozice stabilní při skladování, obsahující koagulační faktor VIII a neiontovou povrchově aktivní látku, která je ve vodném roztoku, popřípadě lyofilizovaná a rekonstituovatelná vodou na vodný roztok, kde koagulační faktor VIII je rekombinantní, se specifickou aktivitou větší než 2000 mezinárodních jednotek na mg proteinu a neiontová povrchově aktivní látka je obsažena v množství odpovídajícím alespoň 0,01 mg na ml vodného roztoku, a kompozice obsahuje dále chlorid sodný nebo draselný v množství odpovídajícím více než 0,1 mol na ml vodného roztoku a L-histidin v množství odpovídajícím více než 1 mmol na ml vodného roztoku, přičemž kompozice je prosta albuminu. Způsob výroby této kompozice se provádí v nepřítomnosti albuminu a spočívá v tom, že se koagulační faktor VIII uvádí mícháním do styku s neiontovou povrchově aktivní látkou ve vodném roztoku v přítomnosti chloridu sodného nebo draselného a L-histidinu jako pufru.

CZ 290342 B6

Kompozice stabilní při skladování, obsahující koagulační faktor VIII a neiontovou povrchově aktivní látku a způsob její výroby

5 Oblast techniky

Tento vynález se týká kompozice stabilní při skladování, obsahující koagulační faktor VIII a neiontovou povrchově aktivní látku, která je ve vodné roztoku, popřípadě lyofilizovaná a rekonstituovatelná vodou na vodný roztok. Vynález se také týká způsobu výroby této kompozice, který se provádí v nepřítomnosti albuminu.

Dosavadní stav techniky

15 Hemofilie je dědičné onemocnění, které je známo po staletí, ale pouze během posledních tří desetiletí je možné rozlišovat mezi jejími různými formami, a to hemofilií A, hemofilií B a hemofilií C. Hemofilie A je nejčastější forma, která postihuje pouze mužské jedince a projevuje se u jednoho nebo dvou jedinců na 10 000 živě narozených chlapců. Choroba je zapříčiněna silně sníženou hladinou nebo nepřítomností biologicky aktivního koagulačního faktoru VIII (antihemofilního faktoru), co je protein normálně přítomný v plasmě. Klinickým projevem Hemofilie A je sklon k silnému krvácení a před zavedením ošetřování koncentráty faktoru VIII byl průměrný věk takových pacientů kratší než 20 let. Koncentráty faktoru VIII získané z plasmy jsou dostupné přibližně tři desetiletí. To značně žádoucím způsobem zlepšilo situaci v ošetřování pacientů trpících hemofilií a dává pacientům možnost žít normálním životem.

25 Terapeutické koncentráty faktoru VIII se až dosud připravují frakcionací plasmy. Avšak jsou nové způsoby, které umožňují produkci faktoru VIII v buněčné kultuře za použití technických postupů na bázi rekombinantní DNA, jak uvádí například J. Gitschier a kol. v Nature 312, 330–337/1984/ a evropský patent č. 160 457.

30 Koncentráty faktoru VIII pocházející z lidské plasmy obsahují různé fragmentované plně aktivní formy faktoru VIII (Andersson a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2979–2983 /1986/). Nejméně aktivní forma má molekulovou hmotnost 170 000 a obsahuje dva řetězce o molekulové hmotnosti 90 000 a 80 000, které jsou spojeny dohromady můstkem z kovového ionu. V této souvislosti se odkazuje na evropský patent č. 197 901. Firma Kabi Pharmacia vyvinula produkt na bázi rekombinantního faktoru VIII, který odpovídá formě plasmového faktoru VIII o molekulové hmotnosti 170 000 v terapeutických koncentrátech faktoru VIII. Tupá molekula rekombinantního faktoru VIII je ukončena r-VIII SQ a je produkována v buňkách vaječníku čínské křečka (CHO) procesorem v buněčné kultuře za použití prostředí zbaveného séra v konečné pasáži.

45 Specifická aktivita r-VIII SQ může být větší než 12 000 mezinárodních jednotek (IU) na mg proteinu a výhodně vyšší než 14 000 mezinárodních jednotek na mg. Byla naměřena aktivita přibližně 15 000 mezinárodních jednotek na mg. Pro r-VIII SQ podle tohoto vynálezu již dříve byla známa aktivita okolo 10 000 mezinárodních jednotek VIII:C na mg proteinu.

Rekombinantní faktor VIII SQ je indikován pro ošetřování klasické hemofilie. Dávka je podobná dávce koncentrátů plasmového faktoru VIII. V důsledku nyní dosažitelné vysoké koncentrace je pro injekce zapotřebí pouze malých objemů.

50 Strukturu a biochemii produktů na bázi rekombinantního faktoru VIII obecně popsal Kaufman v Tibtech 9/1991/ v Hematology 63, 155–165/1991/. Struktura a biochemie r-VIII SQ je popsána v patentové přihlášce WO 91/09 122.

Stabilita proteinů je obecně problémem farmaceutického průmyslu. Tato stabilita se často řeší sušením proteinu v různých sušicích procesech, jako je vymrazování. Protein se potom distribuuje a skladuje ve vymražené formě.

- 5 Roztok před vysušením, lyofilizovaný materiál, suchý materiál a rekonstruovaný produkt mají být vždy tak stabilní, aby se příliš velká aktivita neztrácela během sušicích procesů, skladování a během manipulace.

- 10 Faktor VIII, který se frakcionuje z plasmy, se obvykle prodává jako lyofilizovaný prášek, který se může rekonstitovat vodou.

