

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

300 547

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-2996**
(22) Přihlášeno: **22.02.2000**
(30) Právo přednosti: **22.02.1999 US 1999/255279**
01.12.1999 US 1999/452752
(40) Zveřejněno: **13.03.2002**
(Věstník č. 3/2002)
(47) Uděleno: **04.05.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **10.06.2009**
(Věstník č. 23/2009)
(86) PCT číslo: **PCT/US2000/040068**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/048635**

(56) Relevantní dokumenty:

EP 818 204; WO 94/07510; WO 94/26286.

Hart H. F. et. al. 1994 Vox Sang. 67, 345-350; Burnouf T. 1991 Vox Sang. 60, 8-15.

(73) Majitel patentu:

UNIVERSITY OF CONNECTICUT, Farmington, CT,
US

BAXTER INTERNATIONAL INC., Deerfield, IL, US

(72) Původce:

Besman Marc, Studio City, CA, US

Bjornson Erik, Studio City, CA, US

Jameel Feroz, Covina, CA, US

Kashi Ramesh, Walnut, CA, US

Pikal Michael, Mansfield Center, CT, US

Tchessalov Serguei, Storms, CT, US

Carpenter John, Littleton, CO, US

(74) Zástupce:

JUDr. Ing. Michal Guttmann, Nad Štolou 12, Praha 7,
17000

(54) Název vynálezu:

Nové formulace faktoru VIII prosté albuminu

(57) Anotace:

Kompozice faktoru VIII formulovaná bez albuminu, obsahuje kromě faktoru VIII následující formulační vehikula: 4 % až 10 hmotn./obj. % objemového činidla, vybraného ze skupiny sestávající z mannitolu, glycinu a alaninu; 1 % až 4 hmotn./obj. % stabilizačního činidla vybraného ze skupiny sestávající ze sacharózy, trehalózy, rafinózy, argininu; 1 až 5 mM vápenaté soli; 100 až 300 mM NaCl a pufrovací činidlo pro udržení pH v rozmezí 6 až 8. Použití této kompozice pro přípravu léčiva pro léčení hemofilie.

CZ 300547 B6

Nové formulace faktoru VIII prosté albuminu

Oblast techniky

5

Vynález se týká nových formulací faktoru VIII prostých albuminu.

Dosavadní stav techniky

10

Faktor VIII je protein nacházející se v krevní plazmě, který se jako kofaktor účastní kaskády reakcí vedoucích ke srážení krve. Nedostatečná aktivita faktoru VIII v krvi má za následek poruchu srážlivosti krve známou jako hemofilie A, dědičný stav postihující především muže. Hemofilie A je v současné době léčena terapeutickými přípravky odvozenými z lidské plazmy nebo vytvořenými použitím technologie rekombinantní DNA. Tyto přípravky jsou aplikovány v případech náhlého krvácení (okamžitá terapie) nebo několikrát, v pravidelných intervalech, jako prevence nekontrolovatelného krvácení (profylaxe).

U faktoru VIII je známo, že je v terapeutických přípravcích relativně nestabilní. V krevní plazmě je faktor VIII obvykle komplexován s dalším plazmatickým proteinem, von Willebrand faktorem (vWF), který je v plazmě přítomen ve velkém molárním přebytku vůči faktoru VIII, a má se za to, že chrání faktor VIII před předčasným rozpadem. Dalším proteinem v plazmě je albumin, který může také hrát významnou roli ve stabilizaci faktoru VIII *in vivo*. Proto u přípravků obsahujících faktor VIII prodáváných v současné době, se v první řadě spoléhá na použití albuminu a/nebo vWF proteinu ke stabilizaci faktoru VIII během jejich výroby a uskladnění.

Ačkoliv albumin a vWF používané v přípravcích faktoru VIII dostupných na současném trhu jsou odvozené z lidské krevní plazmy, má použití těchto materiálů jisté nevýhody. Protože velký molární přebytek albuminu ve srovnání s faktorem VIII je přidáván za účelem zvýšení stability faktoru VIII v těchto přípravcích, je těžké charakterizovat protein faktor VIII v těchto přípravcích jako takový. Přídavek lidského albuminu do faktoru VIII je chápán jako nevýhoda, pokud jde o přípravky faktoru VIII produkované rekombinantním postupem. Je to proto, že přípravky rekombinantního faktoru VIII, bez přítomnosti albuminu, by takto neměly obsahovat žádný lidský protein a teoretické riziko přenosu viru by mělo být redukováno.

35

Bylo popsáno mnoho pokusů připravit faktor VIII bez albuminu nebo vWF (nebo s relativně nízkým obsahem těchto nosičů). Např. v patentu US 5 565 427 (EP 508 194) (patřící firmě Behringwerke) Freudenberg popisuje přípravky faktoru VIII, které obsahují určité kombinace detergentů a aminokyselin, specificky argininu a glycinu, vedle vehikul jako jsou chlorid sodný a sacharóza. Detergent polysorbát 20 nebo polysorbát 80, je přítomen v množství 0,001 až 0,5 % (obj./obj.), zatímco arginin a glycin jsou přítomny v množství 0,01 až 1 mol/l. Obsah sacharózy je 0,1 až 10 %. Příklad 2 tohoto vynálezu poukazuje na fakt, že roztoky (1), které obsahují 0,75 % sacharózy, 0,4 M glycinu a 0,15 M NaCl, a (2), které obsahují 0,01 M citrátu sodného, 0,08 M glycinu, 0,016 M lysinu, 0,0025 M chloridu vápenatého a 0,4 M chloridu sodného, byly po 16 hodinách nestabilní, zatímco roztoky (3), které obsahují 1 % sacharózy, 0,14 M argininu, 0,1 M chloridu sodného a (4), které obsahují 1 % sacharózy, 0,4 M glycinu, 0,14 M argininu, 0,1 M chloridu sodného, a 0,05 % Tween 80 byly stabilní.

V patentu US 5 763 401 (EP 818 204) (patřící firmě Bayer) Nayer také popisuje terapeutickou formulaci faktoru VIII bez albuminu, obsahující 15 až 60 mM sacharózy, do 50 mM NaCl, do 5 mM chloridu vápenatého, 65 až 400 mM glycinu a do 50 mM histidinu. Následná specifická složení byla identifikována jako stabilní: (1) 150 mM NaCl, 2,5 mM chloridu vápenatého a 165 mM mannitolu; a (2) 1 % sacharózy, 30 mM chloridu sodného, 2,5 mM chloridu vápenatého, 20 mM histidinu a 290 mM glycinu. Bylo zjištěno, že složení obsahující větší množství cukru

(10 % maltózy, 50 mM NaCl, 2,5 mM chloridu vápenatého a 5 mM histidinu) vykazuje nízkou stabilitu v lyofilizovaném stavu, v porovnání se složením (2).

