

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 863077 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **863077**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁴)
A61K 37/465

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **28.07.1986**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **28.07.1986**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **30.01.1987**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

29.07.1985 US 759785

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Smithkline Beckman Corporation, One Franklin Plaza, Philadelphia, PA 19103, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Malefyt, Thomas Robert, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Meyers, Chester Allen, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Farmaseuttinen annosyksikkö.

Farmaceutisk dosenhet.

Farmaseuttinen annosyksikkö

Tämä keksintö kohdistuu farmaseuttiseen koostumukseen parenteraalista annostelua varten ja erityisesti farmaseuttiseen annosyksikköön trombolyyttistä terapiaa varten.

Ihmiskudoksen plasminogeeniaktivaattori (tPA) on noin 70 000 daltonin glykoproteiini, jossa on 527 aminohappoa. Sitä erittävät useat ihmiskudokset ja sitä on luonnostaan läsnä seerumissa. tPA toimii verihyytymän liukenemisen yhteydessä muuttamalla plasminogeenin plasmiiniksi. tPA:lla on affiniteettia fibriiniä kohtaan ja se on aktiivisempi fibriinin läsnäollessa. Täten, tPA on käyttökelpoinen hoidettaessa häiriöitä, jotka liittyvät veritukosten muodostumiseen, kuten syvällä olevien verisuonien tukos, akuutti sydänlihaksen infarkti ja keuhkoveritulppa. Katso yleisesti, Rijken et al., *Biochem. Biophys. Acta* 580:140 (1979), Vetterlein et al., *J. Biol. Chem.* 256:575 (1979), Rijken et al., *J. Biol. Chem.*, 256:7035 (1981) ja Matsuo et al., *Nature* 291:590 (1981).

Tietyt solulinjat, käsittäen Bowesin melanoomasolulinjan, ylituottavat tPA:ta. Katso esim., Wilson et al., *Canc. Res.* 40:933 (1980). Collen et al., EP-A-41,766 esittää Bowesin melanoomajohdannais-tPA:n puhdistamisen. Wilson, EP-A-113,319 esittää tPA:n tuottamisen ja puhdistamisen käyttäen seerumista riippumatonta Bowesin melanoomasolulinjaa.

tPA:ta voidaan valmistaa myös rekombinantti-DNA -tekniikalla. mRNA:n eristämisen tPA:ta varten on esittänyt esim., Opendakker et al., *Eur. J. Biochem.* 121:269 (1982). cDNA:n eristämisen tPA:n osaa varten on esittänyt Edlund et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:349 (1983). cDNA:n kloonamisen tPA:ta varten *E. coli*ssa on kuvannut Pennica et al., *Nature* 301:214 (1983). cDNA:n kloonamisen tPA:ta varten

E. colissa ja kiinalaisen hamsterin munasarjan soluissa on esittänyt Goeddel et al., EP-A-93,619 ja Levinson et al., EP-A-117,059.

Brouty-Boye, Bio/Technology, joulukuu 1984, s. 1058 on esittänyt tPA:n tuottamisen ihmisalkion keuhkosoluilla.

Robinson, WO84-01786 kuvaa modifioitua tPA:ta, josta puuttuvat kokonaan tai osittain natiivissa tPA:ssa läsnäolevat hiilihydraattitähteet.

tPA ei liukene hyvin vesiliuokseen. Sen liukoisuus veteen pH-arvossa 7,0 on noin 0,1 mg/ml. Näin ollen tPA yleensä liuotetaan tyypillisillä liuotinaineilla puhdistuksen aikana. Nämä sisältävät kaatrooppiset denaturoiduroivat aineet, kuten urean ja tiosyanaatin; pinta-aktiiviset aineet, kuten detergentit; hiilihydraatit, kuten mannitolin, ja proteiinit, kuten albumiinin ja gelatiinin. Vaikka nämä aineet ilmeisesti parantavat tPA:n vesiliukoisuutta, saadut tPA-liuokset pyrkivät olemaan vähemmän stabiileita, niiden ei katsota olevan sopivia parenteraaliseen annosteluun tai niitä täytyy käyttää ei-hyväksyttävän suurissa määrissä.

Wilson, EP-A-113,319 ehdotti ei-ionisten detergenttien lisäämistä adsorption estämiseksi säiliön pintaan ja stabiilisuuden parantamiseksi. Wilsonin esittämä havainnollinen farmaseuttinen koostumus sisältää 0,075 mg/ml:ssa tPA:ta 0,3 molaarisessa natriumkloridissa ja 0,01 % Tween 80.

Goeddel et al., EP-A-93,619, esittää, että tPA voidaan formuloida vakiomenetelmillä ja ehdottaa esimerkkinä koostumusta koeputkessa, joka sisältää 25 000 kansainvälistä yksikköä tPA:ta, 25 mg mannitolia ja 45 mg NaCl:ä liuotettuna 5 ml:aan vettä ja sekoitettuna 0,9 %:n natriumkloridin kanssa.

Collen et al., EP-A-41,766, esittää, että tPA voidaan formuloida vakiomenetelmällä ilman tai lisäaineiden kanssa, kuten natriumkloridi, glukoosi, mannitoli ja albumiini. Rakenteellinen esimerkki farmaseuttista koostumusta sisältää tPA:ta, 0,01 % Tween 80 ja 0,01-1 % albumiinia tai mannitolia fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa.

Yoshizaki et al., EP-A-112,940, esittää albumiinin käytön tPA:n stabiloijana.

Murakami et al., EP-A-123,304, ehdottaa tPA:n stabilointiin gelatiinin lisäystä.

Kruithof et al., Biochem. J. 226:631-636 (1985), esittää puhdistuskaavion tPA:lle, joka on tuotettu seerumista riippumattomilla Bowesin melanomasoluilla, mikä käsittää seuraavat vaiheet: ilmastoitu väliaine sentrifugoidaan, lisätään Tween 80 ja NaN_3 supernatanttiin, säädetään pH arvoon 4,5 6-molaarisella HCL:llä, kaadetaan liuos SP-Sephadex-kolonneihin ja eluoidaan tPA NaCl:llä natriumasetaatipuskurissa, pH-arvossa 4,5 (0,1 M natriumasetattia, 0,25 M NaCl, 0,01 % Tween 80, 0,05 % NaN_3). Eluoidut fraktiot kerättiin, konsentroitiin tPA-pitoisuuteen 0,93 mg/ml (42 800 yksikköä/ml), kaadettiin Sephadex G-100 -kolonneihin natriumasetaatipuskurissa (50 mM natriumasetattia, 0,5 M MaCl:ää, 0,01 % Tween 80, 0,05 % NaN_3 , pH 4,5). Tuote konsentroitiin tPA-pitoisuuteen 0,38 mg/ml (35 000 yksikköä/ml) ja varastoitettiin -70°C :een.