- 15 Kompozice s malým množstvím proteinu obvykle ztrácí aktivitu během čištění, sterilního zpracování, balení a během podávání. Tento problém se běžně řeší přidavkem lidského albuminu, který vhodně snižuje ztrátu aktivity aktivního proteinu. Funkce lidského albuminu jako obecného stabilizátoru během čištění, sterilního zpracování a lyofilizace uvádí přehledný článek, který publikoval Wang a kol. v J. of Parenteral Sci. and Tech. 42, doplněk 2S /1988/. Lidský albumin je také dobrý pro tvorbu koláče v kompozici z lyofilizace. Použití albuminu pro stabilizaci faktoru VIII je známo a běžně používáno ve všech produktech obsahujících vysoce čištěný faktor VIII, které jsou komerčně dostupné.

- 20 Není však žádoucí přidávat lidský albumin k terapeutickému proteinu, který je vyráběn rekombinantní DNA technologií. Kromě toho použití lidského albuminu jako pomocné látky v prostředcích často omezuje možnost využít řady nejvhodnějších a nejcitlivějších analytických metod, používaných pro charakterizaci proteinu.

- 25 Proto jsou zapotřebí prostředky obsahující faktor VIII, které jsou prosté albuminu a které jsou stále během sušení vymrazováním neboli lyofilizace a jako roztok po rekonstituci.

- 30 Bylo navrženo několik řešení pro stabilizaci různých proteinů.

- Evropský patent č. 35 204 (Cutter) uvádí způsob k dosažení tepelné stability proteinové kompozice v přítomnosti polyolu.

- 35 Evropský patent č. 381 345 (Corint) popisuje vodnou kapalinu obsahující peptid desmopressin v přítomnosti karboxymethylcelulózy.

- 40 Ve WO 89/09 614 (Genentech) je uveden stabilizovaný prostředek lidského růstového hormonu, který obsahuje glycin, mannitol a pufr a při výhodném provedení se přidává neiontová povrchově aktivní látka, jako je polysorbát 80. Tato neiontová povrchově aktivní látka se přidává ke snížení agregace a denaturace. prostředek má zvýšenou stabilitu v lyofilizovaném prostředku a po rekonstrukci.

- 45 Evropský patent č. 286 110 (Cetus) popisuje roztok obsahující protein interleukin-2 ve formě částic, který je rozpuštěn v inertním nosném prostředí obsahujícím neiontovou polymerní povrchově aktivní látku jako solubilizér a stabilizátor. Výhodnými povrchově aktivními látkami jsou aktylfenoxypolyethoxyethanolové deriváty, deriváty monostearátu polyethylenglykolu a polyethylen sorbitan estery mastných kyselin.

- 50 US patent č. 4 783 441 (Hoechst) uvádí vodný roztok, který obsahuje protein jako je inzulin a povrchově aktivní látku.

- 55 US patent č. 4 165 370 (Coval) se zmiňuje o roztoku gamaglobulinu a způsobu jeho výroby. Tento roztok obsahuje polyethylenglykol (PEG). K roztoku se může také přidat neiontová povrchově aktivní látka.

V evropském patentu č. 77 870 (Green Cross) je popsáno přidávání aminokyselin, monosachridů, oligosacharidů, cukrových alkoholů nebo karboxylových kyselin odvozených od uhlovodíků ke zlepšení stability roztoku obsahujícího faktor VIII. Přidávání cukrového alkoholu nebo disacharidů k vodnému roztoku faktoru VIII pro zvýšení stability během tepelného zpracování je uvedeno v evropském patentu č. 117 064 (Green Cross).

WO 91/10 439 (Octopharma) chrání stabilní injekční roztok faktoru VIII nebo faktoru IX, který obsahuje disacharid, výhodně sacharózu, a alespoň jednu aminokyselinu.

Evropské patenty č. 315 968 a 314 095 (Rorer) chrání stabilní prostředky z faktoru VIII, které mají různou iontovou sílu.

Proteiny se liší s ohledem na své fyzikálně chemické vlastnosti. Pokud se připravuje farmaceutický prostředek, který má být připravený z fyzikálně chemického hlediska a stabilní po dlouhou dobu, nemůže se věnovat pozornost jen fyziologickým vlastnostem proteinu, ale musí se vzít v úvahu také jiná hlediska, jako je průmyslová výroba, snadná manipulace pro pacienta a také bezpečnost pro pacienta. Výsledky těchto znaků se nemohou předem předvídat, pokud se testují různé prostředky a často je zapotřebí zvláštní roztok pro každý protein.

V plasmě cirkulující faktor VIII je stabilizován ve spojitosti se svým nosným proteinem, von Willebrandovým faktorem (vWF). V plasmě a také v koncentrátech faktoru VIII běžné intermediární čistoty je hmotnostní poměr vWF k faktoru VIII alespoň 50:1. V koncentrátech s velmi vysokou čistotou faktoru VIII, se specifickou aktivitou větší než 2 000 mezinárodních jednotek na mg proteinu, je hmotnostní poměr vWF k faktoru VIII přibližně 1:1 a v podstatě veškerý faktor VIII je vázán k vWF. Navzdory této stabilizaci se vyžaduje další ochrana přidáním albuminu, aby bylo dosaženo přijatelné stability během lyofilizace a skladování.

Všechny superčisté prostředky na trhu jsou stabilizovány albuminem (lidským sérovým albuminem).

Vzniká nový požadavek získat faktor VIII pro injekce bez albuminu, který obsahuje minimální množství přísad.

Nyní byl vyvinut nový prostředek, který řeší svrchu uvedené problémy faktoru VIII.