V patentu US 5 733 873 (EP 627 924) (patřící firmě Pharmacia & Upjohn) Osterberg popisuje formulace, které obsahují 0,01 až 1 mg/ml povrchově aktivní látky. Tento patent popisuje formulace, které mají následující obsah vehikul: polysorbát 20 nebo 80 v množství nejméně 0,01 mg/ml, výhodně 0,02 až 1,0 mg/ml; nejméně 0,1 M NaCl; nejméně 0,5 mM vápenaté soli a nejméně 1 mM histidinu. Zvláště pak se zabývá následujícími specifickými formulacemi: (1) 14,7 – 50 – 65 mM histidinu, 0,31 až 0,6 M NaCl, 4 mM chloridu vápenatého, 0,001–0,02–0,025 % polysorbátu 80, s nebo bez 0,1 % PEG 4 000 nebo 19,9 mM sacharózy a (2) 20 mg/ml mannitolu, 2,67 mg/ml histidinu, 18 mg/ml NaCl, 3,7 mM chloridu vápenatého a 0,23 mg/ml polysorbátu 80.

Byly také popsány další pokusy použít nízké nebo vysoké koncentrace chloridu sodného. V patentu US 4 877 608 (EP 315 968) (patřící firmě Rhone-Poulenc Rorer) Lee popisuje formulace s relativně nízkou koncentrací chloridu sodného, jmenovitě formulace obsahují 0,5 mM až 15 mM NaCl, 5 mM chloridu vápenatého, 0,2 mM až 5 mM histidinu, 0,01 až 10 mM lysin-hydrochloridu a do 10 % cukru. „Cukrem“ může být až do 10 % maltózy, 10 % sacharózy nebo 5 % manitolu.

V patentu US 5 605 884 (EP 0 314 095) (patřící firmě Rhone-Poulenc Rorer) Lee popisuje použití formulací s relativně vysokou koncentrací chloridu sodného. Tyto formulace obsahují 0,35 M až 1,2 M NaCl, 1,5 až 40 mM chloridu vápenatého, 1 mM až 50 mM histidinu a do 10 % „cukru“ jako je mannitol, sacharóza nebo maltóza. Formulace obsahující 0,45 M NaCl, 2,3 mM chloridu vápenatého a 1,4 mM histidinu je doložen příkladem.

Mezinárodní patentová přihláška WO 96/22107 (patřící firmě Quadrant Holdings Cambridge Limited) Roser popisuje formulace, které obsahují cukr trehalózu. Tyto formulace obsahují: (1) 0,1 M NaCl, 15 mM chloridu vápenatého, 15 mM histidinu a 1,27 M (48 %) trehalózy nebo (2) 0,011 % chloridu vápenatého, 0,12 % histidinu, 0,002 % Tris, 0,002 % Tween 80, 0,004 % PEG 3350, 7,5 % trehalózy a buď 0,13 %, nebo 1,03 % NaCl.

Další terapeutické formulace faktoru VIII ze stavu techniky obecně obsahují albumin a/nebo vWF za účelem stabilizace faktoru VIII, a tudíž nejsou důležité pro současný vynález. Např. v patentu US 5 328 694 (EP 511 234) (patřící firmě Octapharma AG) Schwinn popisuje formulaci, která obsahuje 100 až 650 mM disacharidu a 100 mM až 1,0 M aminokyseliny. Specificky jsou popsány následující formulace: (1) 0,9 M sacharózy, 0,25 M glycinu, 0,25 M lysinu a 3 mM chloridu vápenatého; a (2) 0,7 M sacharózy, 0,5 M glycinu a 5 mM chloridu vápenatého.

Přestože bylo učiněno několik pokusů vytvořit faktor VIII bez albuminu nebo vWF, stále je zde potřeba terapeutických formulací faktoru VIII, které jsou stabilní bez přítomnosti albuminu nebo jiných proteinů.

45 Podstata vynálezu

1. Současný vynález se týká terapeutických kompozic faktoru VIII, které jsou stabilní bez přítomnosti albuminu. Zvláště se tento vynález týká Kompozice faktoru VIII, formulovaná bez přídavku albuminu k uvedené kompozici, vyznačující se tím, že kromě faktoru VIII obsahuje následující formulační vehikula:

4 % až 10 hmotn./obj. % objemového činidla vybraného ze skupiny sestávající z mannitolu, glycinu a alaninu; 1 % až 4 hmotn./obj. % stabilizátoru vybraného ze skupiny sestávající ze sacharózy, trehalózy, rafinózy a argininu; 1 až 5 mM vápenaté soli; 100 až 300 mM NaCl; a pufrovací činidlo pro udržení pH na hodnotě mezi 6 a 8. Tato kompozice může případně obsahovat

povrchově aktivní látku jako polysorbát 20, polysorbát 80, Pluronic F68 nebo Brij 35. Je-li povrchově aktivní látka polysorbát 80, může být přítomna v množství menším než 0,1 hmotn./obj. %.

Výhodná koncentrace pufovacího činidla kompozic faktoru VIII tohoto vynálezu je od 10 do 50 mM, a je vybráno ze skupiny sestávající z histidinu, Tris, BIS-Tris Propanu, PIPES, MOPS, HEPES, MES a ACES. Výhodné pufovací činidlo je buď histidin nebo Tris. Kompozice faktoru VIII tohoto vynálezu může dále obsahovat antioxidant.

Kompozice faktoru VIII tohoto vynálezu zahrnují jak objemové činidlo tak stabilizátor. Objemové činidlo může být přítomno v množství od asi 6 % do asi 8 hmotn./obj. %, výhodně asi 8 hmotn./obj. %. Výhodné množství stabilizátoru je asi 2 hmotn./obj. %. V těchto kompozicích je také zastoupen chlorid sodný, výhodně v množství od 150 do 350 mM a výhodněji v množství asi 225 mM. Vápenatou soli v kompozici je také výhodně chlorid vápenatý, a to výhodně v lyofilizované formě.

V dalším provedení může tento vynález obsahovat kompozici faktoru VIII, utvořenou bez přídavku albuminu, která zahrnuje následující složky, kromě faktoru VIII: 2 % až 6 hmotn./obj. % hydroxyetylovaného škrobu; 1 % až 4 hmotn./obj. % stabilizátoru vybraného ze skupiny sestávající ze sacharózy, trehalózy, rafinózy, argininu; 1 až 5 mM vápenaté soli; 100 až 300 mM NaCl a pufovacího činidla pro udržení pH přibližně mezi hodnotami 6 a 8. Výhodně takové kompozice obsahují asi 4 hmotn./obj. % hydroxyetylovaného škrobu a NaCl v množství 200 mM. Výhodné množství stabilizátoru je asi 2 hmotn./obj. %.

