



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 321139

(13) B1

(51) Int Cl.

A61K 38/37 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/44 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19964081	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.03.31 PCT/SE95/00348
(22)	Inng.dag	1996.09.27	(85)	Videreføringsdag	1996.09.27
(24)	Løpedag	1995.03.31	(30)	Prioritet	1994.03.31, SE, 9401105 1995.01.05, SE, 9500036
(41)	Alm.tilgj	1996.11.29			
(45)	Meddelt	2006.03.27			
(73)	Innehaver	Biovitrum AB , Patent Department, Lindhagensgatan 133, 11276 STOCKHOLM, SE			
(72)	Oppfinner	Jack Spira,, Stockholm, SE Thomas Österberg, Golkungagatan 88 B, S-116 22 Stockholm, SE Lars Widlund, Spånga, SE Brita Sjöström, Saltsjö-Duvnäs, SE Marianne Mikaelsson,, Bromma, SE			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS , Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Farmasøytisk preparat egnet for subkutan, intramuskulær eller intradermal administrering.			
(56)	Anførte publikasjoner	Arznem.Forsch./Drug Res. 39, No. 4, 1989, side 463-466 Medical Intelligence-Pool, Vol. 275, No. 10, 1996 WO9109122, WO9201440, WO9324137			
(57)	Sammendrag				

En farmasøytisk formulering for subkutan, intramuskulær eller intradermal administrering omfattende koagulasjonsfaktor VIII eller faktor IX og anvendelse derav ved fremstilling av et medikament for behandling av hemofili A eller B. Formuleringen omfatter koagulasjonsfaktor VIII eller faktor IX med en aktivitet på minst 200 IU/ml og et additiv som øker biotilgjengeligheten av faktor VIII eller faktor IX. Tester med faktor VIII gir et terapeutisk nivå av faktor VIII i blodstrømmen i en overraskende lang tidsperiode etter subkutan, intramuskulær eller intradermal administrering. Faktor VIII er passende en høyrenset rekombinant faktor VIII og fortrinnsvis et delesjonsderivat derav som kan anvendes ved fremstilling av et medikament for subkutan administrering.

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse angår et farmasøytisk preparat egnet for subkutan, intramuskulær eller intradermal administrering. Formuleringen omfatter koagulasjonsfaktor VIII med en aktivitet på minst 500 IU/ml og et additiv som øker den biologiske tilgjengelighet av faktor VIII. Tester med faktor VIII gir et terapeutisk nivå av aktiv faktor VIII i blodstrømmen i en overraskende lang tidsperiode etter subkutan, intramuskulær eller intradermal administrering. Faktor VIII er passende en høyrenset rekombinant faktor VIII, og fortrinnsvis et delesjonsderivat derav, som kan anvendes ved fremstilling av et medikament for subkutan administrering.

Oppfinnelsens bakgrunn

Hemofili er en nedarvet sykdom som har vært kjent i århundrer, men det er kun i de siste fire tiår at det har vært mulig å skjelne mellom de forskjellige former; hemofili A, hemofili B og hemofili C. Hemofili A er den mest hyppige form. Den rammer kun individer av hannkjønn med en hyppighet på 1 eller 2 individer pr. 10 000 levende fødte individer. Sykdommen er forårsaket av sterkt redusert nivå eller fravær av biologisk aktiv koagulasjonsfaktor VIII (antihemofilifaktor), som er et protein som vanligvis er til stede i plasma. Den kliniske manifestasjon av hemofili A er en sterk blødnings- tendens, og før behandling med faktor VIII-konsentrater ble innført, var gjennomsnittsalderen for disse pasienter lavere enn 20 år. Konsentrater av faktor VIII erholdt fra plasma har vært tilgjengelige i ca. tre tiår. Dette har forbedret situasjonen for behandling av hemofilipasienter vesentlig og gitt dem mulighet til å leve et normalt liv.

Det er allment anerkjent at alvorligheten av hemofili A og B kan deles i tre kategorier: alvorlig, moderat og mild. Ved alvorlig hemofili A er plasmanivået av faktor VIII-aktiviteten i blodet mindre enn 1 % av det normale plasmanivå. Ved moderat hemofili A er plasmanivået av faktor VIII-aktiviteten i blodet i området fra 1 opp til 4 % av det normale plasmanivå. Ved mild hemofili A er plasmanivået av faktor VIII-aktiviteten i blodet i området fra 5 opp til 25 %

av det normale plasmanivå. Det normale plasmanivå av faktor VIII-aktivitet i blodet er definert som 1 IU/ml blod.

Alvorlig, moderat og mild hemofili B er definert ved de samme plasmanivåer som de gitt for faktor VIII ovenfor. Det

5 refereres her til Inga Marie Nilsson i Hemophilia, Pharmacia Plasma Products, Stockholm, Sverige, s. 2-3, 1994.

Et medikament med et meget stort og labilt molekyl, slik som koagulasjonsfaktor VIII med en molekylmasse på 170 til 300 kDa, gis vanligvis intravenøst fordi disse medika-
10 menter vanligvis oppviser en meget lav biotilgjengelighet på grunn av utilstrekkelig absorpsjon og alvorlig nedbrytning, dersom de gis subkutan, intramuskulært eller intradermalt. Et faktor VIII-konsentrat oppløst i natriumsitrat og injisert intramuskulært, ga således et maksimalt sirkulasjonsnivå på
15 kun 1,4 % av det normale plasmanivå (Pool et al., New England J. Medicine, vol. 275, nr. 10, s. 547-548, 1966). Undersøkelsene avslørte dessuten at det ikke var noen signifikant forskjell på aktiviteten gjenvunnet i sirkulasjonen, uten hensyn til hvorvidt sitrat ble tilsatt til preparatet. I en senere
20 undersøkelse ble faktor VIII med høy renhet administrert intramuskulært til hemofile hunder og frivillige mennesker (Johnson et al., Br. J. Hematology, vol. 21, s. 21-41, 1971). Selv om dosene var mye høyere enn de anvendte av Pool et al., viste verken hundene eller de frivillige mennesker en signifi-
25 kant økning i plasmafaktor VIII-nivåer. I realiteten forble plasmafaktor VIII-konsentrasjonen i de hemofile frivillige mennesker under 1 % av det normale plasmanivå, dvs. at den alvorlige hemofili A vedvarte selv etter administrering i fravær av additiver som øker biotilgjengeligheten.