K velikému překvapení původců tohoto vynálezu se podařilo zjistit, že faktor VIII, což je velmi sensitivní protein, se může stabilizovat bez albuminu, pokud se k němu přidá neionová povrchově aktivní látka.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je kompozice stabilní při skladování, obsahující koagulační faktor VIII a neiontovou povrchově aktivní látku, která je ve vodném roztoku, popřípadě lyofilizovaná a rekonstituovatelná vodou na vodný roztok, kde koagulační faktor VIII je rekombinantní, se specifickou aktivitou větší než 2 000 mezinárodních jednotek na mg proteinu a neiontová povrchově aktivní látka je obsažena v množství odpovídajícím alespoň 0,01 mg na ml vodného roztoku, a kompozice obsahuje dále chlorid sodný nebo draselný v množství odpovídajícím více než 0,1 mol na ml vodného roztoku a L-histidin v množství odpovídajícím více než 1 mmol na ml vodného roztoku, přičemž kompozice je prosta albuminu.

Předmětem tohoto vynálezu je také způsob výroby svrchu uvedené kompozice, jehož podstata spočívá v tom, že v nepřítomnosti albuminu se koagulační faktor VIII uvádí mícháním do styku s neiontovou povrchově aktivní látkou ve vodném roztoku v přítomnosti chloridu sodného nebo draselného a L-histidinu jako pufru.

Dále je uveden podrobnější popis tohoto vynálezu.

5 Tak se tento vynález týká kompozice, která obsahuje koagulační faktor VIII a neiontovou povrchově aktivní látku jako stabilizátor. Faktor VIII používaný podle tohoto vynálezu je vysoce čištěný, to znamená, že má specifickou aktivitu větší než 5 000 mezinárodních jednotek na mg proteinu, a prostředek je stabilizován bez přídavku albuminu.

10 Pokud faktor VIII je rekombinantního původu, může být buď ve formě o své plné délce nebo jako derivát upravený delecí, jako je například SQ derivát.

Množství faktoru VIII je od 10 do 100 000 mezinárodních jednotek na ml, výhodně od 50 do 10 000 mezinárodních jednotek na ml.

15 Neionová povrchově aktivní látka se výhodně volí z blokových kopolymerů, jako je poloxamer nebo polyoxyethylen (20) ester mastných kyselin, jako je polysorbát 20 nebo polysorbát 80. Jako polysorbát 80 se používá Tween 80^R. Neionová povrchově aktivní látka má být přítomna v množství nad kritickou koncentrací micel (CMC), viz Wan a Lee, Journal of Pharm. Sci. 63, 136 /1974/.

20 Polyoxyethylen (20) ester mastných kyselin je výhodně přítomen v množství nejméně 0,1 mg/ml a jeho množství by mělo být například od 0,02 do 1 mg/ml. Kompozice může také obsahovat chlorid sodný nebo chlorid draselný, výhodně v množství vyšším než 0,1 mol.

25 Kompozice výhodně obsahuje vápenatou sůl, jako je chlorid vápenatý nebo glukonát vápenatý, výhodně v množství větším než 0,5 mmol, a aminokyselinu, jako je L-histidin, v množství větším než 1 mmol, přičemž toto množství by se mělo volit od 0,05 do 500 mmol. Monosacharidy nebo disacharidy, jako je sacharóza nebo cukrové alkoholy, by se měly přidávat v množství od 1 do 300 mg/ml.

30 Kompozice obsahuje výhodně L-histidin a sacharózu. V kompozici je poměr chloridu sodného k L-histidinu výhodně vyšší než 1:1.

Kompozice může obsahovat

- 35 i) 10 až 100 000 mezinárodních jednotek na ml rekombinantního faktoru VIII,
- ii) alespoň 0,01 mg/ml polyoxyethylen (20) esteru mastné kyseliny,
- 40 iii) chlorid sodný, výhodně v množství větším než 0,1 mol,
- iv) vápenatou sůl, jako je chlorid vápenatý nebo glukonát vápenatý, výhodně v množství větším než 0,5 mmol a
- 45 v) aminokyselinu, jako je L-histidin, v množství větším než 1 mmol.

K této kompozici se mohou přidat monosacharidy, disacharidy nebo cukrové alkoholy, výhodně sacharóza.

50 Kompozice může být v suché formě, výhodně lyofilizovaná, nebo ve vodném roztoku před nebo po sušení. Suchý produkt se rekonstruuje sterilní vodou pro injekce nebo roztokem pufru.

Kompozice chráněná v náročí může být také stabilním vodným roztokem připraveným pro

55

Vynález se také týká kompozic, ve kterých specifická aktivita r-VIII SQ je větší než 12 000 mezinárodních jednotek na mg proteinu, výhodně větší než 14 000 mezinárodních jednotek na mg.

- 5 Kompozice chráněná v nárocích se může připravit smícháním faktoru VIII s neionovou povrchově aktivní látkou ve vodném roztoku, výhodně dohromady s aminokyselinou, jako je L-histidin, solí sodíku, sacharózou a vápenatou solí nebo eluováním faktoru VIII z posledního čistícího stupně pufrem obsahujícím neionovou povrchově aktivní látku ve vodném roztoku, výhodně dohromady s aminokyselinou, jako je L-histidin, solí sodíku, sacharózou a vápenatou solí.

- 10 Tento vynález se také týká neionové povrchově aktivní látky, výhodně zvolené z blokových kopolymerů, s výhodou polyoxameru nebo polyoxyethylen (20) esteru mastné kyseliny, výhodně polysorbátu 20 nebo polysorbátu 80, jako stabilizátoru pro kompozici obsahující koagulační faktor VIII.