V dalším provedení tohoto vynálezu kompozice faktoru VIII, utvořená bez albuminu, obsahuje 300 až 500 mM NaCl; 1 % až 4 hmotn./obj. % stabilizátoru vybraného ze skupiny sestávající ze sacharózy, trehalózy, rafinózy, argininu, 1 až 5 mM vápenaté soli a pufovací činidlo pro udržení pH přibližně mezi hodnotami 6 a 8. Výhodně je koncentrace NaCl asi 400 mM.

V ještě dalším provedení tento vynález zahrnuje postup lyofilizace vodné kompozice faktoru VIII v nádobě za použití lyofilizéru, přičemž postup zahrnuje počáteční mrazicí krok a počáteční mrazicí krok dále zahrnuje kroky: (a) snižování teploty v lyofilizační komoře na teplotu nejméně asi -45°C ; (b) zvyšování teploty v lyofilizační komoře na hodnotu mezi asi -15 a -25°C a následně (c) snižování teploty v lyofilizační komoře na teplotu nejméně asi -45°C . V tomto postupu je výhodné, je-li teplota v komoře snižována nebo zvyšována v rozmezí mezi $0,5$ a $1,0^{\circ}\text{C}$ za minutu. V kroku (a) je teplota udržována výhodně po dobu 1 hodiny a je snižována na teplotu asi -55°C . V kroku (b) je teplota udržována výhodně mezi -15 a -25°C po dobu 1 až 3 hodiny a výhodněji je-li teplota -22°C , a teplota v kroku (c) je výhodně udržována po dobu 1 hodiny. Preferovaná kompozice faktoru VIII použitého v tomto postupu obsahuje mezi 4 % a 10 hmotn./obj. % činidla vybraného ze skupiny sestávající z mannitolu, glycinu a alaninu a dále obsahuje mezi 1 % a 4 hmotn./obj. % činidla vybraného ze skupiny sestávající ze sacharózy, trehalózy, rafinózy a argininu. Dále kompozice faktoru VIII použitá v tomto postupu také obsahuje mezi 100 a 300 mM NaCl.

Podrobný popis vynálezu

Definice

Jak zde bude používáno, termíny uvedené níže a jejich obměny jsou definovány následovně, není-li uvedeno jinak:

Faktor VIII – molekula faktoru VIII se vyskytuje přirozeně a v terapeutických přípravcích jako heterogenní distributor polypeptidů vznikajících jako produkt jednoho genu (viz, např. Andersson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2979–2983, květen 1986). Termín „faktor VIII“, jak bude dále používáno, se vztahuje na všechny takové polypeptidy, ať už odvozené z krevní plazmy

nebo produkované za použití techniky rekombinantní DNA. Příklady komerčně dostupných terapeutických přípravků obsahujících faktor VIII, zahrnují přípravky prodávané pod obchodními názvy HEMOFIL M a RECOMBINATE (patřící firmě Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, Illinois, U.S.A.). Další přípravky v současném vývoji obsahují jednoduchou subpopulaci molekul faktoru VIII, která postrádá část domény B molekuly.

Mezinárodní jednotka, IU—International Unit nebo IU, je jednotka měření aktivity srážlivosti krve (účinnosti) faktoru VIII, měřená standardními testy, jako jsou následující:

- 10 Jednostupňový test. Jednostupňové testy jsou odborníkům známe, takovým testem je např. test popsán v Lee, Martin L, et al., An Effect of Predilution on Potency Assays of Factor VIII Concentrates, Thrombosis Research (Pergamon Press Ltd.) 30, 511–519(1983).

- 15 Chromogenní test. Chromogenní testy mohou být k zakoupení, jako např. Coatest Factor VIII, dostupný od firmy Chromogenix AB, Molndal, Švédsko.

Žihání – termín „žihání“ může být použit jako označení kroku v lyofilizačním postupu pro farmaceutické přípravky podstupující lyofilizaci, přednostně pro sublimační sušení přípravků, při kterém je teplota přípravku zvýšena z nízké teploty na vyšší a poté, po určitém čase opět snížena.

- 20 Objemové činidlo – pro účely této patentové přihlášky jsou objemová činidla takové chemické látky, které zajistí strukturu „koláče“ nebo tvoří zbytkovou pevnou hmotu farmaceutických přípravků po jejich lyofilizaci a chrání je před rozpadem. Objemová činidla schopná krystalizovat, jsou míněna objemová činidla popsána v přihlášce, která mohou krystalizovat během lyofilizace, jinak než chlorid sodný. HES není zahrnut v této skupině krystalizovatelných objemových činidel.

- 30 Sublimační sušení, mrazení, lyofilizace – termín „sublimační sušení“, pokud není v textu uvedeno jinak, se používá pro označení části lyofilizačního postupu, ve které se teplota farmaceutických přípravků zvyšuje za účelem odstranění vody z těchto přípravků. Termín „mrazicí“ kroky lyofilizačního postupu jsou ty kroky, které se objevují hlavně před stavem lyofilizace. Termín „lyofilizace“, není-li uvedeno jinak, se vztahuje na celý lyofilizační postup, který zahrnuje jak mrazicí kroky, tak kroky sublimačního sušení.

- 35 Není-li poznamenáno jinak, termíny v procentech vyjadřují hmotnostní/objemová procenta a teploty jsou ve stupních Celsia.

Složení komponent

- 40 Kompozice faktoru VIII tohoto vynálezu zahrnují objemová činidla, stabilizátory, pufrovací činidla, chlorid sodný, vápenaté soli a výhodně další vehikula. Tato vehikula jsou vybrána za účelem maximalizovat stabilitu faktoru VIII v lyofilizovaných přípravcích. Stejně tak jsou kompozice faktoru VIII podle předkládaného vynálezu stabilní v tekutém stavu.

- 45 Objemová činidla použitá v předkládaných formulacích, která tvoří krystalickou část lyofilizovaného produktu (kromě případu HES), jsou vybrána ze skupiny sestávající z mannitolu, glycinu, alaninu a hydroxyetylovaného škrobu (HES). Mannitol, glycin nebo alanin jsou přítomny v množství 4 až 10 %, výhodně 6 až 9 %, a výhodněji asi 8 %. Je-li použit HES jako objemové činidlo, je přítomen v množství 2 až 6 %, výhodně 3 až 5 %, a výhodněji asi 4 %.

- 50 Stabilizátory použité ve formulacích podle vynálezu jsou vybrány ze skupiny sestávající z sacharózy, trehalózy, rafinózy a argininu. Tato činidla jsou ve formulacích podle tohoto vynálezu přítomna v množství mezi 1 až 4 %, výhodně 2 až 3 %, výhodněji asi 2 %. Sorbitol a glycerol byly ohodnoceny jako možné stabilizátory, ale jejich stabilizační schopnosti v tomto vynálezu byly nedostačující. Chlorid sodný je v tomto vynálezu přítomen v množství 100 až 300 mM, výhodně

150 až 50 mM a výhodněji asi 225 mM. V jednom provedení současného vynálezu může být chlorid sodný použit bez výše uvedených objemových činidel, přičemž by byl přítomen v množství mezi 300 a 500 mM NaCl, výhodně 350 až 450 mM NaCl a výhodněji asi 400 mM NaCl.