30 Forskjellige additiver er blitt foreslått for økning av absorpsjonen av et stort antall farmasøytiske midler, inkludert små molekyler som insulin og peptidfraksjoner av faktor VIII. WO-A-92/01440 angår således anvendelse av dimetyl- α -syklodekstrin for forhøyelse av transmukosa-admini-
35 strering av insulin med en molekylmasse på ca. 5 800 Da. Informasjon angående transport av små molekyler ved hjelp av ikke-inntrengende metoder, kan ikke overføres til transport av store molekyler til den intravenøse sirkulasjon ved subkutan,

intramuskulær eller intradermal administrering. Dette er spesielt tilfelle fordi målet for WO-A-92/01440 er overflødige injeksjoner av (poly)peptider eller proteiner. Før intramuskulær administrering anvendes dessuten fysiologisk salt-

5 løsningsmiddel for å oppløse peptidfraksjoner av faktor VIII med en molekyllmasse fra 1 000 til 20 000 Da (Conte et al., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, vol. 39(I), nr. 4, s. 463-466, 1989). Eksperimentene angår også her små molekyler som gir en ukjent biotilgjengelighet fordi aktiviteten av peptidfraksjonene av

10 faktor VIII ikke er bestemt.

EP-A-0 522 491 angår anvendelse av en vannløselig type av hyaluronsyre i kombinasjon med et vannløselig protein og viser ingen vesentlig farmakologisk aktivitet for å forhøye administrering av et farmakologisk aktivt polypeptid, for-

15 trinnvis med en molekyllmasse lavere enn ca. 20 kDa. Blodkoagulasjonsfaktorer nevnes blant et stort antall polypeptider. Det foreligger dessuten ingen eksempler som viser den mulige virkning av hyaluronsyre på administrering av noen blodkoagulasjonsfaktor, f.eks. ved injeksjon.

20 JP-A-63-063624 angår anvendelse av kollagen for tilveiebringelse av langsom frigivelse av et uspesifisert legemiddel ved f.eks. subkutan administrering.

JP-A-56-127308 angår emulsjoner inneholdende blodkoagulasjonsfaktor VIII, soyaolje og fosfolipider. Formålet

25 med disse emulsjoner er å eliminere problemene som påtreffes ved konvensjonell parenteral administrering. Emulsjonene administreres derfor oralt, hvilket er vist i flere av eksemplene.

Faktor VIII kan også anvendes for andre terapeutiske

30 formål enn for behandling av hemofili A. WO-A-93/24137 angår således formuleringer inneholdende FVIII ment for intradermal eller topisk administrering som et antiinflammatorisk middel. Formuleringene er ment for lokal administrering til ikke-hemofile menneskelige legemer, og ikke til den intravenøse

35 sirkulasjon hos mennesker som lider av hemofili A. Den terapeutiske virkning er således lokal og ikke systemisk, hvilket fordres for å behandle hemofili A.

Alle for tiden tilgjengelige faktor VIII-preparater

på markedet foreligger som en formulering for intravenøs administrering, og hovedmengden av faktor VIII-preparatene er stabiliserte med humant serumalbumin.

Store og labile proteiner administreres således vanligvis intravenøst, slik at medikamentet er direkte tilgjengelig i blodstrømmen. Det ville imidlertid være fordelaktig dersom et medikament kunne administreres subkutan, intramuskulært eller intradermalt, fordi disse administreringsformer er mye lettere å håndtere for pasienten. Dette gjelder spesielt dersom medikamentet må tas regelmessig hele livet, og behandlingen må startes tidlig, allerede under pasientens første leveår.

Beskrivelse av oppfinnelsen

Ved foreliggende oppfinnelse ble det meget overraskende funnet at faktor VIII, som er et meget sensitivt protein, kan administreres subkutan og, i motsetning til all tidligere erfaring, erholdes en bemerkelsesverdig absorpsjon og et overraskende høyt nivå av aktivt faktor VIII-protein i blodet.

Ved foreliggende oppfinnelse er det således utviklet en formulering som gjør det mulig å administrere faktor VIII subkutan, intramuskulært eller intradermalt, og som gir en stor fordel for alle pasienter med behov for faktor VIII.

Rekombinant faktor VIII SQ indikeres for behandling av klassisk hemofili. Halveringstiden for r-VIII SQ er ca. 12 timer for mennesker ved intravenøs injisering. For profylaktisk behandling gis 15-40 IU/kg kroppsvekt av faktor VIII tre ganger pr. uke.

En intravenøs injeksjon er vanligvis 5-20 ml. En injeksjon gitt subkutan er fra 0,05 til 1 ml, og konsentrasjonen av faktor VIII må derfor være meget høy i en slik formulering. Dette er mulig å oppnå ved f.eks. den høyrensede rekombinante faktor ifølge foreliggende oppfinnelse i en formulering med et additiv, slik som en hydrolysert gelatin-, hyaluronsyre- og/eller soyaoljeemulsjon. Ved foreliggende oppfinnelse er det således mulig å oppnå en biotilgjengelighet på minst ca. 15 %, fortrinnsvis ca. 30 %, etter subkutan, intramuskulær eller intradermal administrering, sammenlignet med

biotilgjengeligheten oppnådd etter intravenøs administrering. Med en spesielt grundig utvelgelse av bestanddelene av formuleringen ifølge foreliggende oppfinnelse, er det mulig å oppnå en biotilgjengelighet på minst 50 %, og til og med 70 %, etter subkutan, intramuskulær eller intradermal administrering, sammenlignet med biotilgjengeligheten oppnådd etter intravenøs administrering.

Oppfinnelsesideen er således en kombinasjon av det funn at faktor VIII kan absorberes i blodstrømmen når den gis i form av en subkutan, intramuskulær eller intradermal farmasøytisk formulering, og at det er mulig å produsere en spesiell formulering som gir den nødvendige økning i biotilgjengelighet i faktor VIII for dette formål.