- 15 Aminokyselina se používá k pufrování systému a také chrání protein v amorfní fázi. Vhodným pufrem může být L-histidin, lysin nebo arginin. L-Histidin se volí především, protože dobrá pufrovací kapacita L-histidinu je okolo pH 7.

- 20 Sacharóza nebo cukrový alkohol se mohou také přidat k ochraně proteinu.

- 25 Vápník (nebo dvojmocné iony tohoto kovu) se může přidávat ve formě chloridu vápenatého (CaCl_2), ale mohou se použít i jiné soli, jako glukonát vápenatý, glukonát vápenatý nebo gluceptát vápenatý, pokud je to nutné pro udržení spojení faktoru VIII s těžkým a lehkým řetězcem.

- 30 Hodnoty obsažené v příkladech ukazují, že r-VIII SQ je stabilní po dobu nejméně měsíců, pokud se skladuje za teploty $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

- 35 Dále uvedené příklady ilustrují vynález a uvádějí hodnoty stability pro různé prostředky, které ve všech případech spadají do rozsahu patentové ochrany. přitom rozsah ochrany není omezen na tyto příklady.

- 40 Přehled obrázku na výkresech

Dále uvedené obr. jsou ilustrací vynálezu:

- 45 Obr. 1 zobrazuje výsledek gelové filtrační vysoko účinné kapalinové chromatografie (HPLC-gelfiltration) sloučeniny z příkladu 10N, která byla skladována po dobu 5 měsíců za teploty 25°C .

- Obr. 2 zobrazuje výsledek gelové filtrační vysoko účinné kapalinové chromatografie sloučeniny z příkladu 10B, která byla skladována po dobu 5 měsíců za teploty 30°C .

Příklady provedení vynálezu

- 50 Experimentální údaje

Materiál a metody

- 55 Příprava rekombinantního faktoru VIII SQ (r-VIII SQ) se v podstatě provádí jak je popsáno v patentu WO 91/09 122, v příkladech 1 až 3. DHFR deficiantní CHO buněčná linie (celline)

(DG44N.Y.) se elektroporuje s expresním vektorem obsahujícím r-VIII SQ gen a expresním vektorem obsahujícím gen dihydrofolát-reduktázy. Následující selekce na kolonie přežívající v selektivním prostředí se zesílí růstem v postupně zvyšovaném množství methotrexátu. Supernatant z výsledných kolonií se jednotlivě třídí s ohledem, na aktivitu VIII:C. vybere se
 5 produkční klon, který se postupně adaptuje na růstovou suspenzi zbavenou séra v definovaném prostředí a nakonec se vyvine fermentační proces pro velké měřítko. po určitých časových obdobích se zachytí supernatant a následně čistí, jak je popsáno dále.

Čištěné upravené prostředí se nastaví na hodnotu pH a aplikuje na kolonu naplněnou S-Sepharose FF. Po promytí se eluuje faktor VIII pufrovací solí, která obsahuje 5 mmol chloridu vápenatého.
 10

Imunoadsorpce se provádí na imunoafinitní pryskyřici, kde ligandem je monoklonální protilátka (8A4) zaměřená na faktor VIII s těžkým řetězcem. Před naplněním kolony se S-eluát zpracuje s 0,3 % TNBP a 1 % Octoxynolu 9.
 15

Kolona se ekvilibruje, promyje a faktor VIII se eluuje pufrem, který obsahuje 0,05 mol chloridu vápenatého a 50 % ethylenglykolu.

mAb-eluát se vnese na kolonu naplněnou Q-Sepharose FF a ekvilibruje elučním pufrem v imunoafinitním stupni. Po 4-milimolárním chloridem vápenatým a 0,6-molárním chloridem sodným při hodnotě pH 6,8.
 20

Q-eluát se aplikuje na gelovou filtrační kolonu (Superdex 200 p.g.). Ekvilibracer a eluování se provádí s formulací, která obsahuje chlorid sodný, L-histidin, chlorid vápenatý a polysorbát 80.
 25

Vrcholné množství proteinu se zachytí a roztok se formuluje před lyofilizací.

Aktivita VIII:C a koncentrace neaktivních složek se upraví zředěním vhodným pufrem. Roztok se potom sterilně filtruje (0,22 μ m), rozdělí a lyofilizuje. Vzorky z každé kompozice se vymrazí a skladují za teploty -70 °C. tyto vzorky se nechají rozmraznout a použijí jako referenční během zkoušky VIII:C.
 30

Koagulační aktivita VIII:C se stanovuje chromogenní substrátovou zkouškou (Coatest Factor VIII, Chromogenix AB, Mölndal, Švédsko). Aktivovaný faktor X (Xa) se tvoří cestou s vnitřní dráhou, kde faktor VIII:C působí jako kofaktor. Faktor Xa se potom stanoví za použití syntetického chromogenního substrátu S-2222 v přítomnosti inhibitoru thrombinu I-2581, aby se zabránilo hydrolyze substrátu thrombinem. Reakce se zastaví přidávkem kyseliny a VIII:C, který je v proporcionálním množství k uvolněnému p-nitroanilinu (pNA), se stanoví fotometricky při
 35 vlnové délce 450 nm proti slepému pokusu s reakčními činidly. Jednotka faktoru VIII:C se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách (IU), jak jsou definovány současným mezinárodním koncentrátovým standardem (IS) založeným Mezinárodní zdravotnickou organizací (WHO).
 40