American Diagnostica, Inc. myy lyofilisoitua tPA:ta. Myyjän ohjeet rekonstruointia varten ovat seuraavat: "Käytä 0,1 M etikkahappoa/natriumasetaatipuskuria, pH 3,9, sitten aseta haluttu pH. Albumiiniä, 1 mg/ml, voidaan lisätä saostumisen ehkäisemiseksi.

Esillä olevan keksinnön kohteena on valmistaa farmaseuttinen koostumus käytettäväksi tPA:n steriilin, farmaseuttisen annosyksikön valmistamisessa, missä ei tarvita tyypillisiä liuotin/stabilointiaineita, kuten kaotrooppisia aineita, pinta-aktiivisia aineita, proteiinipitoisia aineita eikä hiilihydraatteja liukenemisen aikaansaamiseksi, so. suurempi kuin liukoisuus veteen, 0,1 mg/ml.

Edelleen esillä olevan keksinnön kohteena on valmistaa tPA:n farmaseuttinen koostumus, jossa tPA on suhteellisen stabiili ympäröivässä lämpötilassa.

Edelleen esillä olevan keksinnön kohteena on valmistaa tPA:n farmaseuttinen koostumus, joka soveltuu parenteraaliseen annosteluun. Näiden ja muiden keksinnön kohteiden saavuttaminen on esitetty täydellisesti alla. Erään näkökantansa mukaan keksintö on tPA:n steriili farmaseuttinen annosyksikkö parenteraalista annostelua varten, joka sisältää tPA:ta puskuroidussa, farmaseuttisesti hyväksyttävässä liuottimessa pH-arvossa 3,5-5,5.

Toisen näkökannan mukaan keksintö on määrittämissä väliensarja, joka käsittää yhden tai useamman steriilin, tPA:ta lyofilioidussa muodossa sisältävän säiliön ja yhden tai useamman steriilin liuossäiliön rekonstruointia varten, joissa yhdessä tai molemmissa säiliöissä on puskuria ja puskuria, liuos rekonstruointia varten ja tPA:n ja rekonstruointiliuoksen määrät on valittu siten, että yhdistettäessä mainittujen säiliön sisällöt saadaan rekonstruoitu tuote, joka on farmaseuttinen yksikköannos parenteraalista annostelua varten sisältäen 0,1-15 mg/ml tPA:ta puskuroidussa, farmaseuttisesti hyväksyttävässä liuottimessa pH-arvossa 3,5-5,5. Kuvio on graafinen kuvaus tPA:n alkuhajoamisnopeudesta (aktiivisuuden menetys), 0,39 mg/ml:ssa, paitsi kun toisin on osoitettu, urea tai etikkahappo/ammonium-asetatiliuoksissa.

Nyt on keksitty, että tPA on erittäin liukoinen puskuroituna pH-arvoon 3,5-5,5, kun läsnä ei ole liuotin/stabilointiaineita. Esimerkiksi pH-arvossa 4,0 (0,1 M ammoniumasettaatti) tPA:n liukoisuus on suurempi kuin noin 15 mg/ml; pH-arvossa 5,0 (0,1 M ammoniumasettaatti), tPA:n liukoisuus on suunnilleen 3 mg/ml. Kuten aikaisemmin on esitetty, tPA:n liukoisuus veteen pH-arvossa 7,0 on noin 0,1 mg/ml.

tPA:n liukoisuus tämän keksinnön mukaisessa koostumuksessa pH:ssa 4,0 on verrattavissa liukoisuuteen, joka saavutetaan käyttämällä 2 molaarista ureaa pH:ssa 7,5. Kuitenkaan, keksinnön mukaisessa koostumuksessa tällaisen liuotinaineen läsnäoloa, joka on osmoottinen diureettinen aine ja voi aiheuttaa ei-toivottuja sivuvaikutuksia tPA:n yhdessä annosteltuna, ei tarvita hyvän liukoisuuden aikaansaamiseksi.

Toinen keksinnön ilmenemismuoto, joka on selityksissä ja vaatimuksissa esitetty, on se, että osoitetulla pH-alueella tPA on erittäin stabiili. Tämä stabiilisuuden paraneminen on ilmeinen alhaisilla kuten myös korkeilla tPA:n pitoisuuksilla keksinnön mukaisessa farmaseuttisessa annosyksikössä. Esimerkiksi seuraavassa taulukossa esitetään tPA:n prosentuaalinen aktiivisuus alhaisessa pitoisuudessa (0,39 mg/ml, jollei toisin ole osoitettu), 40 °C:ssa ureassa (2 M urea, 0,2 M NaCl, 20 mM tris-HCl ja 0,01 % Tween 80, pH 7,5) tai 100 mM ammoniumasetatissa pH:ssa 3,5-5,5 S-2251 -analyysissä. S-2251 -analyysi on kuvattu julkaisussa Weinberg et al., J. Immunol. Meth. 75:289 (1984). Korkeaa lämpötilaa käytettiin jouduttamaan aktiivisuuden merkitystä yleisen käytännön mukaisesti.

Vrk	Urea		Ammoniumasettaatti					
	pH 7,5*	pH 7,5	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 4,0**
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	67	88						65
2		51	84	84	80	94	92	
3	19	24	71	90	77	90	84	
4		13						66
5	24							
6		20						
7		2	53	62	81	82	65	
8	9	4						
9			63	62	81	62	72	
10	4							
11	37		37	56	82	69	69	52
12								
13	18							
14			34	40	70	62	60	
15	17						23	
16			22	16	53	58	24	
18			15	9	63	55		

* 1,3 mg/ml

** 9,8 mg/ml

Yllä olevat tulokset on esitetty graafisesti kuviossa. Tulokset ovat yhdenmukaisia elektroforeettisten analyysien kanssa, jotka on suoritettu 100 mM asetaattiliuokseen varastoidulla tPA:lla. Yli 3 viikkoisen ajanjakson aikana 40 °C:ssa ei havaittu lainkaan tPA:n hajoamista 100 mM ammoniumasettaattiliuoksessa pH-arvoissa 4,0, 4,5, 5,0 ja 5,5 mitattaessa polyakryyliamidigeelielektroforeesilla; pieniä nauhoja vastaten 12, 16 ja 21 kilodaltonia ilmestyi 3 viikon jälkeen 40 °C:ssa pH:ssa 3,5.