5 Dále jsou v těchto přípravech pufovací činidla, jelikož se má za to, že molekula faktoru VIII může být nepříznivě poškozena změnou pH během lyofilizace. Hodnota pH by měla být v průběhu lyofilizace udržována v rozmezí hodnot 6 až 8 a výhodněji asi hodnoty pH 7. Pufovací činidla mohou být fyziologicky akceptovatelné chemické látky nebo kombinace chemických látek, které mají schopnost fungovat jako pufr. Jsou to histidin, Tris, BIS-Tris Propan, PIPES, 10 MOPS, HEPES, MES a ACES. Kompletní chemické pojmenování těchto pufovacích činidel je uvedeno níže v tabulce 1. Standardní koncentrace použitých pufovacích činidel je 10 až 50 mM. Je-li v přípravech použit histidin, jsou použity koncentrace přes 20 mM a výhodně asi 25 mM. Používá se samotný nebo v kombinaci s dalšími pufovacími činidly jako je Tris. Obzvláště je histidin preferován pro kompozice tohoto vynálezu, jak se podrobně popisuje níže.

15

Tabulka 1 – Pufovací činidla

Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
BIS-Tris Propan	1,3-bis-[tris-(hydroxy-methyl)methylamino]-propan
PIPES	piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonová kyselina)
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonová kyselina
HEPES	N-2-hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina
ACES	N-2-acetamido-2-aminoethansulfonová kyselina

20 Za účelem zachování aktivity faktoru VIII tohoto vynálezu, je důležité, aby formulace obsahovaly vápník nebo jiné dvojmocné kationy, které jsou schopné interagovat s faktorem VIII a udržovat tak jeho aktivitu, pravděpodobně spojováním těžkých a lehkých řetězců faktoru VIII. Lze použít koncentraci mezi 1 a 5 mM vápenaté soli, výhodně 3 až 4 mM a výhodněji asi 4 mM. Preferovaná vápenatá sůl je chlorid vápenatý, ale mohou být použity i jiné vápenaté soli glukonát vápenatý, glukonát vápenatý nebo gluceptát vápenatý.

25

Kompozice faktoru VIII také výhodně obsahují povrchově aktivní látky, výhodně v množství 0,1 % nebo méně, nebo výhodněji v množství asi 0,03 %. Povrchově aktivní látky mohou být vybrány ze skupiny sestávající z polysorbátu 20, polysorbátu 80, pluronických polyolů a Brij 35 (polyoxyethylen 23 lauryl ether). Jsou dostupné některé druhy pluronických polyolů (prodávané 30 pod obchodním názvem Pluronic, vyrobené firmou BASF Wyandotte Corporation). Tyto polyoly různých molekulových hmotností (od 1000 do 16 000) a s odlišnými fyzikálněchemickými vlastnostmi jsou použity jako povrchově aktivní látky. Pluronic F-38 s molekulární hmotností 5000 a Pluronic F-68, molekulární hmotnost 9000, obsahují 80 % (hmotnostních) hydrofilních polyoxyethylenových skupin a 20 % hydrofobních polyoxypropylenových skupin. Tween-80, komerční polysorbát, je používán v těchto přípravech, zvláště pak rostlinný Tween-80.

35

Formulace faktoru VIII tohoto vynálezu zahrnují také antioxidanty. Zjistilo se, že přidáním antioxidantů do lyofilizovaných přípravků tohoto vynálezu se zvyšuje stabilita těchto přípravků, a tím také jejich životnost. Použité antioxidanty musí být vhodné pro použití ve farmaceutických 40 přípravcích a kromě toho jsou výhodně rozpustné ve vodě. Jsou-li do přípravků přidávány antioxidanty, preferuje se jejich přidání těsně před lyofilizací, čímž se zamezí spontánní oxidaci antioxidantů. V tabulce 2 jsou vhodné antioxidanty, které jsou komerčně dostupné přes společnosti jako je Calbiochem a Sigma.

Tabulka 2–Antioxydanty

N-acetyl-L-cystein/Homocystein
Glutathion
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina (Trolox)
Lipoová kyselina
Methionin
Thiosulfát sodný
Platina
Glycin-glycin-histidin (tripeptid)
Butylovaný hydroxytoluen (BHT)

Ze zmíněných antioxydantů je výhodný glutathion. Koncentrace asi 0,05 mg/ml až do asi 1,0 mg/ml zvyšují stabilitu kompozicí faktoru VIII a má se za to, že i vyšší koncentrace by také mohly být účinné (do okamžiku jakýchkoliv toxických projevů nebo nepříznivých jevů, jako je např. snížení teploty přeměny skla lyofilizovaných produktů). Je zjištěno, že zvláště kombinace histidinu a glutathionu má prospěšný vliv na stabilitu kompozicí faktoru VIII. Histidin použitý jako pufr, může také působit jako chelátor kovů. Inaktivace faktoru VIII je do značné míry způsobena kovy indukovanou oxidací, histidin tedy může stabilizovat faktor VIII vázáním oxidačních kovových iontů. Má se za to, že navázáním těchto kovových iontů glutathion (nebo jakýkoliv jiný přítomný antioxydant) zajistí ochranu proti další oxidaci, protože oxidační účinek kovových iontů vázaných histidinem byl potlačen.

V kompozicích tohoto vynálezu mohou být také použita jiná chelatační činidla. Tato činidla přednostně vážou kovy jako jsou měď a železo s větší afinitou než vápník, je-li v kompozici použita vápenatá sůl. Jedním takovým chelátorem je deferoxamin, který usnadňuje odstranění Al^{++} a železa. Deferoxaminmesylát, $C_{25}H_{48}N_6O_8 \cdot CH_4O_3S$, je možné získat od firmy Sigma (Sigma Prod. No. D9533). Je to chelátor hliníku a železa (II), který váže pouze železo (jako 1 : 1 chelatační komplex) v oxidačním stavu 3+, nikoliv v oxidačním stavu 2+, ale může také vázat ionty manganu a jiných kovů. Deferoxamin může být použit výhodně v množství 0,25 mg/l.