Foreliggende oppfinnelse angår således et farmasøytisk preparat egnet for subkutan, intramuskulær eller intradermal administrering, kjennetegnet ved at den omfatter (i) minst 500 IU/ml av koagulasjonsfaktor VIII, eller et derivat derav med tilsvarende biologisk aktivitet på minst 170 kDa; og (ii) et organisk additiv med evne til å tilveiebringe et plasmanivå av faktor VIII som er minst 1,5 % av det normale plasmanivå i blodet i minst 6 timer etter administrering, det organiske additiv er utvalgt fra soyabønneoljeemulsjoner, hydrolysert gelatin, hydrolysert kollagen, poly(02)hydroksyetylstivelse, hyaluronsyre, dekstraner, L-histidin og derivater og/eller kombinasjoner derav.

Et terapeutisk nivå ved foreliggende oppfinnelse angår minst 1,5 % av det normale plasmanivå for faktor VIII-aktivitet i blodet. Faktor VIII-aktiviteten i blodet er passende 2,5 % av det normale plasmanivå og fortrinnsvis minst 4 %.

Med formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse er det mulig å opprettholde et terapeutisk akseptabelt nivå av VIII:C eller IX:C i minst 6 timer, passende mer enn 12 timer, fortrinnsvis mer enn 24 timer og helst mer enn 48 timer. Med optimaliserte formuleringer er det antakeligvis mulig å opprettholde et terapeutisk akseptabelt nivå av VIII:C eller IX:C i minst 96 timer, og selv mer enn 168 timer. På denne måte kan administreringshyppigheten holdes på et minimum og fremdeles

gi den tilsiktede terapeutiske virkning. Formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også være egnede for behandling på forespørsel.

Formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse er
5 anvendbare for behandling av hemofili A eller B, sykdommer som, dersom de er til stede, er fremherskende i hele blodsystemet. En forutsetning for vellykket behandling er således administrering på en slik måte at det oppnås en systemisk virkning. En slik systemisk virkning oppnås ved foreliggende
10 oppfinnelse, i motsetning til andre teknikker hvor lokale, f.eks. antiinflammatoriske virkninger er ønsket.

Formuleringen inneholdende faktor VIII gis fortrinnsvis subkutan.

Faktor VIII-aktiviteten i formuleringene er minst
15 500 IU/ml og fortrinnsvis høyere enn 1 000 IU/ml. Det er spesielt foretrukket at faktor VIII-aktiviteten er høyere enn 1 500 IU/ml i formuleringen, og mest foretrukket at aktiviteten er fra 5 000 til 100 000 IU/ml. Det gitte volum kan være større en 0,01 ml, passende 0,1 til 2 ml, fortrinnsvis 0,25
20 til 1,5 ml og helst 0,5 til 1 ml. Volumet kan altså være 0,1 til 1 ml.

Faktor VIII kan enten være avledet fra plasma eller fremstilt ved hjelp av rekombinante DNA-teknikker.

Terapeutiske faktor VIII-konsentrater er inntil i dag
25 fremstilt ved fraksjonering av plasma. Det er imidlertid nå tilgjengelige fremgangsmåter for fremstilling av faktor 8 i cellekultur ved anvendelse av rekombinante DNA-teknikker, som rapportert i f.eks. W. Wood et al., Nature 312, s. 330-37, 1984 og EP-A-160 457.

30 Faktor VIII-konsentrater avledet fra humant plasma inneholder mange fragmenterte, fullt aktive faktor VIII-former (Andersson et al., Proc. Natl. Sci. USA, vol. 83, s. 2979-83, mai 1986). Den minste aktive form av human faktor VIII har en molekyllmasse på 170 kDa og består av to kjeder på 90 kDa og
35 80 kDa holdt sammen av en metallionbro. Det refereres her til EP-A-197 901. Pharmacia AB, Sverige, har utviklet et rekombinant faktor VIII-produkt som tilsvarer 170 kDa plasmafaktor VIII-formen i terapeutiske faktor VIII-konsentrater. Det av-

kuttete rekombinante faktor VIII-molekyl betegnes r-VIII SQ og produseres ved kinesisk hamsterovarie(CHO)celler i en celledyrkningsprosess i serumfritt medium.

Strukturen og biokjemien for rekombinant faktor VIII-produkter generelt er beskrevet av Kaufman i Trends in Biotechnology, vol. 9, 1991 og Hematology, 63, s. 155-65, 1991. Strukturen og biokjemien for r-VIII SQ er beskrevet i WO-A-91/09122.

Når faktor VIII er rekombinant kan den enten foreligge i sin uforkortede form eller fortrinnsvis som et delesjonsderivat derav. Mer foretrukket er delesjonsderivatet rekombinant faktor VIII SQ (r-VIII SQ). Med delesjonsderivat menes her koagulasjonsfaktor VIII hvori hele eller deler av B-domenet mangler. Faktor VIII-molekylet, og spesielt r-VIII SQ-molekylet, kan dessuten være kjemisk modifisert, f.eks. ved pegylering, kovalent bundne karbohydrater eller polypeptider, for å forbedre stabiliteten av molekylet *in vivo*.

Den anvendte faktor VIII ved foreliggende oppfinnelse er høyrenset, dvs. at den har en spesifikk aktivitet på mer enn 5 000 IU/mg protein, og endog mer enn 12 000 IU/mg, og stabiliseres fortrinnsvis uten tilsetning av albumin.

Additiver som øker biotilgjengeligheten av faktor VIII er organiske forbindelser *per se*, salter derav, emulsjoner eller dispersjoner inneholdende organiske forbindelser *per se* eller salter derav, f.eks. dispersjoner av polare lipider, eller enhver kombinasjon eller addisjonssekvens derav. Organiske forbindelser *per se* anvendelige ved foreliggende oppfinnelse er f.eks. aminosyrer, peptider, proteiner og polysakkarider. Peptider inkluderer dipeptider, tripeptider, oligopeptider og polypeptider, slik som kollagen og gelatin. Kollagenet og gelatinet er fortrinnsvis hydrolysert. Polysakkarider inkluderer f.eks. kitosaner, syklodekstriner, stivelse, hyaluronsyre, dekstraner, cellulose og ethvert derivat, kombinasjoner og/eller addisjonssekvenser derav. Stivelsen er fortrinnsvis hydrolysert. Emulsjonene inkluderer olje-i-vann-emulsjoner med olje som den dispergererte fase og vann-i-olje-emulsjonen med olje som den kontinuerlige fase. Oljen kan være av vegetabilsk eller animalsk opprinnelse eller