Toinen tämän keksinnön näkökohta on, että vaikka tPA inaktivoituu suuressa määrin alle noin pH 7:ssä, on havaittu, että aktiivisuus palautuu uudelleen säilytettäessä noin pH 7:ssä. Täten, annosteltaessa trombolyyttistä terapiaa tarvitsevalle potilaalle tPA:n ympäristö keksinnön mukaisessa annosyksikössä muuttuu pH 7:ään ja tPA muuttuu aktiiviseksi.

Keksinnönmukaisten farmaseuttisten annosyksiköiden stabiiliisuus kasvaa alhaisessa lämpötilassa. Täten niitä säilytetään edullisesti ei suuremmissa kuin huoneenlämpötilassa, noin 20-25 °C. Vaikka tPA keksinnön mukaisessa koostumuksessa on stabiilimpi alhaisessa lämpötilassa, so. 0-15 °C, keksinnön mukaisen farmaseuttisen annosyksikön etu on sen stabiilisuus korkeammassa lämpötiloissa, so. suurempi kuin 20 °C, mikä ilmenee yllä esitetyistä tuloksista. 4 °C:ssa, tPA 2M urealiuoksessa (pH 7,5) ja tPA 100 mM ammoniumasettaattiliuoksessa (pH 4,0) molemmat olivat säilyttäneet oleellisesti kaiken aktiivisuutensa useiden viikkojen jälkeen. Huoneen lämpötilassa (n. 22 °C) tPA keksinnön mukaisessa koostumuksessa on stabiili useita viikkoja. Mikäli halutaan pidempiä säilytysajanjaksoja, tPA sopivassa väliaineessa voidaan lyofilisoida säilyttämistä varten, ja sitten rekonstruoida keksinnön mukaisen farmaseuttisen annosyksikön muodostamiseksi välitöntä käyttöä varten tai lyhyempiaikaista säilytystä varten.

Yllä viitatus tulokset saatiin käyttämällä tPA:ta, joka oli tuotettu kiinalaisen hamsterin munasarjan (CHO) rekombinanttisoluilla, jotka oli kasvatettu seerumin läsnäollessa. Keksintö kuitenkin käsittää farmaseuttisia annosyksiköitä, jotka sisältävät tPA:ta muista lähteistä, mukaanlukien seerumin, melanoomasolut, seerumista riippumattomat nisäkässolut, bakteerit, hiivan, hyönteissolut, kasvisolut ja muut nisäkässolut, rekombinoidut tai naatiivit. Keksintöön liittyvät myös muut tPA:n muodot sisältäen, esimerkiksi, yksiketjuisen tPA:n, muunnellun tPA:n,

so. tPA, jossa yksi tai useampi aminohappo on muutettu ilman merkittävää vaikutusta tällaisen muunnellun tPA:n aktiivisuuteen, liukoisuuteen tai stabiilisuuteen, ja tPA, jonka glykosyyliähteet on modifioitu.

Ammoniumasetaatin lisäksi voidaan keksinnön mukaisessa farmaseuttisessa annosyksikössä käyttää myös muita farmaseuttisesti hyväksyttäviä puskuroivia aineita. Käyttökelpoisten puskureiden joukkoon sisältyvät seuraavien happojen ja niiden suolojen seokset: etikkahappo, adipiinihappo, sitruunahappo, maitohappo, viinihappo, asparagiinihappo ja glutamiinihappo. Muita happoja, jotka puskuroivat halutulla alueella ja jotka voivat olla käyttökelpoisia keksinnössä ovat mm. glutaarihappo, maleiinihappo, fumaarihappo, meripihkahappo, pimeliinihappo, beta-alaniini- ja enolipalorypähappo. Edullinen anioni on asetaatti. Edullisia kationeita ovat natrium ja ammonium.

Puskurin pitoisuus keksinnön mukaisessa farmaseuttisessa annosyksikössä on valittu pitämään pH arvossa 0,5-5,5, edullisesti arvossa 4,0-5,0 ja edullisimmin arvossa 4,4-4,8. Tyypillisesti puskurin pitoisuus on noin 10-200 mM, edullisesti 20-100 mM, ollen sopivan hapon natrium- tai ammoniumsuola. Puskurit valmistetaan käyttäen vakiomenetelmiä, esim. lisätään NaOH:a 100 mM etikkahappoon vedessä pH:n valikoimiseksi keksinnössä käyttökelpoiselle alueelle käytettäväksi keksinnön mukaisen farmaseuttisen annosyksikön valmistamiseen, missä puskuri on 100 mM natriumasettaatti.

Edullisesti keksinnön mukainen farmaseuttinen koostumus on vesiliuos. Kuitenkin joitain polaarisia, veteen sekoituvia, ei-vesipitoisia liuottimia voidaan käyttää parenteraalisiin koostumuksiin. Tällaisia liuottimia voidaan käyttää tässä keksinnössä sillä ehdolla, että tPA:n aktiivisuus ja stabiilisuus eivät merkittävän haitallisesti huonone.

Se, mitkä tällaisista liuottimista ovat käyttökelpoisia, voidaan määrittää tavanomaisin kokeiluin.

tPA:n ja puskurin lisäksi keksinnön mukainen farmaseuttinen annosyksikkö voi sisältää pieniä määriä muita parenteraaliseen annosteluun sopivia aineita, esim. säilöntäainetta kuten timerosaalia, klooributanolia tai metyyliiparabeenia, ja toonisuutta säätävää ainetta kuten natriumkloridia, dekstroosia tai mannitolia. Keksinnön mukainen farmaseuttinen annosyksikkö on edullisesti isotooninen (250-310 mOSM/kg). Wang et al., J. Parenteral Drug Assoc. 34:452 (1980), esittää täyteaineita, joita voidaan käyttää parenteraalisissa koostumuksissa. Lisäksi, keksinnön mukainen farmaseuttinen annosyksikkö voi sisältää muita farmaseuttisesti aktiivisia aineita kuten fibrinolyttisiä, kardiotonisia, antiarrytmisiä tai hypotensiivisiä aineita.

tPA:n farmaseuttista stabiilisuutta keksinnön mukaisessa farmaseuttisessa annosyksikössä voidaan edelleen lisätä sisällyttämällä siihen hydrofiilinen polymeerinen kylmältä suojaava aine, kuten hydroksialkyyliselluloosa, gelatiini, akaasikumi, polyvinyylipyrrolidoni (esim., molekyylipaino 10 000 - 60 000) ja polyalkyleeniglykoolit, kuten polyetyleeniglykooli (esim., molekyylipaino 4 000 - 40 000). Tällaisen aineen käyttö lisää stabiilisuutta (so. minimoi aktiivisuuden vähentymisen ja proteiinien hajoamisen) liuoksessa. Lyofilisoinnin aikana ja lyofilisointia seuraavan rekonstruoinnin aikana. Edullinen tällainen aine on polyvinyylipyrrolidoni (PVP), jonka molekyylipaino on 20 000 - 50 000.

