



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **178325**

(13) B

(51) Int Cl⁶ A 61 K 38/49

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	883520	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	08.08.88	søknadsnummer	
(24) Løpedag	08.08.88	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	13.02.89	(30) Prioritet	10.08.87, JP, 199381/87
(44) Utlegningsdato	27.11.95		

(71) Patent søker	Eisai Co Ltd, 6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 112, JP
(72) Oppfinner	Masahiro Kawahara, Tsukuba-shi, Ibaraki, JP
	Yuichiro Hayashi, Kitasouma-gun, Ibaraki, JP
	Naoki Asakawa, Tsukuba-shi, Ibaraki, JP
	Sumio Watanabe, Niwa-gun, Aichi, JP
	Yasuo Miyake, Inuyama-shi, Aichi, JP
(74) Fullmektig	J.K. Thorsens Patentbureau AS, Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av et t-PA injeksjonspreparat**

(56) Anførte publikasjoner NO 168988, DK 163173, DK 163174, EP A 156169

(57) Sammendrag

Injeksjonspreparat omfattende en farmakologisk effektiv mengde av en modifisert tPA, 20 mM eller mer av en aminosyre eller et salt derav. Preparatet har forbedrede egenskaper med hensyn til stabilitet og oppløselighet av nevnte modifiserte tPA.

Fremstilling av preparatet er beskrevet.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av et injeksjonspreparat.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av et medisinsk preparat inneholdende en modifisert vevplasminogenaktivator (i det følgende benevnt "modifisert t-Pa"). Spesielt vedrører den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av et injeksjonspreparat inneholdende en modifisert t-Pa kombinert med en aminosyre eller et salt derav.

Det er vel kjent at en modifisert t-Pa fremstilt ved å modifisere en naturlig t-Pa reagerer på plasminogen in vivo og danner plasmin, som ødelegger et fibrinretikulum i en trombe for oppløsning av denne og den modifiserte t-Pa er derfor nyttig ved behandling av pasienter med sykdommer i et kretsløporgan indusert ved dannelsen av tromben.

Det er imidlertid ganske vanskelig å oppnå en stabil vandig oppløsning av den modifiserte t-Pa som er brukbar som et medisinsk preparat f.eks. for injeksjon, ettersom den modifiserte t-Pa er et vanskelig oppløselig protein som lett deaktiveres. Dette er et stort problem på området med praktiske anvendelser av den modifiserte t-Pa.

Det er derfor et formål for den foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en fremgangsmåte for fremstilling av et modifisert t-Pa-holdig injeksjonspreparat med en vannoppløselighet og stabilitet som er øket slik at preparatet er tilfredsstillende brukbart ved medisinsk behandling.

Etter omfattende undersøkelser med henblikk på å øke oppløseligheten av den modifiserte t-Pa i vann og stabiliteten derav ble det i oppfinnelsens sammenheng funnet at når en aminosyre eller et salt derav innlemmes i den modifiserte t-Pa blir oppløseligheten av den sistnevnte i vann og også

stabiliteten derav merkbart øket. Den foreliggende oppfinnelse er basert på denne erkjennelse.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører således en fremgangsmåte for fremstilling av et injeksjonspreparat, som er kjennetegnet ved at den omfatter å formulere en farmakologisk effektiv mengde av en modifisert t-PA, idet den nevnte modifiserte t-PA er forskjellig fra naturlig t-PA, 20 mM eller mer av en eller flere aminosyrer valgt fra gruppen bestående av arginin, histidin, lysin, ornitin, glycin, alanin, valin, leucin, serin, treonin, glutaminsyre og asparaginsyre, eller et salt derav, og en farmakologisk akseptabel bærer.

Aminosyrene som er brukbare ved oppfinnelsen inkluderer basiske, sure og nøytrale aminosyrer, og disse kan anvendes enten enkeltvis eller som en kombinasjon av to eller flere av disse syrer.