den kan være syntetisk produsert. Den vegetabiliske olje i emulsjonene er passende soyaolje eller saflorolje, eller enhver kombinasjon derav. En foretrukket emulsjon er "Intralipid" solgt av Pharmacia AB, Stockholm, Sverige, som
5 ytterligere inneholder egglecitin. De polare lipider er passende én eller flere fosfolipider eller glykolipider eller enhver kombinasjon derav. Hyaluronsyren er fortrinnsvis "Healon" solgt av Pharmacia AB Uppsala, Sverige. Dekstranet er fortrinnsvis "Promiten" som inneholder 150 mg/ml av den aktive
10 forbindelsen Dekstran 1, og for øvrig natriumklorid, saltstyre til pH ca. 4,5 og vann for injeksjonsvæske, solgt av Pharmacia AB Uppsala, Sverige.

Additivene som øker biotilgjengeligheten av faktor VIII kan tilsettes til formuleringen før tørking eller ved
15 rekonstitusjon, eller de kan tilsettes til en stabil løsning eller dispersjon inneholdende faktor VIII. En kombinasjon av minst to av de nevnte additiver kan også tilsettes. To eller flere av de nevnte additiver kan dessuten tilsettes i rekkefølge.

20 Ett eller flere antikoagulasjonsmidler kan også tilsettes til formuleringen i en ikke-terapeutisk mengde. Antikoagulasjonsmidlene kan f.eks. være glykosaminglykaner som hepariner, heparinfragmenter, heparinderivater eller heparansulfat. En foretrukket gruppe av glykosaminglykaner er de lav-
25 molekylære hepariner (LMWH) med en gjennomsnittlig molekylmasse på opp til ca. 10 000 Da, mer foretrukket fra 2 000 opp til 8 000 Da.

Før administrering kan én eller flere vandige løsninger eller dispersjoner tilsettes, i enhver blanding
30 eller rekkefølge, til en formulering ifølge foreliggende oppfinnelse som er en stabil vandig løsning, en dispersjon eller tørket form.

Formuleringen kan også omfatte natrium- eller kaliumklorid, fortrinnsvis i en mengde mer enn 0,1 M.

35 Assosiasjonen av de tunge og lette kjeder av faktor VIII er avhengig av tilstedeværelse av kalsium (eller andre divalente metallioner). Kalsium ble her tilsatt som kalsiumklorid (CaCl_2), men andre salter, slik som kalsiumglukonat,

kalsiumglubionat eller kalsiumgluseptat kan også anvendes, fortrinnsvis i en mengde mer enn 0,5 mM.

En aminosyre anvendes fortrinnsvis for å bufre systemet, og den beskytter også proteinet i den amorfe fase dersom formuleringen frysetørkes. En egnet buffer kan være L-histidin, lysin og/eller arginin. L-histidin er primært blitt valgt på grunn av den gode bufferkapasitet av L-histidin rundt pH 7.

Et ikke-ionisk overflateaktivt middel kan også være til stede i formuleringen og velges da fortrinnsvis fra blokk-kopolymerer, slik som en polyoksamer eller polyoksyetylen-sorbitan-fettsyreester, slik som polyoksyetylen-(20)-sorbitan-monolaurat eller polyoksyetylen-(20)-sorbitanmonooleat. Det ikke-ioniske overflateaktive middel bør, dersom det anvendes, fortrinnsvis være til stede i en mengde høyere enn den kritiske micellekonsentrasjon (CMC). Se Wan og Lee, Journal of Pharm Sci, 63, s. 136, 1974.

Polyoksyetylen-sorbitan-fettsyreesteren anvendes fortrinnsvis i en mengde på mindre enn 0,01 mg/ml.

Monosakkarider, disakkarider eller sukkeralkoholer, fortrinnsvis sukrose, kan tilsettes til denne formulering. Antioksidanter, slik som glutatation, acetylcystein, tokoferol, metionin, butylhydroksytoluen og/eller butylhydroksyanisol kan også tilsettes.

Kompleksdannende midler, slik som EDTA og sitronsyre, kan også være til stede i små konsentrasjoner for å stabilisere faktor VIII-molekylene dersom de oppviser en sterkere affinitet for destabiliserende metallioner enn for kalsium eller andre divalente metallioner som forbinder kjedene av faktor VIII. Konserveringsmidler, slik som benzylalkohol, fenol, sorbinsyre, parabener og klorkresol, kan dessuten også tilsettes.

Formuleringen omfatter fortrinnsvis L-histidin og sukrose. Forholdet mellom natriumklorid og L-histidin og sukrose i preparatet for frysetørking er fortrinnsvis mer enn 1:1 (vekt:vekt), fortrinnsvis mer enn 2:1 (vekt/vekt).

Formuleringen kan omfatte

i) minst 200 IU/ml faktor VIII, fortrinnsvis minst

1 500 IU/ml av et delesjonsderivat av rekombinant faktor VIII,
ii) minst 0,01 mg/ml av en polyoksyetylen-sorbitan-
fettsyreester,

iii) natriumklorid, fortrinnsvis i en mengde på mer
5 enn 0,1 M,

iv) kalsiumsalt, slik som kalsiumklorid eller
kalsiumglukonat, fortrinnsvis i en mengde på mer enn 0,5 mM,

v) en aminosyre, slik som L-histidin, i en mengde på
mer enn 1 mM,

10 vi) et additiv som øker biotilgjengeligheten av
faktor VIII.

Formuleringen kan foreliggende i en tørket form, for-
trinnsvis frysetørke. Før administrering kan det tørkede
produkt rekonstitueres med en vandig løsning eller en disper-
15 sjon, f.eks. en suspensjon, en liposomal formulering eller en
emulsjon.

Formuleringen ifølge foreliggende oppfinnelse kan
også være en stabil vandig løsning klar for administrering.
Den kan også være en dispersjon, f.eks. en suspensjon, en
20 liposomal formulering eller en emulsjon.

Formuleringen kan lagres i et oksygenredusert miljø,
som beskrevet i patentsøknad WO-A-94/26286.