Tällainen aine voidaan lisätä tPA-koostumukseen liuoksena tai jauhemaisessa muodossa. Edullisesti tällainen aine lisätään keksinnön mukaiseen tPA-koostumukseen ennen lyofilisointia siten, että rekonstruoitaessa aineen määrä lopullisessa, rekonstruoidussa annosyksikössä on turvallinen ja tehokas määrä. Tällainen määrä polyvinyylipyrrolido-

nin tapauksessa, molekyylipaino 40 000 (Plasdone C-30), on noin 1-15 mg PVP:tä, edullisesti 4-10 mg, per 1 mg tPA:ta. Käytettäessä gelatiinia suuremmat määrät voivat olla edullisia paremman stabiilisuuden saavuttamiseksi, esim., 10-1000 mg gelatiinia per 1 mg tPA:ta.

Keksinnön mukainen farmaseuttinen annosyksikkö sisältää 0,1-15 mg/ml tPA:ta, edullisesti 0,5 - 10 mg/ml. Se valmistetaan farmaseuttikemistin tuntemin vakiomenetelmin. Esimerkiksi, lyofilisoitu tPA voidaan rekonstruoida sopivalla puskurilla, tPA-liuoksessa voidaan dialysoida tällaista sopivaa puskuria vastaan tai tPA-liuoksen pH voidaan säätää hapolla, suolalla tai puskurilla. Täten, keksinnön mukainen farmaseuttinen annosyksikkö sisältää sellaisen annosyksikön, joka on lyofilisoitu siten, että rekonstruoitaessa vesiliuoksella saadaan aikaan keksinnön mukainen farmaseuttinen annosyksikkö liuosmuodossa. Viimeiset tPA:n puhdistuvaiheet voidaan vaivattomasti suorittaa sopivassa puskuroidussa vesiliuoksessa pH:ssa 3,5-5,5.

Keksinnön mukainen farmaseuttinen annosyksikkö valmistetaan siten, että potilas, erityisesti trombolyyttisen terapian tarpeessa oleva ihmispotilas, saa tehokkaan määrän tPA:ta parenteraalisesti, erityisesti laskimonsisäisesti, sepelvaltimon sisäisesti ja ehkä valtimon sisäisesti. tPA:n tarkka pitoisuus annosyksikössä kuten myös annettavan farmaseuttisen annosyksikön tarkka tilavuus riippuu indikaatiosta ja tilan vakavuudesta. Annettavan annosyksikön optimointi voidaan suorittaa tavanomaisen farmaseuttisen ja lääketieteellisen käytännön mukaisesti. Akuutissa sydänlihaksen infarktissa (akuutti MI) potilaalle annetaan tavallisesti kokonaisannos 25-200 mg, edullisesti noin 70-150 mg, 10-180 minuutin ajanjakson aikana, edullisesti noin 30-90 minuuttia. Esimerkiksi Collen et al., Circulation, volyymi 70, s. 1012 (1984), kuvaa MI:stä kärsivän potilaan hoitamista laskimonsisäisellä infuusiolla

0,5-0,75 mg/kg, (tai 35-53 mg/70-kiloinen ihminen), 30-120 minuutin aikana. Collenin et al. kuvaama koostumus oli 10 ml:n ampulleissa, jokaisen sisältäessä 0,5 mg/ml tPA:ta. Sobel et al., *Circulation*, volyymi 69, s. 983 (1984), esittää $200-400 \times 10^3$ kansainvälisen yksikön (IU) tPA:ta infuusion MI:stä kärsivälle potilaalle. Van de Werf et al., *N. Engl. J. Med.*, volyymi 310, s. 609 (1984), kuvaa laskimonsisäisen (i.v.) ja sepelvaltimon sisälisen (i.c.) tPA-annosten, jotka vaihtelevat välillä noin 3×10^5 IU/15 min i.c. ja $1,4 \times 10^6$ IU/35 min i.v. annostelua MI-potilaille. Robinson, WO84-01786, kuvaa keskikokoisen veritukkeutuman hoitoa annostelemalla 0,10-1,0 mg/kg modifioitua tPA:ta, josta puuttuu ainakin osittain natiivin molekyylin hiilihydraattiosa, infuusiota käyttäen aina 8 annokseen asti.

Potilaille, jotka kärsivät akuutista MI:stä, farmaseuttinen annosyksikkö on tyypillisesti pillerin tai injektion muodossa, so. pussi, ampulli, lääkepullo tai ruisku, joka sisältää 10 ml:aan tPA:ta pitoisuutena 1-15 mg/ml välittömään annosteluun. Tällaista pillerityyppistä annostusta voi seurata laskimonsisäinen infuusiomuoto, joka sisältää 0,1-15 mg/ml tPA:ta. Muita indikaatioita varten, esimerkiksi sellaisia, jotka kehittävät MI:n, syvälläolevan suonitukoksen (DVT) tai keuhkoveritulpan (PE), farmaseuttinen annosyksikkö on tyypillisesti sellaisessa laskimonsisäisessä infuusiomuodossa, esimerkiksi i.v. -pussi tai pullo, joka voidaan helposti yhdistää laskimonsisäiseen kanyyliin.

Täten edullisin farmaseuttinen annosyksikkö on pillerimuoto, joka voidaan varastoida lääkepulloon, pussiin, ampulliin tai ruiskuun välitöntä käyttöä varten hätätilassa. Tällainen annosyksikkö sisältää edullisesti noin 1-10 ml, edullisemmin 2-6 ml, 1-10 mg/ml, edullisemmin 2-6 mg/ml tPA:ta. Tällainen pillerimuotoinen annosyksikkö muodostetaan

sisältämään 2-50 mg, edullisemmin 5-30 mg ja edullisimmin 10-20 mg tPA:ta annosteltavaksi yhtenä ruiskeena. Toinen edullinen farmaseuttinen annosyksikkö on laskimonsisäinen infuusiomuoto, joka voidaan varastoida suureen (100-1000 ml) säiliöön. Tällainen yksikkö sisältää edullisesti noin 0,1-10 mg/ml, edullisemmin 0,5-5 mg/ml tPA:ta, siten, että 10-500 mg, edullisemmin 50-200 mg tPA:ta voidaan sisällyttää yhteen infuusiosäiliöön. Kolmas edullinen keksinnön mukainen suoritusmuoto yhdistää molemmat piirteet, esimerkiksi lääkepulloon, ruiskuun tai muuhun pillerityyppiseen säiliöön, joka on yhdistetty lähtöaineena infuusiomuotoon.