Faktor VIII použitý v kompozicích tohoto vynálezu může být buď velice čistý faktor VIII z lidské plazmy, nebo výhodněji faktor VIII vytvořený rekombinantní technikou. Rekombinantní faktor VIII může být produktem buněk vaječníku čínské křečka (CHO) transfekovaných s vektorem, který nese sekvenci DNA kódující molekulu faktoru VIII. Metody přípravy transfekčních CHO buněk popisuje Toole, Jr, mimo jiné, v patentu US4 757 006, ale alternativní metody jsou odborníkům také známy (viz. např. patent US 4 868 112, také od Tooleho, Jr. a PCT mezinárodní patentová přihláška WO-A 91/09122). Metody použití pro kultury buněk CHO k produkci faktoru VIII jsou odborníkům také známy, např. evropská patentová přihláška EP 0 362 218 pro Genetics Institute, nazvaná „Vylepšená metoda produkce faktoru VIII: proteiny typu – C“. Rekombinantní faktor VIII však může být produkován i jinými buňkami, jako jsou např. buňky ledvin malého křečka (BHK). Samotná molekula faktoru VIII, je-li připravena rekombinantně, může být buď celá molekula faktoru VIII, nebo jen její část, jako např. B doména molekuly faktoru VIII.

Zatímco kompozice faktoru VIII popsané v této patentové přihlášce mohou být lyofilizovány a rozředěny v daných koncentracích, odborníkům v oboru je zřejmé, že tyto přípravky mohou být zředěny na zředěnější formu. Např. přípravek podle tohoto vynálezu, který je normálně lyofilizován a/nebo rozředěn v 2 ml roztoku, může být také rozředěn ve větším množství, např. v 5 ml.

Toto ředění je zvláště vhodné při přímé aplikaci přípravku faktoru VIII pacientovi, nicméně v tomto případě faktor VIII neztrácí svou aktivitu tak rychle, jako je tomu ve zředěnějších roztocích faktoru VIII.

5 Formulace a provedení lyofilizace

Za účelem dosažení maximální stability jsou kompozice faktoru VIII tohoto vynálezu lyofilizovány. Během lyofilizace je faktor VIII přeměněn z vodné fáze na amorfni pevnou fázi, čímž je protein chráněn před chemickou a/nebo konformační nestabilitou. Lyofilizované přípravky obsahují nejen amorfni fáze, ale i složky, které krystalizují během lyofilizace. Záměrem je rychlé proběhnutí lyofilizace kompozice faktoru VIII a vytvoření co nejlepšího koláče (tzn. koláče, který je co nejméně smrštěný ze stran kontejneru, ve kterém byl lyofilizován). V přípravcích tohoto vynálezu jsou obsaženy stabilizátory, které existují zejména v amorfni fázi lyofilizovaného produktu, zatímco objemová činidla (kromě HES) krystalizují během mrazení.

Jak faktor VIII, tak stabilizátor jsou rozptýleny v amorfni fázi lyofilizovaného koláče. Hmota stabilizátoru je také srovnatelná s dalšími vehikuly v amorfni formě. Dále výhodná teplota zdánlivé přeměny skla (T_g') amorfni fáze je relativně vysoká během sublimačního sušení a výhodná teplota přeměny skla (T_g) pevné láky je rovněž vysoká během skladování. Bylo zjištěno, že krystalizace chloridu sodného v produktu je žádoucí, dokud amorfni chlorid sodný nepotlačí T_g' amorfni fáze.

Za účelem vyhnout se zborcení koláče jednotlivých kompozic, se první sušení provádí při teplotě produktu, která je nižší než teplota zdánlivého přechodu skla zmrazeného koncentráту. Prodloužení doby sušení může být také požadováno pro kompenzaci snížení T_g' . Další informace o lyofilizaci je možné nalézt v Carpenter, J. F. a Chang, B. S., *Lyophilization of Protein Pharmaceuticals*, Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing and Preservation, K. E. Avis and V. L. Wu, eds. (Buffalo Grove, IL: Interpharm Press, Inc.), pp. 199–264 (1996).

30

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

35

Účinky koncentrace faktoru VIII a přídavku stabilizátoru na regeneraci faktoru VIII byly předmětem několika studií. Tyto studie byly provedeny za použití mannitolu jako modelového objemového činidla a sacharózy jako modelového stabilizátoru. V těchto studiích byly zkoumány tři vzorky popsané níže v tabulce 3. Všechny studované vzorky obsahovaly 10 mM Tris, 200 mM NaCl, 8 % mannitolu, 4 mM CaCl_2 a 0,02 % Tween-80 a byly měřeny při pH 7,0.

40

Tabulka 3

Vzorek I.D.	Počáteční faktor VIII (IU/ml)	Sacharóza %
IA	600	-
IB	60	-
IC	60	2

Tyto vzorky byly lyofilizovány cyklem sublimačního sušení, popsaným v tabulce 4 níže, za účelem udržení teploty produktu pod teplotou zdánlivé přeměny skla (T_g'). Diferenciální kalorimetrické snímání (DSC) určilo přeměnu při přibližně -40°C ve složení obsahujícím mannitol. Za účelem udržet teplotu produktu pod touto hranicí byla limitní teplota během prvního sušení

nastavena na $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$. První sušení za těchto podmínek probíhalo po dobu 55 hodin a celková doba cyklu byla asi 80 hodin.

Tabulka 4

Metody	Popis
I (mrazení)	Zchladit na $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ Zchladit na $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ při $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minutu}$, udržet po dobu 20 minut; Zchladit na $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ při $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minutu}$, udržet po dobu 1 hodiny (do 3 hodin); Zchladit na $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ při $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minutu}$, udržet po dobu 1 hodiny.
II	Mrazení metodou I Udržet při $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hodin
III	Mrazení metodou I Udržet při $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hodin Udržet při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hodin
IV (sublimační sušení)	Podložka teplota $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ během prvního sušení po dobu asi 55 hodin (do 100 hodin) Produkt $< -40\text{ }^{\circ}\text{C}$ během prvního sušení; Pokles z $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$ při $0,2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minutu}$; Podložka teplota $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$ během druhého sušení po dobu 3 hodiny.

5

Aktivita faktoru VIII těchto vzorků, určená pomocí jednostupňového testu, byla porovnávána s kontrolním vzorkem udržovaným při $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Výsledky testu jsou shrnuty v tabulce 5.

10 Tabulka 5

Proces Metoda	% ztráty aktivity faktoru VIII během každého z kroků		
	Formulace IA (600 IU/ml)	Formulace IB (60 IU/ml)	Formulace IC (60 IU/ml, 2 % sacharosy)
I	6,7	37,5	41,7
II	2,0	9,3	3,9
III	7,3	11,6	5,0
IV (lyofilizace)	20,0	24,2	18,3

Tyto výsledky ukazují na to, že koncentrace proteinu má vliv na regeneraci faktoru VIII během mrazení. Formulace obsahující 60 IU/ml ztratí během mrazicího kroku přibližně 37 až 42 % z

počáteční aktivity faktoru VIII, zatímco formulace obsahující 600 IU/ml ztratí 6,7 % aktivity faktoru VIII. Tyto výsledky ukazují, že vyšší koncentrace proteinu má ochranný efekt během mrazení. Ačkoliv sacharóza vykazuje určitou ochranu faktoru VIII během střední teploty stejně dobře jako během sublimačního sušení, její schopnost ochrany se ztrácí během počátečního mrazicího kroku.