De basiske aminosyrer og salter derav som er brukbare ved oppfinnelsen inkluderer arginin, histidin, lysin, ornitin og salter derav med en uorganisk eller organisk syre (som f.eks. syrer avledet fra sure aminosyrer). Saltene inkluderer f.eks. hydrokloridet, acetatet, aspartatet og glutamatet.

De sure aminosyrer og salter derav som er brukbare ved den foreliggende oppfinnelse inkluderer glutaminsyre, asparaginsyre og salter derav som natriumglutamat og natriumaspartat.

De nøytrale aminosyrer som er brukbare ved oppfinnelsen inkluderer f.eks. glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin og treonin.

For å øke stabiliteten av preparatet anvendes foretrukket arginin eller et salt derav.

Mengden av aminosyre eller salt derav i preparatet fremstilt i samsvar med oppfinnelsen er minst 20 mM.

De modifiserte t-Pa som anvendes ved oppfinnelsen inkluderer f.eks.:

- (1) mutant t-Pa fremstilt ved å fjerne F og G områder fra naturlig t-Pa og erstatte Gly og Ser ved henholdsvis aminosyreposisjonene nr. 183 og 186 med henholdsvis Ser og Thr,
- (2) mutant t-Pa fremstilt ved å fjerne F og G områder fra naturlig t-Pa og erstatte Ser ved en aminosyreposisjon nr. 119 med Met,
- (3) mutant t-Pa fremstilt ved å fjerne F, G og K₂ områder fra naturlig t-Pa og erstatte Ser ved en aminosyreposisjon nr. 119 med Met,
- (4) mutant t-Pa fremstilt ved å erstatte K₁ området i naturlig t-Pa med K₁ området av plasminogen, og
- (5) mutant t-Pa fremstilt ved å erstatte Cys ved en aminosyreposisjon nr. 84 i naturlig t-Pa med Ser.

Standardutstrekninger av områder er vist ved hjelp av aminosyreposisjonsnummeret og aminosyrer ved disse posisjoner i aminosyresekvensen av naturlig t-Pa. F-området strekker seg fra nr. 4 (Val) til nr. 50 (Ser), G-området strekker seg fra nr. 51 (Cys) til nr. 86 (Ile), K₁-området strekker seg fra nr. 87 (Asp) til nr. 174 (Ser) og K₂-området strekker seg fra nr. 175 (Glu) til nr. 262 (Ser). Det bemerkes imidlertid at disse områder ikke er annet enn medianeksempler på posisjoner og utstrekninger av de respektive områder.

Ved spesielt å velge nr. 4 (Val) til nr. 50 (Ser) som F-området, nr. 51 (Cys) til nr. 86 (Ile) som G-området, nr. 87 (Asp) til nr. 174 (Ser) som K₁-området og nr. 175 (Glu) til nr. 262 (Ser) som K₂-området, vil mutant t-Pa tilsvarende de ovennevnte punkter (1), (2), (3), (4) og (5) bli benevnt henholdsvis t-Pa (2660), t-Pa (2663), t-Pa (2810), t-Pa (8000) og t-Pa (9200).

Med hensyn til formen av det ved oppfinnelsen fremstillbare injeksjonspreparat inkluderer det ikke bare et fast eller vandig preparat inneholdende både den modifiserte t-Pa og aminosyren eller saltet derav men også en tokomponent-preparattype omfattende en emballasje av den modifiserte t-Pa og en ytterligere emballasje av aminosyren eller et salt derav, som f.eks. et injeksjonspreparat for fremstilling in situ omfattende et hetteglass inneholdende en frysetørket, modifisert t-Pa og en ampulle av et løsningsmiddel inneholdende aminosyren eller et salt derav.

Det ved oppfinnelsen fremstillbare preparat kan inneholde vanlige hjelpestoffer anvendt ved fremstilling av medisinske preparater som f.eks. fyllstoffer, stabiliseringsmidler, buffermidler og isotoniserende midler.

Virkningene av aminosyrene og saltene derav til å øke oppløseligheten av den modifiserte t-Pa i vann ble bekreftet ved hjelp av følgende forsøkseksempler 1 og 2.