Lyofilisoitu tPA voi sisältää farmaseuttisesti hyväksyttävän puskurin lyofilisoidussa muodossa lopullista rekonstruoimista varten puskuroidomassa liuoksessa, tai kun lyofilisointiväliaine on ammoniumasettaatti, lyofilisoitu tuote voidaan rekonstruoida puskuroidussa liuoksessa. Joka tapauksessa lyofilisoitu tuote voidaan varastoida steriiliin ampulliin tai muuhun säiliöön, steriiliin liuos-säiliöön vapauttamiseksi rekonstruointia varten ja lopullista tai välitöntä laskimonsisäistä annostelua varten injektoimalla tai infuusion avulla. Täten keksinnön neljäs edullinen suoritusmuoto on määritysvälinesarja, joka käsittää yhden tai useamman steriilin säiliön tPA:ta lyofilisoidussa muodossa ja yhden tai useamman erillisen steriilin liuos-säiliön rekonstruointia varten. Liuos rekonstruointia varten, tPA:n määrä ja liuoksen määrä rekonstruointia varten yhdessä määritysvälinesarjassa valitaan siten, että saadaan aikaan lopullinen rekonstruoitu tuote, jolla on 0,1-15 mg/ml pH:ssa, joka on valittu tämän keksinnön mukaisesti. Edullinen liuos rekonstruointia varten on 5 %:nen dekstroosiliuos vedessä. tPA:n rekonstruointiliuoksen määrä valitaan edullisesti siten, että saadaan lopullinen rekonstruoitu tuote tai annosyksikkö, joka on samanlainen kuin edullinen injektoitava tai infusoitava liuosmuoto, joka yllä on kuvattu. Täten määritysvälinesarja

edullisen pillerimuodon valmistamiseksi käsittää, yhdessä tai useammassa steriilissä säiliössä 2-50 mg, edullisesti 5-30 mg tPA:ta ja yhdessä tai useammassa toisessa säiliössä 1-10 ml, edullisesti 2-6 ml rekonstruointiliuosta siten, että yhdistettäessä kahden säiliön sisältö, aikaansaatu tuote sisältää tPA:ta pitoisuudessa 1-10 mg/ml, edullisesti 2-6 mg/ml. Määritysvälinesarja edullisen infuusio-
muodon valmistamiseksi käsittää, yhdessä tai useammassa steriilissä säiliössä 10-500 mg, edullisesti 50-200 tPA:ta ja yhdessä tai useammassa toisessa steriilissä säiliössä 100-1000 ml rekonstruointiliuosta siten, että yhdistettäessä säiliöiden sisällöt, saadaan aikaan tuote, joka sisältää tPA:ta pitoisuutena 0,1-10 mg/ml, edullisesti 0,5-5 mg/ml. Edullisesti, kaikki tPA yhtä annosyksikköä varten sisältyy yhteen säiliöön ja kaikki liuos tällaisen annosyksikön rekonstruointia varten sisältyy toiseen yksittäiseen säiliöön. Määritysvälinesarja keksinnönmukaisen farmaseuttisen annosyksikön valmistamista varten voi käsittää steriilin moniosaisen säiliön, esim. kaksiosaisen säiliön, jonka toisessa osassa on lyofilisoitua tPA:ta ja toisessa osassa rekonstruointiliuosta, kahden osan ollessa erotetut rikkotavalla väliseinällä siten, että säiliöiden sisällöt voidaan aseptisesti sekoittaa rikkomalla väliseinä. Tällaisista määritysvälinesarjoista ovat esimerkkejä: Univial sterile kaksiosainen lääkepullo (Abbot Laboratories, North Chicago, Illinois) ja Hypak Liqui/Dry -ruisku (Becton Dickinson, Rutherford, New Jersey). Mukaan voidaan liittää etiketti tai sisäiset ohjeet, jotka osoittavat tPA:n ja rekonstruointiliuoksen määrät sekä annosteluohjeet.

Esimerkit

Seuraavat esimerkit 1-9 kuvaavat esimerkinomaisesti keksinnönmukaisia farmaseuttisia annosyksiköitä.

Esimerkki 1

Steriili ruisku täytetään steriilillä liuoksella, joka sisältää:

tPA	5 mg
100 mM etikkahappo/ammoniumasettaatti	5 ml
NaCl	0,5 % (säätämään isotoonisuuteen)
pH	4,0

Esimerkki 2

Steriili ruisku täytetään steriilillä liuoksella, joka sisältää:

tPA	50 mg
60 mM etikkahappo/natriumasettaatti	5 ml
dekstroosi	3 % (säätämään isotoonisuuteen)
klooributanoli	0,5 %
pH	3,5

Esimerkki 3

Steriili ruisku täytetään steriilillä liuoksella, joka sisältää:

tPA	5 mg
100 mM sitruunahappo/natrium-sitraatti	10 ml
NaCl	0,13 % (säätämään isotoonisuuteen)
metyyliparabeeni	0,1 %
pH	5,5

Esimerkki 4

Steriili ruisku täytetään steriilillä liuoksella, joka sisältää:

tPA	5 mg
100 mM sitruunahappo/natrium-sitraatti	10 ml
mannitoli	0,8 % (säätämään isotoonisuuteen)
metyyliparabeeni	0,1 %
pH	5,5

Esimerkki 5

Steriili säiliö, jota voidaan käyttää laskimonsisäiseen infuusioon, täytetään steriilillä liuoksella, joka sisältää:

tpA	100 mg
50 mM glutaamihappo/natriumglutamaatti	1000 ml
NaCl	0,7 % (säätämään isotoonisuuteen)
pH	4,5

Esimerkki 6

Steriili säiliö, jota voidaan käyttää laskimonsisäisessä infuusiossa, täytetään steriilillä liuoksella, joka sisältää:

tpA	500 mg
50 mM adipiinihappo/natriumadipaatti	500 ml
timerosaali	0,005 %
NaCl	0,7 % (säätämään isotoonisuuteen)
pH	4,0

Esimerkki 7

Steriilisäiliö, jota voidaan käyttää laskimonsisäisessä infuusiossa, täytetään steriilillä liuoksella, joka sisältää:

tpA	1000 mg
100 mM etikkahappo/ammoniumasettaatti	100 ml
dekstroosi	3 % (säätämään isotoonisuuteen)
pH	4,0

Esimerkki 8

Pakataan määritysvälinesarja, joka käsittää (1) steriilin lääkepullon, joka sisältää 10 mg tPA:ta, joka on lyofilisoitu vehikkeliksi, joka sisältää tPA:ta (10 mg/ml) 100 mM ammoniumasetaatissa (pH 4) ja 30 % mannitolia ja (2) steriilin lääkeainepullon, joka sisältää rekonstruointiliuoksen, joka on 100 mM ammoniumasettaatti, 10 ml, pH 4,0.