Příklad 2

- Následuje vylepšení lyofilizačního postupu naznačeného v příkladu 1 a dále optimalizace tohoto postupu. Zjistilo se, že lyofilizované kompozice, které vyšší teplotu přeměny skla (a teoreticky lepší stabilitu faktoru VIII) mohou být vytvářeny: (1) snížením počáteční mrazicí teploty na -45°C nebo nižší (jako např. snížením teploty na -50°C nebo -55°C); (2) zvýšením teploty na -20°C nebo -22°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) a potom (3) opětovným snížením teploty na -45°C nebo nižší. Teplota je snižována nebo zvyšována podle potřeby o $0,5$ až asi $1,0^{\circ}\text{C}$ za minutu. V okamžiku dosažení požadované teploty se kompozice udržuje při této teplotě po dobu mezi 1 a 3 hodinami. Tento vylepšený mrazicí cyklus je popsán v tabulce 6.

Tabulka 6

Mrazicí metoda	Popis
I	Zchladit na $+5^{\circ}\text{C}$ Zchladit na -5°C při $0,5$ až $1^{\circ}\text{C}/\text{minutu}$, udržet po dobu 20 minut; Zchladit na teplotu mezi -55°C a -45°C při $0,5$ až $1^{\circ}\text{C}/\text{minutu}$, udržet po dobu asi 1 hodiny; Ohřát na -22°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) při $0,5$ až $1^{\circ}\text{C}/\text{minutu}$, udržet po dobu 1 až 3 hodiny; Zchladit na -45°C při $0,5$ až $1^{\circ}\text{C}/\text{minutu}$, udržet po dobu asi 1 hodiny.

Pokud není uvedeno jinak, teploty uvedené v tomto příkladě a v dalších příkladech se vztahují na teplotu podložky v lyofilizéru a nikoliv na teplotu produktu *per se*. Následuje vylepšený mrazicí cyklus, zbytek lyofilizačního procesu může být proveden jak bylo naznačeno výše v příkladu 1, nebo jak zde bude dále popsáno, nebo podle stanovení odborníků v oboru.

Tento lyofilizační postup je zejména vhodný pro formulace, které obsahují glycin, jakožto objemové činidlo, a také pro formulace obsahující mannitol. Dále se má za to, že je použitelný i pro formulace tohoto vynálezu, které obsahují jiná objemová činidla.

Příklad 3

Má se za to, že pro tvorbu sublimačně sušeného produktu s akceptovatelným vzhledem koláče a teplotou přeměny skla, je potřeba, aby objemová činidla lyofilizovaných farmaceutických přípravků, které obsahují chlorid sodný, jako např. glycin nebo mannitol, krystalizovala. Proto byl vypracován vylepšený lyofilizační postup pro krystalizaci objemových činidel.

Tabulka 7a – Mrazicí kroky

Krok	Teplota	Doba trvání kroku
Počáteční mrazení	-40 °C nebo méně	1 hodina
První žihání	mezi -23 °C a -27 °C	3 hodiny
Druhé mrazení	-55 °C	1 hodina
Druhé žihání	-36 °C	4 hodiny
Třetí mrazení	-50 °C	1 hodina

Tabulka 7b – Kroky sublimačního sušení

Krok	Teplota	Doba trvání kroku
První sušení	-35 °C	do 100 hodin
Druhé sušení: první krok	40 °C	3 hodiny
Druhé sušení: druhý krok	45 °C	3 hodiny
Druhé sušení: třetí krok	50 °C	3 hodiny

Změny teplot mrazicích kroků jsou prováděny v rozmezí 0,5 °C/minutu a 1 °C /minutu. Ovšem má se za to, že i kroky delšího trvání by mohly být efektivní.

- 10 Před prvním mrazicím krokem je třeba udržet teplotu mezi asi 2 a 8 °C po dobu asi jedné hodiny, aby všechny nádoby měly přibližně stejnou teplotu. Poté je lyofilizér zchlazen na teplotu -5 °C. První lyofilizační krok by měl být prováděn při teplotě nižší než -30 °C, výhodně pod -35 °C, a výhodněji asi -40 °C. Poté následuje první žihací krok, který se provádí při teplotě mezi -30 a -19 °C, výhodněji buď mezi -25 a -28 °C (je-li použit glycin jako objemové činidlo) nebo,
- 15 mezi -21 a -24 °C (je-li použit mannitol jako objemové činidlo), a nejvýhodněji při teplotě -23 a -26 °C. Při těchto teplotách by měla objemová činidla alespoň částečně krystalizovat. Nižší stupeň, asi -27 °C, však není doporučován zejména pro formulace obsahující mannitol a arginin. Tento krok trvá po dobu asi 3 hodin.
- 20 Následuje první žihací krok, teplota se sníží na teplotu nižší než asi -50 °C a výhodněji až na -55 °C a níže, po dobu asi 1 hodiny. Při této teplotě chlorid sodný v přípravcích vytváří zárodky.

- Během druhého žihacího kroku se teplota farmaceutického přípravku zvýší na teplotu mezi -30 a -39 °C, výhodná teplota pro kompozice obsahující mannitol je -33 °C a pro kompozice obsahující glycin je tato teplota -36 °C. Při této teplotě by měly, alespoň částečně, růst krystaly NaCl.
- 25 Tento krok probíhá po dobu asi 4 hodin. Poté je teplota v lyofilizéru snížena na -50 °C, výhodně na dobu asi 1 hodiny, čímž se sníží teplota přípravků.

- V následujících krocích sublimačního sušení se mění teplota o hodnoty 0,1 °C/minutu a 0,5 °C/minutu. Po zredukování tlaku na asi 8,66 Pa (65 mTorr) se teplota zvýší na -32 až -35 °C pro první sušení. Při této teplotě sublimují ledové krystaly v přípravcích. Tento krok trvá do 100 hodin, nebo do doby dokud většina ledu nevysublimuje z přípravků. Okamžik, ve kterém většina ledu vysublimovala se dá určit např. senzorem bodu orosení, který indikuje konec sublimace poklesem křivky (inflexní bod).
- 30

- 35 Následuje první sušení, při kterém se teplota zvýší na +40 °C, výhodně při hodnotách 0,2 °C/minutu, čímž se započne druhé sušení pro odstranění vody z přípravku. Tuto teplotu je výhodně udržovat po dobu asi 3 hodin. V druhém a třetím sušení následujícím po prvním kroku se teplota zvýší na teplotu asi +45 °C na dobu asi 3 hodin, a poté na teplotu asi +50 °C na dobu 3

hodiny a více. Tímto se zredukuje vlhkost lyofilizačního koláče na hodnotu menší než 2 % (hmotn/hmotn).