Výtěžek (znovuzískání) VIII:C je ve všech případech vypočten jako procento VIII:C v rekonstituovaném roztoku dělené VIII:C ve vymraženém stavu a rozmrazeném roztoku z lyofilizovaného produktu, s příslušnou úpravou ředěním.
 45

Rozpustné agregáty se stanovují gelovou filtrací. Kolona naplněná Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia) se použije s fluorescenčním detektorem (exitace při vlnové délce 280 nm, emisí vlnová délka 340 nm). Rekonstituovaný prostředek se analyzuje. Ohodnocení výsledků po gelové filtraci se provádí vizuálním hodnocením chromatografů nebo integrací ploch pík, pokud se zjistí agregáty.
 50

Výtěžek po lyofilizaci se vždy vyjadřuje v procentech z hodnoty ve zmrazeném stavu.
 55

Procenta, která se týkají množství složky v kompozici, jsou vždy uváděna jako procenta hmotnostní na jednotku objemu, neboli procenta hmotnostně objemová.

5 Příklad 1

Porovnání mezi albuminem a neionovou povrchově aktivní látkou

Rekombinantní faktor VIII se připraví způsobem popsaným pod experimentálními údaji.

10

2 ml roztoku se lyofilizují a poté rekonstruují v objemu 5 ml sterilní vody pro injekce.

Pracuje se s těmito kompozicemi:

	1A	1B	1C	1D
L-Histidin, mmol	50	50	50	50
Chlorid sodný, mol	0,6	0,6	0,6	0,6
Chlorid vápenatý, mmol	4	4	4	4
Polysorbát 80, %	–	–	0,02	–
Polyethylenglykol-4000, %	0,1	0,1	–	–
Albumin, %	–	1	–	1
VIII:C, dávka mezinárodních jednotek na ml	250	250	250	250
Výtěžek, mezinárodních jednotek na ml po rekonstituci	83	197	232	222

15

Tento příklad ukazuje, že nejsou rozdíly ve výtěžku (znovuzískání) faktoru VIII:C, pokud se použije neionová povrchově aktivní látka nebo albumin.

20 Příklad 2

Porovnání mezi neionovými povrchově aktivními látkami o různé síle

Rekombinantní faktor VIII se připraví způsobem popsaným pod experimentálními údaji.

25

2 ml roztoku se lyofilizují a poté rekonstruují v objemu 2 ml sterilní vody pro injekce.

Pracuje se s těmito kompozicemi:

	2A	2B	2C
L-Histidin, L-glutamát ekvimolární množství mg/ml	10	10	10
Chlorid sodný, %	2	2	2
Chlorid vápenatý, mg/ml	0,1	0,1	0,1
Polysorbát 80, %	–	0,001	0,01
VIII:C, dávka mezinárodních jednotek na ml	300	300	300
Výtěžek, mezinárodních jednotek na ml po rekonstituci			
Počáteční	69	133	228
3,5 hodiny*	43	140	222
7 hodin*	49	133	204

30

* skladováno jako rekonstituovaný roztok za teploty místnosti

Zde se jasně ukazuje překvapivě dobrý stabilizační účinek na faktor VIII, pokud se použije neionová povrchově aktivní látka.

35

Příklad 3

Změny koncentrace neionové povrchově aktivní látky

5

Rekombinantní faktor VIII se připraví způsobem popsáním pod experimentálními údaji.

2 ml roztoku se lyofilizují a poté rekonstituují v objemu 5 ml sterilní vody pro injekce.

	3A	3B	3C	3D	3E
L-Histidin, mmol	50	50	50	50	50
Chlorid sodný, mol	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
Chlorid vápenatý, mmol	4	4	4	4	4
Polysorbát 80, %	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
Výtěžek po rekonstituci, %	91	90	93	99	100

10

Výsledky tohoto pokusu ukazují, že výtěžek faktoru VIII (VIII:C) je velmi vysoký po rekonstituci a dobrý pro všechny koncentrace použitého polysorbátu 80.

15 Příklad 4

Změny koncentrace chloridu sodného

Rekombinantní faktor VIII se připraví způsobem popsáním pod experimentálními údaji.

20

2 ml roztoku se lyofilizují, skladují za rozdílných teplot po dobu až do 6 měsíců poté rekonstituují v objemu 5 ml sterilní vody pro injekce.

	4A	4B
L-Histidin, mmol	50	50
Chlorid sodný, mol	0,3	0,6
Chlorid vápenatý, mmol	4	4
Polyethylenglykol-4000, %	0,1	0,1
Polysorbát 80, %	0,025	0,025
Výtěžek, %, počáteční skladováno při 8 °C	85	86
3 měsíce	88	87
4 měsíce	87	83
6 měsíců	87	83
skladováno při 25 °C		
1 měsíc	92	93
3 měsíce	87	79
4 měsíce	84	81
6 měsíců	85	85
skladováno při 37 °C		
1 měsíc	88	90
3 měsíce	80	80
4 měsíce	80	77
6 měsíců	81	80
skladováno při 50 °C		
1 měsíc	84	89
3 měsíce	77	77
4 měsíce	73	70

25 0,3 nebo 0,6 mol chloridu sodného se projevuje velmi dobrou stabilitou. Oba prostředky jsou stabiální po dobu 6 měsíců za teploty 37 °C.

Příklad 5

Změny koncentrace L-histidinu

5

Rekombinantní faktor VIII se připraví způsobem popsaným pod experimentálními údaji.

2,2 ml roztoku se lyofilizuje, skladuje za rozdílných teplot po dobu až do 3 měsíců a poté rekonstituuje v objemu 5 ml sterilní vody pro injekce.