Esimerkki 9

Pakataan määritysvälinesarja, joka käsittää (1) steriilin lääkepullon, joka sisältää 1000 mg tPA:ta, joka on lyofilisoitu vehikkeliksi sisältäen tPA:ta (15 mg/ml) 100 mM ammoniumasetaatissa (pH 4) ja 19 %:sta glysiiniä ja (2) steriilin pullon, joka sisältää rekonstruointiliuoksen, joka on 100 mM ammoniumasetattia, 1000 ml, pH 4,0.

Esimerkki 10

Yksi ml liuosta, joka sisälsi 10 mg/ml tPA:ta 0,1 M ammoniumasetaatissa, lisättiin 20 ml:n lyofilisointilääkepullostaan kahteen, kumpikin 4 ml, täyteaineliuokseen koostumuksien A ja B valmistamiseksi, seuraavasti.

	A	B
	<u>(mg/lääkepullo)</u>	<u>(mg/lääkepullo)</u>
PVP (Plasdone C-30)	64	64
mononatrium L-glutamaatti	16	-
adipiinihappo	6,4	6,4
tPA	10	10
pH (koko liuos)	4,3	4,2*

*pH säädettiin natriumhydroksidilla

Koostumukset lyofilisoitiin seuraavasti. Lääkepulloja jäädytettiin yli yön -50°C :een hyllyllä. Kuivaussyklit olivat: (1) -25°C , 100 $\mu\text{m Hg}$ (13 MPa), 84 tuntia; (2) 0°C , 100 $\mu\text{m Hg}$ (13 MPa), 8 tuntia; ja (3) 25°C , 10-30 $\mu\text{m Hg}$ (1,3-3,9), 24 tuntia.

tPA:n kontrolliliuosta (1,0 mg/ml 0,1 M ammoniumasetaatissa) varastoitiin 5°C :ssa. Ensimmäistä koenäytettä (1) säilytettiin lyofilisoidussa muodossa 23 päivää -15°C :ssa ja sitten rekonstruoitiin ja analysoitiin S-2251 -analyysillä 24 tunnin jälkeen 5°C :ssa, 25°C :ssa ja 40°C :ssa. Lyofilisoidun näytteen varastointi -15°C :ssa ja liuoksen rekonstruointi 5°C :ssa kuvaavat päivän 0

olosuhteita, so. rekonstruointi ja analyysi välittömästi lyofilisoinnin jälkeen. Toinen koenäyte (2) varastoitiin lyofilisoidussa muodossa 23 päivän ajan 40 °C:ssa ja sitten rekonstruointiin ja analysoitiin S-2251 -analyysillä 24 tunnin jälkeen 4 °C:ssa ja 25 °C:ssa. Kolmatta koenäytettä (3) säilytettiin lyofilisoidussa muodossa 3 kuukautta 40 °C:ssa ja sitten rekonstruointiin ja analysoitiin S-2251 -analyysillä rekonstruoinnin yhteydessä ja 24 tunnin jälkeen 4 °C:ssa ja 25 °C:ssa. Kaikki koenäytteet rekonstruointiin 1,0 mg/ml:ksi 5 %:lla dekstroosilla. 23:n päivän (40 °C) rekonstituoitujen koostumusten pH:t olivat A: pH 4,5 ja B: pH 4,3. Näiden koostumusten osmolaliteetti oli A: 298 mOsm ja B: 274 mOsm. Näytteiden aktiivisuus prosentteina kontrollista on esitetty seuraavassa taulukossa.

	Näyte I			Näyte II		Näyte III		
	24 tuntia			24 tuntia		0 tuntia	24 tuntia	
	5 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	-	4 °C	25 °C
A	93	99	90	96	91	91	91	90
B	99	90	93	90	95	91	93	91
Kontrolli	100 ¹			100 ¹		100 ²	100 ³	

¹ $6,87 \times 10^5$ IU/mg

² $6,08 \times 10^5$ IU/mg

³ $5,67 \times 10^5$ IU/mg

Esimerkki 11

Yhtä suuret määrät kahta tPA-koostumusta, A ja B, valmistettu oleellisesti yllä kuvatulla tavalla, asetettiin 5 ml:n lääkepulloihin siten, että kumpikin lääkepullo sisälsi:

	A	B
PVP (Plasdone C-30)	6,4 mg	6,4 mg
L-asparagiinihappomonatrium	1,5 mg	-
adipiinihappo	0,7 mg	0,2 mg
tPA	1,0 mg	1,0 mg
pH (koko liuos)	4,4 mg	4,1*
lääkepullon kokonaistilavuus	0,5 mg	0,5 ml

*pH säädettiin natriumhydroksidilla

Lääkepullot lyofilisoitiin oleellisesti yllä kuvatulla tavalla. Yhtä sarjaa säilytettiin -15°C :ssa 7 päivän ajan lyofilisoinnin jälkeen kuvaamaan päivän 0 olosuhteita, so. rekonstruointia ja analyysiä välittömästi lyofilisoinnin jälkeen, ja analysoitiin rekonstruoinnin yhteydessä ja 24 tuntia rekonstruoinnin jälkeen huoneen lämpötilassa ($20-25^{\circ}\text{C}$) (päivä 0). Muita lääkepullosarjoja säilytettiin 40°C :ssa ja sitten ne rekonstruointiin ja analysoitiin samalla tavoin 7 päivää lyofilisoinnin jälkeen (päivä 7), kolme viikkoa lyofilisoinnin jälkeen (viikko 3), ja 1 kuukausi lyofilisoinnin jälkeen (kuukausi 1). Kaikki lyofilisoidut näytteet rekonstruointiin vedellä pH-arvoon noin 4,2-4,6. Aktiivisuutta jokaisessa pisteessä verrattiin kontrollikoostumuksen aktiivisuuteen, joka sisälsi 1 mg/ml tPA:ta 0,1 M ammoniumasetaattipuskurissa, pH 4,0, säilytetty 5°C :ssa. Tulokset on esitetty alla prosentteina kontrollista.