5 Příklad 4

Další studie byly prováděny pro zjištění specifického efektu histidinu na lyofilizované kompozice faktoru VIII, které obsahovaly glycin nebo mannitol jako objemové činidlo. Pro detekci krystalizace těchto objemových činidel během mrazení byl použit nevratný tepelný tok (Modulated DSC, mDSC). Jak teplota krystalizace tak celkové teplo byly určeny z krystalizační exotermie. Určený eutektický bod tání endotermie NaCl během ohřívání byl použit pro určení krystalizace NaCl. Pomocí mDSC a použitím signálu celkového tepelného toku bylo určeno prodloužení krystalizace jako poměr entalpie tání přípravku a entalpie tání čistého roztoku NaCl. Dále byla provedena rentgenová difrakční analýza za účelem odhadnout krystalizaci v lyofilizovaných přípravcích.

Zatímco koncentrace histidinu menší než 20 mM nemá zásadní vliv na krystalizaci glycinu, koncentrace 50 mM histidinu redukuje rozsah krystalizace glycinu. Během mrazení formulací, které obsahují glycin nebyly pozorovány definované krystalizační exotermie NaCl. Avšak, endotermie eutektického tání během zahřívání ukazují, že NaCl krystalizovala (>50 %) po mrazení při teplotě nižší než -50 °C a žhání při -30 až 35 a -40 °C. Zahnutí 50 mM histidinu do přípravků obsahujících glycin zpomaluje krystalizaci NaCl. Následkem toho je trojnásobné prodloužení doby žhání, aby bylo dosaženo ekvivalentní krystaličnosti.

Avšak vliv 20 mM histidinu na krystalizaci NaCl ve formulacích obsahujících glycin byl minimální. Pomocí studií sublimačního sušení bylo zjištěno, že ve formulacích glycinu obsahujících 50 mM histidinu, se vyskytuje viditelné zborcení lyofilizovaného koláče. Data získaná rentgenovou práškovou difrakční analýzou dokazují snížení krystalizace NaCl ve vzorcích, které obsahují histidin. V přípravcích, které obsahují mannitol, krystalizuje obvykle 83 až 90 % chloridu sodného, bez potřeby žhání, během mrazení při teplotách mezi -40 a -50 °C. Zatímco zahrnutí 20 mM histidinu do přípravků potlačuje krystalizaci NaCl během mrazení, výsledkem žhání je přibližně 40% krystalizace NaCl.

Proto v přípravcích obsahujících objemová činidla jako glycin a mannitol, a NaCl, může přídavek histidinu snižovat rozsah krystalizace NaCl. Ačkoliv toto může vést k poničení koláče utvořeného během lyofilizace, použití relativně nízké koncentrace histidinu může v přípravcích tento efekt zmírnit. Nicméně přijatelný koláč byl vytvořen i s koncentracemi histidinu 35 a 50 mM. Histidin může být také přidán do HEPES, jako objemové činidlo v přípravcích, které obsahují glycin nebo mannitol. Použití HEPES snižuje T_g ve větším rozsahu než obdobné množství histidinu.

40 Příklad 5

Předmětem dalších studií bylo měření fyzikálních charakteristik několika možných formulací faktoru VIII, které zahrnují sedm stabilizátorů přicházejících v úvahu a pět objemových činidel. Kromě objemového činidla a stabilizátoru, všechny formulace uvedené v tabulce 8 níže (kromě formulace 11) obsahují 10 mM Tris•HCl, 200 mM NaCl, 0,02% Tween-80, 4 mM CaCl₂ a při pH 7,0. Formulace 11 obsahuje 10 mM Tris•HCl, 0,02% Tween-80, a 4 mM CaCl₂, také při pH 7,0. Všechna pH měření byla prováděna při teplotě okolí.

Tabulka 8

Vzorek I.D.	Objemové činidlo	Stabilizátor proteinu
1	8% Mannitol	2% Sacharosa
2	8% Mannitol	2% Trehalosa
3	8% Mannitol	2% Rafinosa
4	8% Mannitol	2% Arginin
5	8% Mannitol	2% Lysin
6	8% Mannitol	2% Sorbitol
7	8% Mannitol	2% Glycerol
8	4% Hydroxyethylovaný škrob	2% Sacharosa
9	8% Glycin	2% Sacharosa
10	8% Glycin	2% Trehalosa
11	400 mM NaCl	2% Sacharosa
12	8% Alanin	2% Sacharosa

- 5 Pro předurčení chování během sublimačního sušení byly měřeny teplota zborcení, pomocí sublimačního mikroskopu, a termální přeměny pomocí DSC. DSC, rentgenová prášková difrakční analýza a polarizační mikroskop byly také použity pro určení krystaličnosti lyofilizovaných vzorků. Byly také hodnoceny vzhled a rekonstituční čas vzorků. Výsledky všech měření jsou shrnuty dále v tabulce 9.

10 Tabulka 9

Vzorek I.D.	T _{pc} (°C)	T _c (°C)	T _g (°C)	Rekonstituce (s)	Obsah vody (%)	Vzhled
1	-14	-10	54	64	n/c	Vynikající
2	-20	-15	53	62	1,4	Téměř zborcený
3	-15	-10	54	77	1,7	Vynikající
4	-	-	-	-	-	Částečně zborcený
5	-	-	-	-	-	Zborcený
6	n/c	n/c	<10 °C	63	0,6	Vynikající
7	-	-	<10 °C	-	-	Vynikající
8	-	-	86	49	0,7	Vynikající, ale po stranách tenký
9	-	-	54	22	0,8	Vynikající
10	-	-	63	18	-	Vynikající
11	-	-	66	11	0,4	Vynikající (vrstva na dně)
12	-	-	-	57	0,5	Vynikající

Sorbitol a glycerol mají přeměnu skla při $<10^{\circ}\text{C}$. DSC neměří teploty v tomto rozsahu

n/c = není čistý

T_{pc} = teplota částečného zborcení, měřená sublimačním mikroskopem

T_c = teplota úplného zborcení, měřená sublimačním mikroskopem

5 T_g = teplota přeměny skla

S výjimkou mannitolu:lysinu, mají všechny formulace přiměřený fyzikální vzhled. Lysin znesnadňuje krystalizaci jak mannitolu tak glycinu, což má za následek snížení teploty přeměny skla a zborcení lyofilizovaného koláče.

10

Příklad 6

15 Kompozice faktoru VIII popsané v tabulce 8 výše, byly skladovány při -70 , 25 , 40 a 50°C po dobu různých časových úseků, čímž byla ověřována jejich stabilita. Stupně aktivity faktoru VIII byly měřeny po 2 týdnech, 1 měsíci, 2 měsících a 3 měsících, všechny výsledky jsou shrnuty v tabulce 10 níže. Dva vzorky, první obsahující mannitol jako objemové činidlo a sorbitol jako stabilizátor, a druhý obsahující mannitol jako objemové činidlo a glycerol jako stabilizátor, vykazovaly nízkou stabilitu. Všechny zbývající formulace vykazovaly schopnost stabilizovat faktor VIII.