10

		5A	5B
L-Histidin, mmol		46	59
Chlorid sodný, mol		0,31	0,31
Chlorid vápenatý, mmol		3,7	3,7
Polyethylenglykol-4000, %		0,091	0,091
Polysorbát 80, %		0,364	0,364
Výtěžek, %			
skladováno při 8 °C	počátek	78	84
	3 měsíce	70	76
skladováno při 25 °C	1 měsíc		
	3 měsíce	69	74
skladováno při 37 °C	1 měsíc	76	85
	3 měsíce	61	48
skladováno při 50 °C	1 měsíc	60	73
	3 měsíce	44	48

Tento příklad ukazuje, že použítá rozdílná množství L-histidinu nemají vliv na stabilitu.

15 Příklad 6

Rekombinantní faktor VIII se připraví způsobem popsaným pod experimentálními údaji.

	6A	6B
L-Histidin, mmol	65	65
Chlorid sodný, mol	0,3	0,3
Chlorid vápenatý, mmol	4	4
Polyethylenglykol-4000, %	0	0,1
Tween 80, %	0,025	0,025

20 Tyto roztoky se lyofilizují a rozmrazí jednou, pětkrát a desetkrát a dojde se k těmto výtěžkům:

	6A	6B
	IU/ml	IU/ml
studený	298	291
1 zmrazení	293	293
5 zmrazení	295	295
10 zmrazení	290	288

25 Tyto studie ukazují, že VIII:C je stabilní po opakování cyklů lyofilizace a rozmrazování, a dále že polyethylenglykol-4000, o kterém se předpokládá, že působí jako kryoprotektivní činidlo, není nezbytný v tomto prostředku.

Příklad 7

Změny hodnoty pH

5

Rekombinantní faktor VIII se připraví způsobem popsáním pod experimentálními údaji.

2,2 ml roztoku se lyofilizují a poté rekonstruují v objemu 5 ml sterilní vody pro injekce.

	7A	7B	7C	7D
L-Histidin, mmol	65	65	65	65
Chlorid sodný, mol	0,3	0,3	0,3	0,3
Chlorid vápenatý, mmol	4	4	4	4
Polysorbát 80, %	0,025	0,025	0,025	0,025
Hodnota pH	6,0	6,5	7,0	7,5
Výtěžek, %, počátek	74	70	78	79
3 hodiny*	73	80	78	77

10

* skladováno jako rekonstituovaný roztok za teploty místnosti

Tento příklad ukazuje, že hodnota pH nemá signifikantní důležitost přibližně od hodnoty 6,0 do 7,5.

15

Příklad 8

Přídavek sacharózy

20

Rekombinantní faktor VIII se připraví způsobem popsáním pod experimentálními údaji.

2,2 ml roztoku se lyofilizují a poté rekonstruují v objemu 5 ml sterilní vody pro injekce.

	8A	8B
L-Histidin, mmol	58	20,5
Chlorid sodný, mol	0,3	0,3
Chlorid vápenatý, mmol	3,7	3,7
Sacharóza, mmol	0	13,3
Polysorbát 80, %	0,025	0,025

25

Sacharóza se přidává k roztoku B po konečném čistícím stupni před lyofilizací.

Výtěžek po lyofilizaci činí 76 % pro A a 87 % pro B. Stejná aktivita se zjistí 4 hodiny po rekonstituci, při skladování za teploty místnosti.

30

Tato studie ukazuje, že přídavek sacharózy je příznivý pro výtěžek VIII:C po lyofilizaci.

Příklad 9

35

Změny vápenaté soli

Rekombinantní faktor VIII se připraví způsobem popsáním pod experimentálními údaji.

2 ml roztoku se lyofilizují a poté rekonstruují v objemu 5 ml sterilní vody pro injekce.

40

	9A	9B	9C	9D
L-Histidin, mmol	23	23	23	23
Chlorid sodný, mol	0,34	0,34	0,34	0,34
Chlorid vápenatý, mmol	4	4	0,15	0,15
Polysorbát 80, %	0,025	0,025	0,025	0,025
Sacharóza, mmol	–	10	–	10
Glukonát vápenatý, mmol	0	0	6	6
Výtěžek, %, počáteční	63	74	74	78
4 hodiny*	60	73	73	77

* skladováno jako rekonstituovaný roztok za teploty místnosti

- 5 Tento pokus ukazuje, že chlorid vápenatý se může nahradit glukonátem vápenatým.

Příklad 10

- 10 Rekombinantní faktor VIII se připraví způsobem popsaným pod experimentálními údaji.

2,2 ml roztoku se lyofilizují a poté rekonstituují v objemu 5 ml sterilní vody pro injekce. Obsah VIII:C na lékovku v rekonstituovaném prostředku odpovídá přibližně 1000 mezinárodním jednotkám.

15

	10A	10B
L-Histidin, mmol	14,7	58
Chlorid sodný, mol	0,31	0,31
Chlorid vápenatý, mmol	3,7	3,7
Sacharóza, mmol	19,9	–
Polysorbát 80, %	0,025	0,025
Výtěžek, mezinárodních jednotek na ml po rekonstrukci		
Počáteční	213	198
4 hodiny, 25 °C	213	198
24 hodin, 25 °C	201	182
Výtěžek, %		
Počáteční	92	91
5 měsíců, při 25 °C	88	–
5 měsíců, při 30 °C	76	85
12 měsíců, při 7 °C	89	97

Výtěžek je dobrý, pokud se část L-histidinu nahradí sacharózou.