Kort beskrivelse av tegningene:

Figurene 1 til 6 er grafiske fremstillinger som viser resultatene av forsøkseksempel 1, hvori figur 1 viser resultatene av sammenligningen oppnådd uten noen aminosyre, figur 2 viser resultatene oppnådd med 3 % L-argininhydroklorid, figur 3 viser resultatene oppnådd med 3 % L-histidinhydroklorid, figur 4 viser resultatene oppnådd med 3 % natrium-L-aspartat, figur 5 viser resultatene oppnådd med 3 % natrium-L-glutamat og figur 6 viser resultatene oppnådd med 3 % L-glycin og resultatene oppnådd med 3 % L-alanin.

Figur 7 er en grafisk fremstilling som viser resultatene av forsøkseksempel 2.

Figurene 8 og 9 er grafiske fremstillinger som viser resultatene av forsøkseksempel 3, hvori figur 8 viser resultatene

av sammenligningen uten L-arginin-L-aspartat og figur 9 viser resultatene oppnådd med L-arginin-L-aspartat.

Forsøkseksempel 1

100 til 200 µg av hver av de modifiserte t-Pa (2663), t-Pa (8000) og t-Pa (9200) ble anbragt i et lite reaksjonsrør. 10 til 100 µl av en 3 % vandig oppløsning av L-argininhydroklorid, L-histidinhydroklorid, natrium-L-aspartat, natrium-glutamat, L-glycin eller L-alanin med en pH innstilt til 5,0 til 7,0 ble tilsatt dertil og blandet grundig. Blandingen ble sentrifugert. En spesifikk mengde av supernatantvæsken ble tatt som prøve og underkastet en høytrykksvæskeskromatografi for å bestemme oppløseligheten derav.

En blanding av den modifiserte t-Pa med en fosfat/citrat bufferoppløsning (McIlvaine buffer) innstilt til pH 5,0 eller 7,0 som var fri for enhver aminosyre eller salt derav ble anvendt som en sammenligning for å bestemme dens oppløselighet på samme måte som beskrevet i det foregående.

Resultatene er vist i figurene 1 til 6.

Figur 1 viser resultatene oppnådd med den aminosyrefri sammenligning. Figur 2 viser resultatene oppnådd med 3 % L-argininhydroklorid. Figur 3 viser resultatene oppnådd med 3 % L-histidinhydroklorid. Figur 4 viser resultatene oppnådd med 3 % natrium-L-aspartat. Figur 5 viser resultatene oppnådd med 3 % natrium-L-glutamat. Figur 6 viser resultatene oppnådd med 3 % L-glycin og resultatene oppnådd med 3 % L-alanin.

Det fremgår tydelig av resultatene vist i figurene 1 til 6 at aminosyrene og saltene derav anvendt i samsvar med oppfinnelsen merkbart øker oppløseligheten av den modifiserte t-Pa i vann.

Forsøkseksempel 2

For å bekrefte innvirkningen av konsentrasjonen av aminosyrene og saltene derav utøvet på oppløseligheten av den modifiserte t-Pa, ble samme forsøk som i forsøkseksempel 1 gjentatt med unntagelse av at L-argininhydrokloridet ble valgt som den typiske forbindelse og at 1, 2, 3, 5 og 7 % vandige oppløsninger derav ble anvendt.

Resultatene er vist i figur 7.

Det fremgår tydelig av figur 7 at jo høyere konsentrasjonen av L-argininhydrokloridet er, desto høyere er oppløseligheten av den modifiserte t-Pa.

Virkningene av aminosyrene og saltene derav til å øke stabiliteten av den modifiserte t-Pa ble bekreftet ved hjelp av følgende forsøkseksempel 3.

Forsøkseksempel 3

3 g L-arginin-L-aspartat og 5 g mannitol ble oppløst i 80 ml destillert vann for injeksjon. pH i oppløsningen ble innstilt til 5,0 eller 7,0. Det destillerte vann for injeksjon ble ytterligere tilsatt til oppløsningen til en total mengde på 100 ml som ble filtrert under sterile betingelser og ga en oppløsning for anvendelse som løsningsmiddel.