20

Tabulka 10

Popis složení	Teplota ($^{\circ}\text{C}$)	počáteční % v měsících				
		0	0,5	1	2	3
Glycin:Sacharóza	-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:Trehalóza	-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:Trehalóza	-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:Sacharóza	-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:Rafinóza	-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:Glycerol	-70					
	25					
	40					
	50					
Mannitol:Sorbitol	-70	100,00	104,06			
	25	100,00				
	40	100,00				
	50	100,00	32,73			
HES:Sacharóza	-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:Sacharóza	-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:Sacharóza	-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:Rafinóza	-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	

Příklad 7

Na základě informací dosažených během studií popsaných v příkladech 5 a 6, bylo rozhodnuto, že formulace přicházející v úvahu, které mají vehikula popsaná v tabulce 11 níže, budou vyvíjeny dále.

Tabulka 11

Vehikulum	Koncentrace
mannitol nebo glycin	6 až 9%
arginin nebo trehalóza	1 až 3%
tween 80	0,005 až 0,04%
NaCl	200 až 250 mM
CaCl ₂	3 až 5 mM
TRIS	20 až 30 mM
histidin nebo HEPES	10 až 50 mM
glutathion	0,15 až 0,25 mg/ml

Na základě parametrů byly vyvinuty následující specifické formulace:

Tabulka 12

Formulace č.1	Formulace č.2	Formulace č.3
10 mM HEPES	10 mM HEPES	10 mM HEPES
20 mM Tris	20 mM Tris	20 mM Tris
225 mM NaCl	225 mM NaCl	225 mM NaCl
0,03% (obj./obj.) Tween-80	0,03% (obj./obj.) Tween-80	0,03% (obj./obj.) Tween-80
8% (hmotn./obj.) mannitol	8% (hmotn./obj.) glycin	8% (hmotn./obj.) mannitol
2% (hmotn./obj.) trehalóza	2% (hmotn./obj.) trehalóza	2% (hmotn./obj.) arginin
0,2 mg/ml redukovaného glutathionu	0,2 mg/ml redukovaného glutathionu	0,2 mg/ml redukovaného glutathionu
4 mM CaCl ₂	4 mM CaCl ₂	4 mM CaCl ₂

Formulace č.4	Formulace č.5
25 mM histidin	25mM histidin
20 mM Tris	20mM Tris
225 mM NaCl	225mM NaCl
0,03% (obj./obj.) Tween-80	0.03% (obj./obj.) Tween-80
8% (hmotn./obj.) mannitol	8% (hmotn./obj.) glycin
2% (hmotn./obj.) trehalóza	2% (hmotn./obj.) trehalóza
0,2 mg/ml redukovaného glutathionu	0,2 mg/ml redukovaného glutathionu
4 mM CaCl ₂	4 mM CaCl ₂

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kompozice faktoru VIII, formulovaná bez přídavku albuminu k uvedené kompozici,
5 **vyznačující se tím**, že kromě faktoru VIII obsahuje následující formulační vehikula:
4 % až 10 % hmotn./obj. objemového činidla vybraného ze skupiny sestávající z mannitolu, glycinu a alaninu;
1 % až 4 % hmotn./obj. stabilizátoru vybraného ze skupiny sestávající ze sacharózy, trehalózy, rafinózy a argininu;
10 1 až 5 mM vápenaté soli;
100 až 300 mM NaCl; a
pufrovací činidlo pro udržení pH na hodnotě mezi 6 a 8.
2. Kompozice faktoru VIII podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje dále
15 povrchově aktivní látku.
3. Kompozice faktoru VIII podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že uvedená povrchově aktivní látka je vybrána ze skupiny sestávající z polysorbátu 20, polysorbátu 80, Pluronic F68 a Brij 35.
20
4. Kompozice faktoru VIII podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že uvedenou povrchově aktivní látkou je polysorbát 80, a kde uvedený polysorbát 80 je přítomen v množství menším než 0,1 % hmotn./obj.
- 25 5. Kompozice faktoru VIII podle nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že uvedená povrchově aktivní látka je přítomna v množství 0,03 % hmotn./obj.
6. Kompozice faktoru VIII podle nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že uvedený pufrovací činidlo je vybráno ze skupiny sestávající z Tris, BIS – Tris Propan, histidinu, PIPES,
30 MOPS, HEPES, MES a ACES.
7. Kompozice faktoru VIII podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že uvedeným pufrovacím činidlem je Tris.
- 35 8. Kompozice faktoru VIII podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že Tris je přítomen v množství 20 mM.
9. Kompozice faktoru VIII podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že pufrovací činidlo obsahuje od 10 do 50 mM histidinu.
40
10. Kompozice faktoru VIII podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že histidin je přítomen v množství 25 mM.
11. Kompozice faktoru VIII podle nároků 1 až 10, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje antioxidant.
45
12. Kompozice faktoru VIII podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že uvedeným antioxidantem je glutathion.
- 50 13. Kompozice faktoru VIII podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že glutathion je přítomen v množství od 0,05 do 1,0 mg/ml.

14. Kompozice faktoru VIII podle nároků 1 až 13, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedený objemové činidlo je přítomno v množství 8 % hmotn./obj.
- 5 15. Kompozice faktoru VIII podle nároků 1 až 14, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedeným objemovým činidlem je mannitol.
16. Kompozice faktoru VIII podle nároků 1 až 14, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedeným objemovým činidlem je glycin.
- 10 17. Kompozice faktoru VIII podle nároků 1 až 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedený stabilizátor je přítomen v množství 2 % hmotn./obj.
18. Kompozice faktoru VIII podle nároků 1 až 17, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedeným stabilizátorem je sacharóza.
- 15 19. Kompozice faktoru VIII podle nároků 1 až 17, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedeným stabilizátorem je arginin.
- 20 20. Kompozice faktoru VIII podle nároků 1 až 17, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedeným stabilizátorem je trehalóza.
21. Kompozice faktoru VIII podle nároků 1 až 20, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedený NaCl je přítomen v množství od 200 do 250 mM.
- 25 22. Kompozice faktoru VIII podle nároku 21, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedený NaCl je přítomen v množství 225 mM.
23. Kompozice faktoru VIII podle nároků 1 až 22, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedenou vápenatou solí je chlorid vápenatý.
- 30 24. Kompozice faktoru VIII podle nároků 1 až 23, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedená kompozice je vhodná pro lyofilizaci.
25. Lyofilizovaná kompozice faktoru VIII získatelná lyofilizací kompozice faktoru VIII podle 35 nároku 24.
26. Použití kompozice faktoru VIII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 25 pro přípravu léčiva na 40 léčení hemofilie.

Konec dokumentu