- 20 Tyto prostředky se studují za použití gelové filtrace po skladování během 5 měsíců za teploty 25 a 30 °C a výsledky jsou uvedeny na obr. 1 a 2. Je vidět pouze pík při hodnotě 42, co ukazuje na faktor VIII:C a pík při hodnotě 70, co odpovídá histidinu. Agregáty se mají nacházet dříve než je hodnota 40. Z obr. 1 může být zřejmé, že žádné detekovatelné množství agregátů se nenajde po skladování během 5 měsíců za teploty 25 °C pro látku z příkladu 10A. Obr. 2 ukazuje na malá množství agregátů, které je menší než 2 %, po skladování během 5 měsíců za teploty 30 °C pro látku z příkladu 10B.
- 25

Příklad 11

- 30 Rekombinantní faktor VIII se připraví způsobem popsaným pod experimentálními údaji.

2,2 ml roztoku se lyofilizují a poté rekonstruují v objemu 5 ml sterilní vody pro injekce. Obsah VIII:C na lékovku v rekonstituovaném prostředku činí přibližně 500 mezinárodních jednotek.

	11A	11B
L-Histidin, mmol	14,7	58
Chlorid sodný, mol	0,31	0,31
Chlorid vápenatý, mmol	3,7	3,7
Sacharóza, mmol	19,9	–
Polysorbát 80, %	0,025	0,025
Výtěžek, mezinárodních jednotek na ml po rekonstrukci		
Počáteční	98	105
4 hodiny, při 25 °C	96	103
24 hodin, při 25 °C	93	101
Výtěžek, %		
Počáteční	91	93
skladováno při 25 °C, 5 měsíců	89	87
skladováno při 30 °C, 5 měsíců	76	79
skladováno při 7 °C, 12 měsíců	88	89

- 5 Oba prostředky ukazují dobrou stabilitu. Tyto prostředky se studují gelovou filtrací a výsledky jsou podobné jako je uvedeno na obr. 1 a 2.

Nedochází k žádné agregaci, pokud se prostředky skladují po dobu 5 měsíců za teploty 25 a 30 °C.

10

Příklad 12

Rekombinantní faktor VIII se připraví způsobem popsaným pod experimentálními údaji.

15

2 ml roztoku se lyofilizují, skladují za rozdílných teplot až po dobu 3 měsíců a poté rekonstruují v objemu 4 ml sterilní vody pro injekce. Obsah VIII:C na lékovku v rekonstituovaném prostředku činí přibližně 500 mezinárodních jednotek.

	12A	12B
Mannitol, mg/ml	20	20
L-Histidin, mg/ml	2,67	2,67
Chlorid sodný, mg/ml	18	18
Chlorid vápenatý, mmol	3,7	3,7
Polysorbát 80, %	0,23	0,23
Výtěžek, %		
Počáteční	91	93
skladováno při 7 °C, 12 měsíců	90	85

20

Přijatelné stability se dosáhne po skladování během 5 měsíců za teploty 7 °C.