3 mg av hver av de modifiserte t-Pa (2660), t-Pa (2663), t-Pa (2810), t-Pa (8000) og t-Pa (9200) ble oppløst i 10 ml av løsningsmiddelet fremstilt ovenfor. Oppløsningen ble filtrert under sterile betingelser. Filtratet ble helt inn i hetteglass hvert i en mengde på 1 ml og frysetørket. Hetteglassene ble forseglet og lagret i en dypfryser ved -20°C, på et kaldt sted (5°C) eller i et termostatstyrt bad ved 45°C i en måned.

Etter en måned ble 1 ml destillert vann for injeksjon helt inn i hver av de lagrede prøver for oppnåelse av en oppløs-

ning. Aktiviteten av den modifiserte t-Pa ble bestemt ved hjelp av blodproppløymetoden og graden av resterende aktivitet ble beregnet i sammenligning med aktiviteten av prøven opprettholdt i en dypfryser ved -20°C som sammenligning.

Separat ble frysetørkede modifiserte t-Pa fremstilt på samme måte som beskrevet ovenfor med unntagelse av at L-arginin-L-aspartat ble utelatt. De L-arginin-L-aspartat-fri produkter fremstilt på denne måte ble anvendt som sammenligninger og lagret ved samme temperatur i den samme tidsperiode som angitt ovenfor for å bestemme aktivitetene og grader av resterende aktivitet derav på samme måte som beskrevet i det foregående.

Resultatene er vist i figurene 8 og 9.

Figur 8 viser resultatene oppnådd uten L-arginin-L-aspartat og figur 9 viser resultatene oppnådd med L-arginin-L-aspartat.

Det fremgår tydelig fra resultatene i figurene 8 og 9 at aminosyrene og saltene derav anvendt ved den foreliggende oppfinnelse merkbart øker stabiliteten av den modifiserte t-Pa.

Følgende eksempler vil ytterligere illustrere oppfinnelsen.

EKSEMPEL 1

500 mg L-argininhydroklorid og 500 mg mannitol ble oppløst i 8 ml destillert vann for injeksjon. pH av oppløsningen ble innstilt til 5,0. 30 mg av den modifiserte t-Pa (8000) ble oppløst i oppløsningen. Destillert vann for injeksjon ble tilsatt oppløsningen til total mengde 10 ml. Oppløsningen ble filtrert under sterile betingelser og helt inn i hetteglass hvert i en mengde på 1 ml og frysetørket. Hetteglassene ble forseglet.

Separat ble det fremstilt ampuller som hver som løsningsmiddel inneholdt 1 ml destillert vann for injeksjon.

EKSEMPEL 2

500 mg L-arginin-L-aspartat og 500 mg mannitol ble oppløst i 8 ml destillert vann for injeksjon. pH av oppløsningen ble innstilt til 5,5. 30 mg av den modifiserte t-Pa (9200) ble oppløst i oppløsningen. Destillert vann for injeksjon ble tilsatt oppløsningen til total mengde 10 ml. Oppløsningen ble filtrert under sterile betingelser, helt inn i hetteglass hvert i en mengde på 1 ml og frysetørket. Hetteglassene ble forseglet.

Separat ble det fremstilt ampuller som hver som løsningsmiddel inneholdt 1 ml destillert vann for injeksjon.

EKSEMPEL 3

30 mg av den modifiserte t-Pa (2663) fremstilt under sterile betingelser ble homogent blandet med 500 mg steril mannitol og blandingen ble anbragt i hetteglass hvert i en slik mengde at 5 mg av den modifiserte t-Pa (2663) ville bli inneholdt i hvert hetteglass. Hetteglassene ble forseglet.

Separat ble 500 mg natrium-L-glutamat oppløst i destillert vann for injeksjon og ga 10 ml av en oppløsning. pH av oppløsningen ble innstilt til 5,0. Oppløsningen ble helt inn i ampuller hver i en mengde på 1 ml for å oppnå ampuller av løsningsmiddelet.