Dataene presentert i eksemplene viser at faktor VIII,
og spesielt r-VIII SQ, kan injiseres subkutan og gjenvinnes i
25 en aktiv form intravenøst *in vivo*. Dette er et meget overrask-
ende funn fordi ingen slik formulering har vært kjent
tidligere.

Eksperimentelt

30 Materialer og metoder

Fremstilling av rekombinant faktor VIII SQ (r-VIII
SQ) ble vesentlig utført som beskrevet i WO-A-91/09122,
eksempel 1-3. En DHFR-manglende CHO-cellelinje (DG4N.Y.) ble
elektroporert med en ekspresjonsvektor inneholdende r-VIII SQ-
35 genet, og en ekspresjonsvektor inneholdende dihydrofolat-
reduktasegenet. Etter seleksjon på selektivt medium ble over-
levende kolonier amplifisert ved dyrking i trinnvis økende
mengder metotrexat. Supernatant fra de resulterende kolonier

ble individuelt screenet for faktor VIII-aktivitet. Et produksjonsklon ble utvalgt, og denne ble deretter tilpasset til serumfri dispensjonsvekst i et definert medium, og til slutt ble det utviklet en fermenteringsprosess i stor skala.

- 5 Supernatant ble oppsamlet etter bestemte tidsperioder og ytterligere renses som beskrevet nedenfor.

Det klarede, kondisjonerte medium ble pH-justert og påført en S-sepharose FF-kolonne. Etter vask ble faktor VIII eluert med en saltbuffer inneholdende 5 mM CaCl_2 .

- 10 Immunadsorpsjon ble utført på en immunaффinitetsresin hvor liganden var et monoklonalt antistoff (8A4) rettet mot den tunge kjede av faktor VIII. Før applisering av kolonnen ble S-eluatet behandlet med 0,3 % TNBP og 1 % oktoksynol 9.

- 15 Kolonnen ble ekvilibrert, vasket og faktor VIII ble eluert med en buffer inneholdende 0,05 M CaCl_2 og 50 % etylen-glykol.

- mAb-eluatet ble applisert på en Q-sepharose FF-kolonne, ekvilibrert med elueringsbufferen i immunaффinitets-trinnet. Etter vask ble faktor VIII eluert med 0,05 M L-histidin, 0,6 M natriumklorid, 4 mM kalsiumklorid og pH 6,8.

- 20 Q-eluatet ble applisert på en gelfiltreringskolonne (Superdex 200 p.g.). Ekvilibrering og eluering ble utført med en buffer inneholdende L-histidin, natriumklorid og kalsiumklorid. Proteintoppen ble oppsamlet og løsningen ble formulert før frysetørking.

- 25 Dette materiale av r-VIII SQ ble erholdt fra det siste rensingstrinn. Faktor VIII-aktiviteten og konsentrasjonen av de inaktive komponenter ble justert ved fortynning med en passende buffer inneholdende polyetylen-glykol (PEG). Løsningen ble deretter steriltfiltrert (0,22 μm), overført til utleveringsbeholdere og frysetørket.

Eksempel 1

- 35 Rekombinant faktor VIII ble fremstilt ifølge fremgangsmåten beskrevet under eksperimentelt.

Det frysetørkede preparat inneholdende r-VIII SQ var det følgende pr. ampulle, hvilket ble rekonstituert i 4 ml sterilt vann for injeksjon:

Sammensetning pr. ampulle	
L-histidin, mg	31,0
Natriumklorid, mg	70,1
Kalsiumklorid · (2 H ₂ O), mg	2,35
Polyetylenglykol (PEG 4000), mg	4,0
Polyoksyetylen-(20)-sorbitan-monooleat ("Tween 80"), mg	1
VIII:C tilsatt, IU/ampulle	4 400
VIII:C i rekonstituert løsning, IU/ml	1 060

Albino-hannmus med vekt på ca. 30 g og av stamme NMRI, SPF, ble injisert subkutan i nakken med den rekonstituerte r-VII SQ-løsning.

- 5 Det injiserte volum ved 10 000 IU/kg var 9,4 ml/kg, og ved det høyere dosenivå på 50 000 IU/kg, fem ganger større, 47 ml/kg. Ved placebobehandling ble fysiologisk saltløsning anvendt i en mengde på 9,4 ml/kg.

- 3-5 minutter før blodprøveuttak ble musene bedøvet
 10 intraperitonealt med "Mebumal" (pentobarbital) vet. 60 mg/ml. Det injiserte volum var 9,4 mg/kg, dvs. 0,3 ml pr. mus. Under anestesien ble 0,45 ml blod oppsamlet fra vena cava i plast-sprøyter inneholdende 0,05 ml 0,13 M natriumsitrat. Plasma ble
 15 deretter preparert fra det oppsamlede blod ved sentrifugering (8 800 g i 7 minutter) og oppbevart frossent i cryoflex-plastrør ved -70 °C inntil tidspunktet for bestemmelse av faktor VIII-aktivitet.

ResultaterTabell 1

VIII:C i plasma fra mus som mottok r-VIII SQ, 10 000 IU/kg
5 kroppsvekt, subkutant.

Tid etter admini- strering (timer)	VIII:C (IU/ml) X ± Sd	n antall observasjoner
0	0,82 ± 0,43	12
0,33	1,23 ± 0,41	3
1,0	1,38 ± 0,56	4
1,5	1,83 ± 0,60	12
2,0	1,43 ± 0,91	8
4,0	1,34 ± 0,72	6
6,0	1,27 ± 0,42	4
8,0	1,55 ± 0,80	4
16,0	0,62 ± 0,28	4
20,0	0,58 ± 0,12	3
24,0	0,76 ± 0,53	4

Tabell 2

VIII:C i plasma fra mus som mottok r-VIII SQ, 10 000 IU/kg kroppsvekt, intravenøst. Antall observasjoner var 6 i alle tester.

5

Tid etter administrering (min)	VIII:C (IU/ml) X
0	1,6
5	66,7
15	43,7
30	32,1
45	27,4
60	22,5
120	15,7
240	2,3

Tabell 3

Dose-respons hos mus som mottok r-VIII SQ subkutan.

Dose: Dose r-VIII SQ administrert (IU/kg).