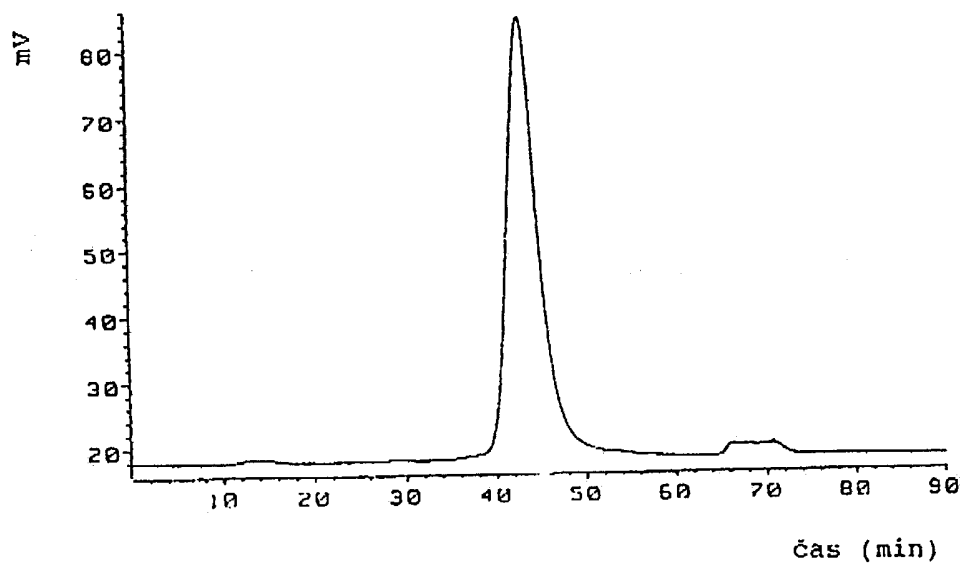
PATENTOVÉ NÁROKY

5

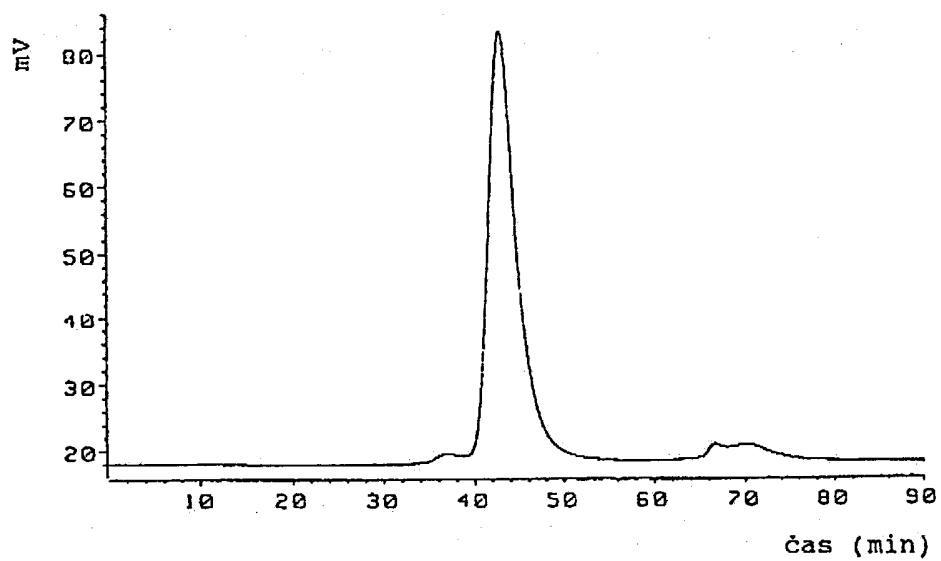
1. Kompozice stabilní při skladování, obsahující koagulační faktor VIII a neiontovou povrchově aktivní látku, která je ve vodném roztoku, popřípadě lyofilizovaná a rekonstituovatelná vodou na vodný roztok, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že koagulační faktor VIII je rekombinantní, se specifickou aktivitou větší než 2 000 mezinárodních jednotek na mg proteinu a neiontová povrchově aktivní látka je obsažena v množství odpovídajícím alespoň 0,01 mg na ml vodného roztoku, a kompozice obsahuje dále chlorid sodný nebo draselný v množství odpovídajícím více než 0,1 mol na ml vodného roztoku a L-histidin v množství odpovídajícím více než 1 mmol na ml vodného roztoku, přičemž kompozice je prosta albuminu.
- 15 2. Kompozice podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že specifická aktivita faktoru VIII je větší než 5 000 mezinárodních jednotek na mg proteinu.
3. Kompozice podle některého z nároků 1 a 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že v ní obsažený faktor VIII je plné délky nebo je derivátem rekombinantního faktoru VIII upraveným delecí.
- 20 4. Kompozice podle některého z nároků 1 až 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že množství faktoru VIII je 10 až 100 000 mezinárodních jednotek na ml vodného roztoku, výhodně 50 až 10 000 mezinárodních jednotek na ml vodného roztoku.
- 25 5. Kompozice podle některého z nároků 1 až 4, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že neiontová povrchově aktivní látka je obsažena v množství nad kritickou koncentrací micel.
6. Kompozice podle některého z nároků 1 až 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že neiontová povrchově aktivní látka je zvolena z polyoxyethylen (20) esterů mastné kyseliny, výhodně je jí polysorbát 20 nebo polysorbát 80.
- 30 7. Kompozice podle některého z nároků 1 až 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že neiontová povrchově aktivní látka je zvolena z blokových kopolymerů, výhodně je jí poloxamer.
- 35 8. Kompozice podle některého z nároků 1 až 7, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje vápenatou sůl, jako je chlorid vápenatý nebo glukonát vápenatý, výhodně v množství odpovídajícím více než 0,1 mol na ml vodného roztoku.
9. Kompozice podle některého z nároků 1 až 8, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje monosacharidy nebo disacharidy, výhodně sacharózu nebo cukrové alkoholy, v množství odpovídajícím 1 až 300 mg na ml vodného roztoku.
- 40 10. Kompozice podle některého z nároků 1 až 9, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje L-histidin v množství odpovídajícím více než 1 mmol na ml vodného roztoku a sacharózu v množství odpovídajícím 1 až 300 mg na ml vodného roztoku.
- 45 11. Kompozice podle některého z nároků 8 až 10, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že poměr chloridu sodného k L-histidinu je v kompozici vyšší než 1:1, uvedeno hmotnostně.
- 50 12. Kompozice podle nároku 8, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje
 - i) 10 až 100 000 mezinárodních jednotek rekombinantního faktoru VIII v množství odpovídajícím ml vodného roztoku,

- ii) alespoň 0,01 mg polyoxyethylen (20) esteru mastné kyseliny v množství odpovídajícím ml vodného roztoku,
- 5 iii) chlorid sodný, v množství odpovídajícím více než 0,1 mol na ml vodného roztoku,
- iv) vápenatou sůl, jako je chlorid vápenatý nebo glukonát vápenatý, výhodně v množství odpovídajícím více než 0,5 mmol na ml vodného roztoku a
- 10 v) L-histidin, v množství odpovídajícím více než 1 mmol na ml vodného roztoku.
13. Kompozice podle některého z nároků 1 až 12, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je v suché formě.
14. Kompozice podle nároku 13, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je v lyofilizované formě.
- 15 15. Způsob výroby kompozice podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že v nepřítomnosti albuminu se koagulační faktor VIII uvádí mícháním do styku s neiontovou povrchově aktivní látkou ve vodném roztoku v přítomnosti chloridu sodného nebo draselného a L-histidinu jako pufru.
- 20 16. Způsob podle nároku 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje smíchání uvedeného faktoru VIII s L-histidinem, chloridem sodným, sacharózou a vápenatou solí.
- 25 17. Způsob podle některého z nároků 15 a 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje smíchání uvedeného faktoru VIII s neiontovou povrchově aktivní látkou, L-histidinem, chloridem sodným, sacharózou a vápenatou solí za vzniku produktu, který se dále podrobí lyofilizaci.
- 30

1 výkres



Obr. 1



Obr. 2

Konec dokumentu