EKSEMPEL 4

5 g L-arginin-L-aspartat og 5 g mannitol ble oppløst i 80 ml destillert vann for injeksjon. pH av oppløsningen ble innstilt til 5,0. 200 mg av den modifiserte t-Pa (2810) ble oppløst i oppløsningen. Destillert vann for injeksjon ble tilsatt oppløsningen til total mengde 100 ml. Oppløsningen ble filtrert under sterile betingelser og helt inn i hette-

glass hvert i en mengde på 1 ml og frysetørket. Hetteglassene ble forseglet.

Separat ble ampuller som hver som løsningsmiddel inneholdt 1 ml destillert vann for injeksjon fremstilt.

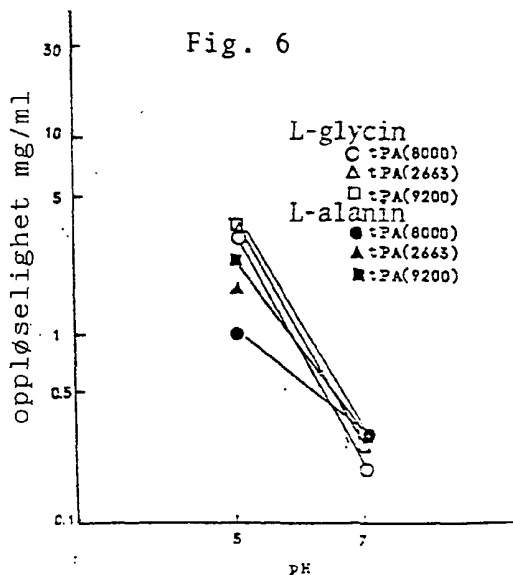
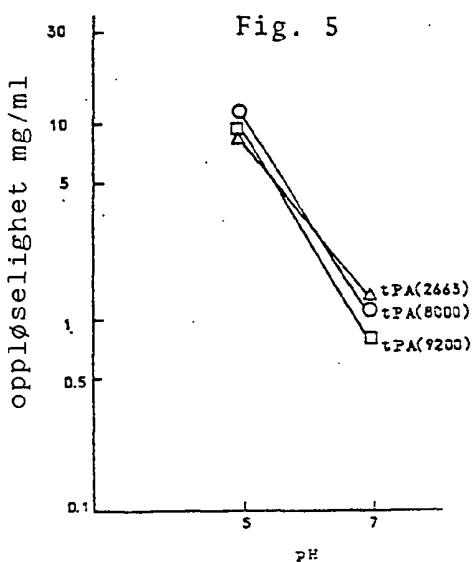
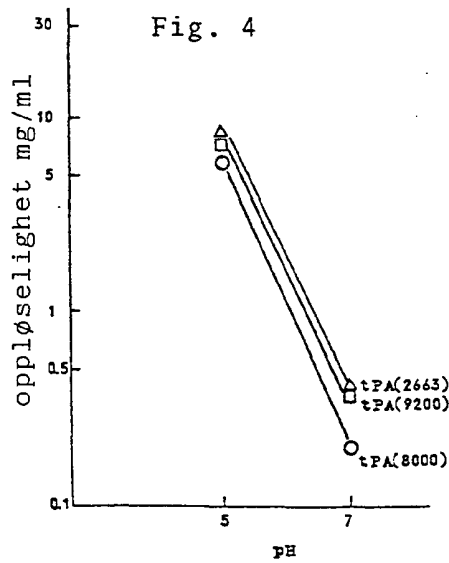
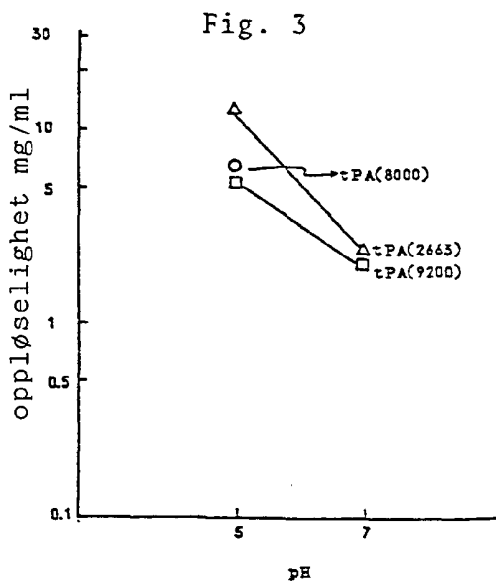
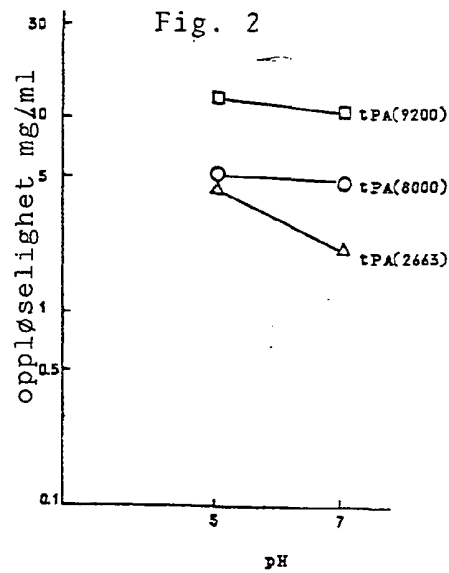
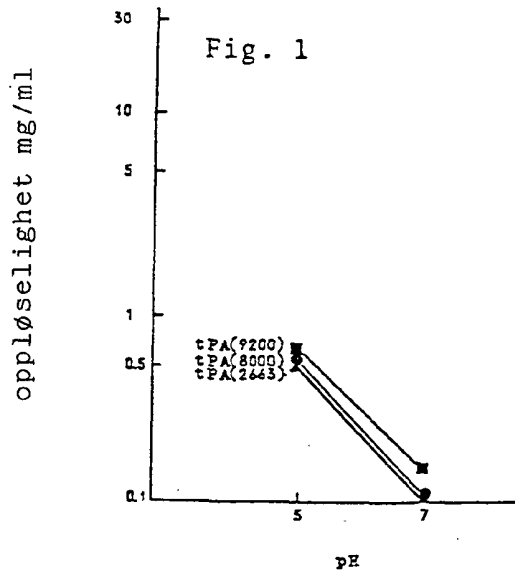
EKSEMPEL 5