10 Respons: VIII:C i plasma (IU/ml) 1,5 timer etter subkutan administrering

Dose (IU/kg)	Respons (IU/ml)	Respons (IU/ml) (basislinje justert)	n antall obs.
Blindprøve (basislinje)	0,82 ± 0,43	-	12
Saltløsning	1,21 ± 0,34	0,39	4
10 000	1,83 ± 0,60	1,01	12
50 000	2,47 ± 0,60	1,65	6

Resultater

1. Endringen av VIII:C i plasma med tiden etter en subkutan dose r-VIII SQ, 10 000 IU/kg, viser det typiske mønsteret for et legemiddel som absorberes fra et subkutan depot (se tabell 1). Det maksimale VIII:C-nivå i plasma observeres ca. 1,5 time etter administrering (se tabell 1). De ekstremt høye doser anvendt i de ovenfor angitte tester ble valgt for å få en virkning som var statistisk signifikant.

2. Absorpsjonen av r-VIII SQ fra et subkutan depot verifiseres ytterligere ved den observerte økning i maksimal konsentrasjon når dosen økes fem ganger. Ingen signifikant effekt ble observert på det beholdte plasmanivå av VIII:C når det subkutane injeksjonsvolum ble endret fra 9,4 til 47 ml/kg, mens dosen av r-VIII SQ ble holdt konstant. VIII:C beholdt i plasma var dessuten i det alt vesentlige ikke avhengig av osmolaliteten av administreringsløsningen.

3. Biotilgjengeligheten av r-VIII SQ etter subkutan (s.c.) administrering hos mus var ca. 10 % av biotilgjengeligheten etter intravenøs (i.v.) administrering, idet den sistnevnte er 100 % ved definisjon. I de foreliggende tester var dosenivået subkutan det samme som dosenivået intravenøst. Biotilgjengeligheten ble beregnet fra arealet under aktivitets(VIII:C)-tidskurven (AUC). Biotilgjengeligheten etter subkutan administrering kan således beregnes etter den følgende ligning (for data se tabeller 1 og 2):

$$\text{Biotilgjengelighet}_{s.c.} = \text{AUC}_{s.c.} / \text{AUC}_{i.v.} \cdot \text{dose}_{i.v.} / \text{dose}_{s.c.} \quad (1)$$

Eksempel 2

Rekombinant faktor VIII ble fremstilt i overensstemmelse med metoden beskrevet under eksperimentelt med de følgende unntak: (i) Materialet av r-VIII SQ som ble beholdt fra det endelige rensingstrinn ble fortynnet med en buffer som ikke inneholdt PEG, (ii) r-VIII SQ-løsningen ble ikke frysetørket, den ble lagret ved -70 °C.

r-VIII SQ-løsningen hadde følgende sammensetning:

Sammensetning pr. ampulle	
L-histidin, mg	7,5
Sukrose, mg	158
Natriumklorid, mg	45
Kalsiumklorid · (2 H ₂ O), mg	1,25
Polyoksyetylen-(20)-sorbitan-monooleat ("Tween 80"), mg	0,50
VIII:C tilsatt, IU/ampulle	6 070
VIII:C, IU/ml	1 130

Fortynnet r-VIII SQ-løsning (én del r-VIII SQ-løsning + én del vann, v:v).

- r-VIII SQ-løsningen ble fortynnet med sterilt vann
5 for injeksjon (én del r-VIII SQ-løsning + én del vann, v:v)
før administrering, når dosen av VIII:C var lavere enn
3 000 IU/kg kroppsvekt.

- Cynomolgus hunnaper (*Macaca fascicularis*) med vekt ca.
3-3,5 kg, ble injisert med r-VIII SQ-løsningen subkutan i det
10 dorsale område. Avhengig av dosen varierte injeksjonsvolumet
mellom ca. 0,2 til 2,0 ml/kg kroppsvekt. Subkutane injeksjoner
med enkle doser på 250, 2 500 og 5 000 IU/kg ble administrert.
Ved hvert prøveuttak ble 1,8 ml blod oppsamlet i rør innehold-
ende sitrat som antikoagulasjonsmiddel (0,2 ml). Etter sentri-
15 fugering ble plasma separert og nedfrosset i aliquoter
(<60 °C).

ResultaterTabell 4

VIII:C i plasma fra aper som mottok r-VIII SQ, 250 IU/kg, subkutan. VIII:C i administreringsløsningen var ca.

5 1 130 IU/ml.

Ape nr.	1	2	3
Prøveuttak etter injeksjon (timer)	VIII:C (IU/ml)	VIII:C (IU/ml)	VIII:C (IU/ml)
0	2,15	1,49	1,76
1	2,32	1,75	1,92
4	2,43	1,52	1,89
8	2,48	1,67	1,92
10	2,41	1,76	2,03
12	2,29	1,70	2,01
14	2,20	1,69	2,00
24	1,76	1,32	1,98
30	2,31	1,46	1,90
48	2,18	1,64	1,96

Tabell 5

VIII:C i plasma fra aper som mottok r-VIII SQ, 2 500 IU/kg, subkutan. VIII:C i administreringsløsningen var ca. 1 130 IU/ml.

Ape nr.	4a	5a	6a
Prøveuttak etter injeksjon (timer)	VIII:C (IU/ml)	VIII:C (IU/ml)	VIII:C (IU/ml)
0	1,85	1,43	2,18
1	1,96	1,82	2,72
4	2,70	2,22	3,14
8	3,19	2,60	3,37
10	3,19	2,81	3,46
12	3,06	1,56	3,02
14	2,56	2,42	2,85
24	2,34	2,12	2,75
30	2,20	2,01	2,55
48	2,02	1,83	2,38
Ape nr.	4b	5b	6b
Prøveuttak etter injeksjon (timer)	VIII:C (IU/ml)	VIII:C (IU/ml)	VIII:C (IU/ml)
0	1,98	1,35	2,30
2	2,43	1,88	3,05
6	3,51	2,45	3,59
9	3,91	2,47	4,16
11	3,47	2,24	3,68
13	3,11	2,06	3,34
22	2,38	1,55	2,79
40	2,01	1,49	2,38

Tabell 6

VIII:C i plasma fra aper som mottok r-VIII SQ, 5 000 IU/kg, subkutan. VIII:C i administreringsløsningen var ca. 2 470 IU/ml.