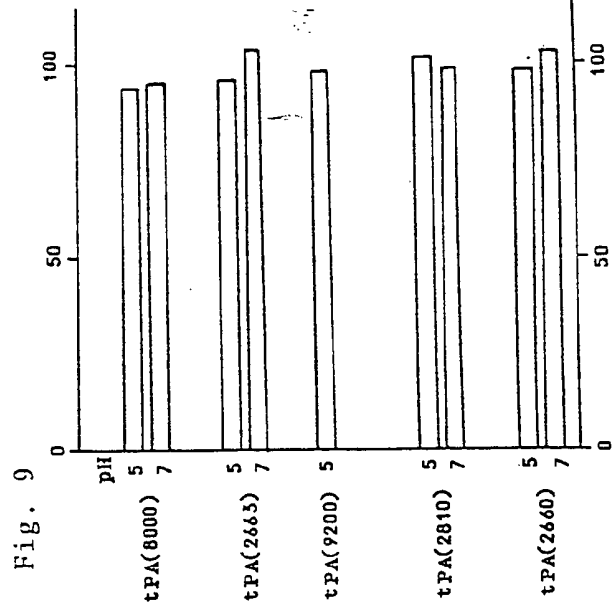
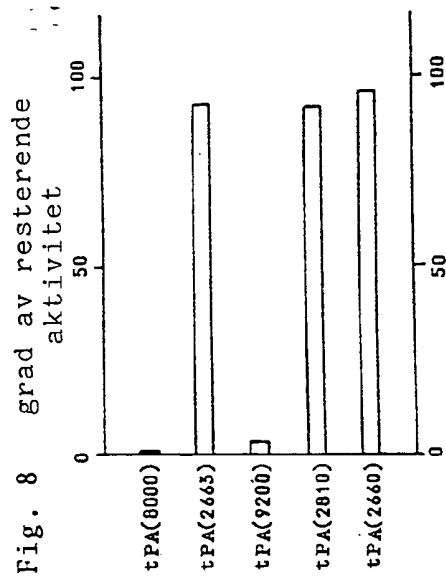
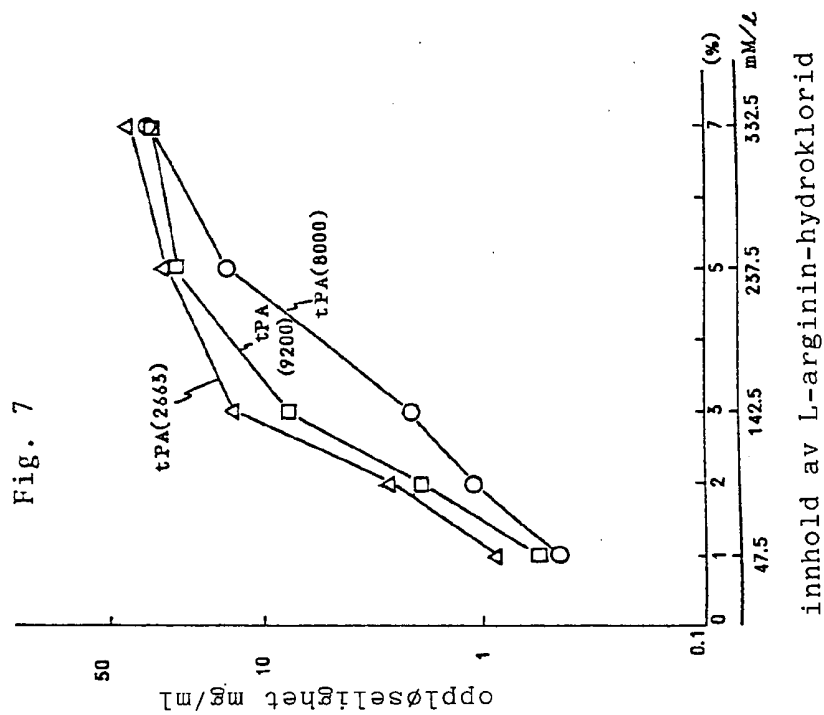
300 mg L-argininhydroklorid, 50 mg L-asparaginsyre og 500 mg mannitol ble oppløst i 8 ml destillert vann for injeksjon. pH i oppløsningen ble innstilt til 7,0. 50 mg av den modifiserte t-Pa (2660) ble oppløst i oppløsningen. Destillert vann for injeksjon ble tilsatt oppløsningen til total mengde 10 ml. Oppløsningen ble filtrert under sterile betingelser, helt inn i hetteglass hvert i en mengde tilsvarende 1 ml og frysetørket. Hetteglassene ble forseglet.

Separat ble det fremstilt ampuller som hver som løsningsmiddel inneholdt 1 ml destillert vann.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et injeksjonspreparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å formulere en farmakologisk effektiv mengde av en modifisert t-PA, idet den nevnte modifiserte t-PA er forskjellig fra naturlig t-PA, 20 mM eller mer av en eller flere aminosyrer valgt fra gruppen bestående av arginin, histidin, lysin, ornitin, glycin, alanin, valin, leucin, serin, treonin, glutaminsyre og asparaginsyre, eller et salt derav, og en farmakologisk akseptabel bærer.
2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at aminosyren er en basisk aminosyre.
3. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at aminosyren velges fra gruppen bestående av arginin, histidin, lysin og ornitin.
4. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at aminosyren er en sur aminosyre.
5. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at aminosyren velges fra gruppen bestående av glutaminsyre og asparaginsyre.
6. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at aminosyren er en nøytral aminosyre.
7. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at aminosyren er glycin, alanin, valin, leucin, serin eller treonin.





178325