5

Ape nr.	7	8	9
Prøveuttak etter injeksjon (timer)	VIII:C (IU/ml)	VIII:C (IU/ml)	VIII:C (IU/ml)
0	2,04	1,78	1,54
2	2,99	2,37	2,99
6	4,56	3,33	5,32
9	4,75	3,89	5,70
11	4,72	3,32	5,46
13	4,23	3,06	4,63
22	3,03	2,33	3,46
40	2,76	1,77	2,60

10

15

20

Tabell 7

Dose-respons hos aper som mottok r-VIII SQ subkutant.

Dose: Dose r-VIII SQ administrert (IU/kg).

Respons: VIII:C i plasma (IU/ml) ca. 9 timer etter admini-

5 strering

Dose (IU/kg)	Respons (IU/ml)	Respons (IU/ml, basislinje justert)	n antall obs.
Blindprøve (basislinje)	1,8 ± 0,3	-	9
250		0,37 ± 0,05	3
2 500		1,70 ± 0,06	3
2 500		2,05 ± 0,57	3
5 000		3,4 ± 1,20	3

Tabell 8

Biotilgjengeligheten av r-VIII SQ etter subkutan administrering hos aper. VIII:C i administreringsløsningen ble variert mellom ca. 1 130 IU/ml til ca. 2 470 IU/ml. Biotilgjengeligheten ble beregnet ifølge ligning 1, fra data gitt i tabeller 4-6 og tilsvarende data, etter intravenøs administrering.

Dose (IU/kg kroppsvekt)	Biotilgjengelighet (%)
250	11
250	9
2 500	7
2 500	11
2 500	6
2 500	6
2 500	5
2 500	5
5 000	7
5 000	3
5 000	9

10 Resultater

1. Ifølge resultatene (tabell 4-6) følger plasma-konsentrasjonen, som en funksjon av tiden, det typiske mønster for et legemiddel som absorberes etter subkutan administrering. Den maksimale konsentrasjon av VIII:C observeres ca.

15 9 timer etter administrering.

2. Det erholdte dose-responsforhold (tabell 7) gir en ytterligere verifisering at det foregår en adsorpsjon av VIII:C i blodstrømmen etter en subkutan injeksjon.

3. Biotilgjengeligheten av r-VIII SQ, etter subkutan administrering hos aper, var ca. 5-10 % (tabell 8). Biotilgjengeligheten var vesentlig uavhengig av dosen av r-VIII SQ.

5 Eksempel 3

Rekombinant faktor VIII (r-VIII SQ) fra begge de ovenfor beskrevne preparater (eksempler 1 og 2) ble anvendt.

Albino-hannmus med vekt på ca. 30 g og fra stamme NMRI, SPF, ble injisert subkutan i nakken med r-VIII SQ-formuleringen.

Dosen var 10 000 IU/kg og injeksjonsvolumet var ca. 10 ml/kg. 3-5 minutter før blodprøveuttak ble musene bedøvet intraperitonealt med "Mebumal" (pentobarbital) vet. 60 mg/ml. Dosevolumet var ca. 0,3 ml/mus. Under anestesi ble 0,45 ml blod oppsamlet fra vena cava i plastsprøyter inneholdende 0,05 ml natriumsitrat (0,13 M). Plasma ble separert fra blodet ved sentrifugering (8 800 g i 7 minutter) og deretter lagret i Cryoflex plastrør ved -70 °C inntil bestemmelse av faktor VIII-aktivitet.

r-VIII SQ-løsningen i kombinasjon med forskjellige additiver som øker biotilgjengeligheten av faktor VIII (tabell 9), ble administrert subkutan hos mus.

25

30

35

Tabell 9

Additivene som ble tilsatt til r-VIII SQ-løsningen før subkutan administrering hos mus.

5

Additiv	Kommersielt navn/ kommersiell kilde	Konsentrasjon av additiv i den administrerte r- VIII SQ-løsning
Aminosyreblanding	"Vamin"/Pharmacia AB	4,5 N/l
Dekstran	"Promiten"/Pharmacia AB	150 mg/ml
Hyaluronsyre	"Healon"/Pharmacia AB	5 mg/ml
Hydrolysert kollagen	"Prionex"/Pentapharm Ltd.	150 g/l
Hydrolysert gelatin	"Haemaccel"/Hoechst	17,5-35 g/l
Humant serum- albumin	Albumin/Pharmacia AB	100-200 g/l
Poly(0-2-hydroksy- etyl)stivelse	"HAES-steril"/Meda	50-100 g/l
Soyaoljeemulsjon	"Intralipid"/Pharmacia AB	150-200 mg/ml

ResultaterTabell 10

- 5 VIII:C i plasma fra mus som mottok r-VIII SQ-løsning inneholdende hydrolysert gelatin subkutan. VIII:C i administreringsløsningen var ca. 1 100 IU/ml. r-VIII SQ-dosen var 10 000 IU/kg kroppsvekt.

Tid etter administrering (timer)	VIII:C (IU/ml)	n antall observasjoner
0	0,82 ± 0,43	12
1,5	1,83 ± 0,37	4
6	2,02 ± 0,43	6
16	1,94 ± 0,44	9
24	2,00 ± 0,52	5
30	1,52 ± 0,41	6
48	1,32 ± 0,41	6

Tabell 11

VIII:C i plasma fra mus som mottok r-VIII SQ-løsning inneholdende soyaoljeemulsjon subkutan. VIII:C i administreringsløsningen var ca. 1 100 IU/ml. r-VIII SQ-dosen var 10 000 IU/kg kroppsvekt.

Tid etter administrering (timer)	VIII:C (IU/ml)	n antall observasjoner
0	0,82 ± 0,43	12
1,5	1,41 ± 0,44	4
3,5	1,46 ± 0,34	5
6	1,48 ± 0,87	4
16	1,29 ± 0,25	6
16	1,35 ± 0,31	3
30	1,92 ± 0,51	6
48	1,97 ± 0,29	5

Tabell 12

VIII:C i plasma fra mus som mottok r-VIII SQ-løsning inneholdende poly-(0-2-hydroksyetyl)stivelse subkutan. VIII:C i
 5 administreringsløsningen var ca. 1 100 IU/ml. r-VIII SQ-dosen var 10 000 IU/kg kroppsvekt.

Tid etter administrering (timer)	VIII:C (IU/ml)	n antall observasjoner
0	0,82 ± 0,43	12
1,5	1,00 ± 0,44	5
3,5	1,62 ± 0,19	4
6	1,65 ± 0,69	6
16	1,62 ± 0,38	6
16	1,19 ± 0,40	4
24	0,73 ± 0,52	4
30	1,33 ± 0,39	5
48	1,10 ± 0,38	3

Tabell 13

VIII:C i plasma fra mus som mottok r-VIII SQ-løsning inneholdende hyaluronsyre subkutan. Det beregnede VIII:C i administreringsløsningen var ca. 1 100 IU/ml. r-VIII SQ-dosen var 10 000 IU/kg kroppsvekt.

Tid etter administrering (timer)	VIII:C (IU/ml)	n antall observasjoner
0	0,82 ± 0,43	12
1,5	1,67 ± 0,42	5
3,5	1,33 ± 0,35	4
6	1,72 ± 0,61	4
16	1,36 ± 0,43	5

Tabell 14

VIII:C i plasma fra mus som mottok r-VIII SQ-løsning inneholdende dekstran subkutan. VIII:C i administreringsløsningen var ca. 1 100 IU/ml. r-VIII SQ-dosen var 10 000 IU/kg kroppsvekt.

Tid etter administrering (timer)	VIII:C (IU/ml)	n antall observasjoner
0	0,82 ± 0,43	12
1,5	1,43 ± 0,43	6
3,5	1,74 ± 0,10	5
6	1,02 ± 0,51	5
16	1,54 ± 0,36	6

Tabell 15

VIII:C i plasma fra mus som mottok r-VIII SQ-løsning inneholdende hydrolysert kollagen subkutant. VIII:C i administreringsløsningen var ca. 1 100 IU/ml. r-VIII SQ-dosen var
 5 10 000 IU/kg kroppsvekt.

Tid etter administrering (timer)	VIII:C (IU/ml)	n antall observasjoner
0	0,82 ± 0,43	12
1,5	1,00 ± 0,54	6
7	1,36 ± 0,71	4
16	1,39 ± 0,93	6
24	1,31 ± 0,51	5
30	0,93 ± 0,59	4
48	1,16 ± 0,51	6

Tabell 16

VIII:C i plasma fra mus som mottok r-VIII SQ-løsning inneholdende en blanding aminosyrer subkutant. VIII:C i administreringsløsningen var ca. 1 100 IU/ml. r-VIII SQ-dosen var
 10 10 000 IU/kg kroppsvekt.

Tid etter administrering (timer)	VIII:C (IU/ml)	n antall observasjoner
0	0,82 ± 0,43	12
1,5	1,47 ± 0,79	4
7	1,66 ± 0,21	4
16	1,26 ± 0,61	6

Tabell 17

Biotilgjengeligheten av r-VIII SQ etter subkutan administrering hos mus. Den subkutan administrerte r-VIII SQ-løsning inneholdt varierende additiver i konsentrasjonen gitt i tabell 9. VIII:C i administreringsløsningen var ca. 1 100 IU/ml og dosen var 10 000 IU/kg. Biotilgjengeligheten ble beregnet fra arealet under aktivitets(VIII:C)-tidskurven opp til 48 timer. Biotilgjengeligheten etter subkutan administrering av r-VIII SQ er gitt i prosent av biotilgjengeligheten erholdt ved intravenøs administrering med den samme dose (10 000 IU/kg).

Additiv som søker biotilgjengeligheten av faktor VIII	Biotilgjengelighet (%)	Administreringsmåte
Intet	100	Intravenøs
Intet	10	Subkutan
Dekstran	35	Subkutan
Hyaluronsyre	45	Subkutan
Hydrolysert kollagen	20	Subkutan
Hydrolysert gelatin	50	Subkutan
Poly(0-2-hydroksyetyl)-stivelse	25	Subkutan
Soyaoljeemulsjon	60	Subkutan

Resultater

1. Resultatene viser at det er mulig å øke biotilgjengeligheten av r-VIII SQ. Det er også vist at en høy plasmakonsentrasjon av aktiv r-VIII SQ erholdes under en mye lengre tidsperiode, opp til mer enn 48 timer, når et additiv som øker biotilgjengeligheten ifølge foreliggende oppfinnelse inkluderes i den subkutan administrerte formulering. Dette sammenlignes med plasmakonsentrasjonen erholdt når en r-VIII

SQ-løsning uten et slikt additiv administreres subkutan. En biotilgjengelighet av aktiv r-VIII SQ på minst 50 % oppnås ved subkutan injeksjon av en løsning inneholdende r-VIII SQ og hydrolysert gelatin eller soyaoljeemulsjon.

P a t e n t k r a v

1. Farmasøytisk preparat egnet for subkutan, intra-
5 muskulær eller intradermal administrering,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter (i) minst
500 IU/ml av koagulasjonsfaktor VIII, eller et derivat derav
med tilsvarende biologisk aktivitet på minst 170 kDa; og (ii)
et organisk additiv med evne til å tilveiebringe et plasmanivå
10 av faktor VIII som er minst 1,5 % av det normale plasmanivå i
blodet i minst 6 timer etter administrering, det organiske
additiv er utvalgt fra soyabønneoljeemulsjoner, hydrolysert
gelatin, hydrolysert kollagen, poly(0-2)hydroksyetylstivelse,
hyaluronsyre, dekstraner, L-histidin og derivater og/eller
15 kombinasjoner derav.

2. Formulering ifølge ethvert av kravene 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte koagulasjonsfaktor
VIII er en rekombinant faktor VIII.
- 20

3. Formulering ifølge ethvert av kravene 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte derivat av faktor
VIII er et rekombinant derivat av faktor VIII med en
molekylmasse på minst 170 kDa.
- 25

4. Formulering ifølge ethvert av kravene 1 til 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den i tillegg omfatter
minst 0,01 mg/ml av polyoksyetylen sorbitanfettsyreester, minst
0,1 M natriumklorid, minst 0,5 M kalsiumsalt, og/eller minst 1
30 mM L-histidin.