	<u>Päivä 0</u>		<u>Päivä 7</u>		<u>Viikko 3</u>		<u>Kuukausi 1</u>	
	0 t	24 t	0 t	24 t	0 t	24 t	0 t	24 t
A	107	93	100	97	98	97	91	97
B	104	97	107	92	103	100	92	94

Esimerkki 12

Oleellisesti yllä esimerkeissä 10 ja 11 kuvatulla tavalla valmistettiin 10 ml:n lääkepulloja, jotka sisälsivät:

gelatiinia	5 mg
mononatrium-L-glutamaattia	5 mg
mannitolia	15 mg
natriumkloridia	1,7 mg
tPA:ta	0,1 mg
lääkepullon kokonaistilavuus	1,2 ml

Lääkepullot lyofilisoitiin ja rekonstruoitiin 1,0 ml:lla 0,1 M ammoniumasetaattia (pH 4), ja analysoitiin päivänä 0 (simuloitu). Lääkepulloja säilytettiin 40 °C:ssa, analysoitiin päivänä 10, päivänä 16 ja kuukautena 1. Aktiivisuutta verrattiin kontrollikoostumuksen aktiivisuuteen (0,1 mg/ml tPA:ta 0,1 M ammoniumasetaattipuskurissa, pH 4, 5 °C) ja tulokset on kuvattu alla prosentteina kontrollin aktiivisuudesta.

<u>Päivä 0</u>		<u>Päivä 10</u>		<u>Päivä 16</u>		<u>Kuukausi 1</u>	
<u>0 t</u>	<u>24 t</u>	<u>0 t</u>	<u>24 t</u>	<u>0 t</u>	<u>24 t</u>	<u>0 t</u>	<u>24 t</u>
89	82	105	83	91	83	99	78

Esimerkki 13

Oleellisesti esimerkeissä 10 ja 11 kuvatulla tavalla valmistettiin 5 ml:n lääkepulloja, jotka sisälsivät:

PVP (Plasdone C-30)	6,4 mg
mononatrium-L-glutamaatti	1,6 mg
adipiinihappo	0,4 mg
tPA	1,0 mg
pH (koko liuos)	4,4
lääkepullon kokonaistilavuus	0,5 ml

Lääkepullot lyofilisoitiin ja sitten rekonstruoitiin 1,0 ml:lla 0,1 M ammoniumasetaatti (pH 4) ja analysoitiin päivänä 0 (simuloitu). 40 °C:ssa säilytetyt lääkepullot

analysoitiin päivänä 8 ja kuukautena 1. Aktiivisuutta verrattiin kontrollikoostumuksen aktiivisuuteen (1 mg/ml tPA:ta, 0,1 M ammoniumasetatipuskurissa, pH 4,0, 5 °C) ja tulokset ilmoitetaan alla prosentteina kontrollin aktiivisuudesta.

<u>Päivä 0</u>		<u>Päivä 8</u>		<u>Kuukausi 1</u>	
<u>0 t</u>	<u>24 t</u>	<u>0 t</u>	<u>24 t</u>	<u>0 t</u>	<u>24 t</u>
106	112	101	109	100	100

Esimerkit 10, 11, 12 ja 13, yllä, osoittavat parantunutta stabiilisuutta lyofilisoinnin aikana ja rekonstruoitaessa tPA-koostumusta, joka sisältää polymeeristä kylmäsuojaavaa ainetta, erityisesti, polyvinyyli pyrrolidonia ja gelatiinia.

Yllä oleva selitys ja esimerkit kuvaavat täydellisesti keksintöä ja sen edullisia suoritusmuotoja. Kuitenkaan, keksintö ei ole rajoitettu erityisiin tässä esitettyihin rakenteisiin, vaan käsittää kaikki muunnelmat, jotka sisältyvät seuraavien patenttivaatimuksien piiriin.

Patenttivaatimukset

1. Steriili, farmaseuttinen tPA:n annosyksikkö parenteraalista annostelua varten, t u n n e t t u siitä, että se käsittää 0,1 - 15 mg/ml tPA:ta farmaseuttisesti hyväksyttävässä, puskuroidussa vesiliuoksessa pH-arvossa 3,5 - 5,5.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttinen annosyksikkö, t u n n e t t u siitä, että se on pillerimuodossa säiliössä, sisältäen 1-10 ml tPA:ta pitoisuutena 1-10 mg/ml ja määrässä 2-50 mg.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttinen annosyksikkö, t u n n e t t u siitä, että se on pillerimuotoinen säiliössä sisältäen 1-6 ml tPA:ta pitoisuutena 2-6 mg/ml ja määrässä 5-30 mg.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttinen annosyksikkö, t u n n e t t u siitä, että se on infuusiomuodossa säiliössä sisältäen 100-1000 ml tPA:ta pitoisuutena 0,1-10 mg/ml tPA:ta ja määrässä 10-500 mg.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttinen annosyksikkö, t u n n e t t u siitä, että se on infuusiomuodossa säiliössä sisältäen 100-1000 ml tPA:ta pitoisuutena 0,5-5 mg/ml ja määrässä 50-200 mg.
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttinen annosyksikkö, t u n n e t t u siitä, että se edelleen sisältää kylmäsuojaavan aineen määrässä, joka on turvallinen ja tehokas tPA:n stabiloinnissa.
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen farmaseuttinen annosyksikkö, t u n n e t t u siitä, että kylmäsuojaava aine on gelatiini tai polyvinylipyrrolidoni.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen farmaseuttinen annosyksikkö, t u n n e t t u siitä, että kylmäsuojaava aine on polyvinyylipyrrolidoni, molekyylipaino 40 000, määrässä 1-15 mg/ml tPA:ta.

9. Patenttivaatimuksen 1, 2, 4, 6, 7 tai 8 mukainen farmaseuttinen annosyksikkö, t u n n e t t u siitä, että sen pH-arvo on 4,0-5,0.

10. Patenttivaatimuksen 1, 2, 4, 6, 7 tai 8 mukainen farmaseuttinen annosyksikkö, t u n n e t t u siitä, että se on puskuroitu pH-arvoon 4,0-5,0 farmaseuttisesti hyväksyttävällä etikkahapon, adipiinihapon, meripihkahapon, sitruunahapon, maitohapon, viinihapon, asparagiinihapon tai glutamiinihapon suolalla.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen farmaseuttinen annosyksikkö, t u n n e t t u siitä, että suolan kationina on natrium tai ammonium.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen farmaseuttinen annosyksikkö, t u n n e t t u siitä, että se on puskuroitu natriumasetaatilla tai ammoniumasetaatilla.

13. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 4 mukainen farmaseuttinen annosyksikkö, t u n n e t t u siitä, että se sisältää 4-10 mg polyvinyylipyrrolidonia, molekyylipaino 40 000, per mg tPA:ta ja että liuos on puskuroitu pH-arvoon 4,4-4,8 adipiinihapolla.

14. Määritysvälinesarja, t u n n e t t u siitä, että se käsittää yhden tai useamman steriilin säiliön tPA:ta lyofilisoidussa muodossa ja yhden tai useamman steriilin säiliön rekonstruointiliuosta, puskurin ollessa mukana yhdessä tai useammassa säiliössä ja että puskurin, rekonstruointiliuos ja tPA:n ja rekonstruointiliuoksen määrä on valittu siten, että yhdistettäessä säiliöiden sisällöt

saadaan aikaan rekonstruoitu tuote, joka on farmaseuttinen annosyksikkö parenteraalista annostelua varten, sisältäen 0,1-15 mg/ml tPA:ta puskuroidussa farmaseuttisesti hyväksyttävässä liuottimessa pH-arvossa 3,5-5,5.

15. Patenttivaatimuksen 11 mukainen määrittämissä, tunnettu siitä, että se käsittää yhdessä tai useammassa steriilissä säiliössä 2-50 tPA:ta ja yhdessä tai useammassa säiliössä 1-10 ml rekonstruoitiliuosta.

16. Patenttivaatimuksen 11 mukainen määrittämissä, tunnettu siitä, että se käsittää yhdessä tai useammassa säiliössä 5-30 mg tPA:ta ja yhdessä tai useammassa toisessa steriilissä säiliössä 2-10 ml rekonstruoitiliuosta.

17. Patenttivaatimuksen 11 mukainen määrittämissä, tunnettu siitä, että se käsittää yhdessä tai useammassa steriilissä säiliössä 10-500 mg tPA:ta ja yhdessä tai useammassa toisessa steriilissä säiliössä 100-1000 ml rekonstruoitiliuosta.

18. Patenttivaatimuksen 11 mukainen määrittämissä, tunnettu siitä, että se käsittää yhdessä tai useammassa steriilissä säiliössä 50-200 mg tPA:ta ja yhdessä tai useammassa toisessa steriilissä säiliössä 100-1000 ml rekonstruoitiliuosta.

19. Patenttivaatimuksen 14 mukainen määrittämissä, tunnettu siitä, että se käsittää kylmäsuojaavan aineen yhdessä tai useammassa tPA-säiliössä tai yhdessä tai useammassa rekonstruoitiliuossäiliössä tai molemmissa siten, että rekonstruoitu tuote sisältää sellaisen määrän kylmäsuojaavaa ainetta, joka on turvallinen ja tehokas tPA:n stabiloinnissa.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen määrittäjä, t u n n e t t u siitä, että kylmäsuojaaava aine on gelaatiini tai polyvinyyli pyrrolidoni.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen määrittäjä, t u n n e t t u siitä, että kylmäsuojaaava aine on polyvinyyli pyrrolidoni, molekyylipaino 40 000, määrässä 1-15 mg per mg tPA:ta.

22. Patenttivaatimuksen 14, 15, 17, 19, 20 tai 21 mukainen määrittäjä, t u n n e t t u siitä, että rekonstruoidun tuotteen pH-arvo on 4,0-5,0.

23. Patenttivaatimuksen 14, 15, 17, 19, 20 tai 21 mukainen määrittäjä, t u n n e t t u siitä, että puskuri on farmaseuttisesti hyväksyttävä etikkahapon, adipiinihapon, meripihkahapon, sitruunahapon, maitohapon, viinihapon, asparagiinihapon tai glutamiinihapon suola rekonstruoidun tuotteen puskuroimiseksi pH-arvoon 4,0-5,0.

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen määrittäjä, t u n n e t t u siitä, että puskurin kationi on natrium tai ammonium.

25. Patenttivaatimuksen 23 mukainen määrittäjä, t u n n e t t u siitä, että puskuri on natriumasettaatti tai ammoniumasettaatti.

26. Patenttivaatimuksen 14, 15 tai 17 mukainen määrittäjä, t u n n e t t u siitä, että yksi tai useampi säiliö tPA:ta sisältää 4-10 mg polyvinyyli pyrrolidonia, molekyylipaino 40 000, per mg tPA:ta ja adipiinihappoa siten, että rekonstruoitaessa rekonstruoidun tuotteen pH on 4,4-4,8.

27. Menetelmä trombolyyttistä terapiaa tarvitsevan potilaan hoitamiseksi, t u n n e t t u siitä, että annostellaan

parenteraalisesti potilaalle minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-13 mukaista farmaseuttista annosyksikköä.

28. Menetelmä steriilin, farmaseuttisen tPA:n annosyksikön valmistamiseksi parenteraalista annostelua varten, t u n n e t t u siitä, että liuotetaan tPA farmaseuttisesti hyväksyttävään vesiliuokseen pH:ssa 3,5-5,5, pitoisuuteen 0,1-15 mg tPA:ta per ml liuosta.

29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tPA-liuokseen lisätään kylmäsuojavaa ainetta.

30. Patenttivaatimuksen 29 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lyofilisoidaan koko vesipitoinen koostumus, joka sisältää 0,1-15 mg/ml tPA:ta, puskuroidaan pH-arvoon 3,5-5,5 orgaanisella hapolla ja sen suolalla, ja sisällytetään kylmäsuojaava aine ja sitten rekonstruoidaan lyofilisoitu koostumus vesipitoisella liuottimella, joka hyväksytään parenteraaliseen annosteluun, jolloin koostumuksen pH jää alueelle 3,5-5,5.

31. Patenttivaatimuksen 28, 29 tai 30 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että annosyksikkö puskuroidaan pH-arvoon 4,0-5,0 yhdellä tai useammalla seuraavista: adipiinihappo, glutamiinihappo, sitruunahappo, etikkahappo, meripihkahappo, maitohappo, viinihappo ja asparagiinihappo ja niiden suola, ja että kylmäsuojaava aine on polyvinyyli-pyrrolidoni tai gelatiini.

32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että annosyksikkö puskuroidaan adipiinihapolla, meripihkahapolla tai etikkahapolla ja niiden suoloilla.

33. tPA:n farmaseuttinen annosyksikkö, t u n n e t t u siitä, että se valmistetaan parenteraalista annostelua varten minkä tahansa vaatimuksen 28, 29, 30, 31 tai 32 mukaisella menetelmällä.

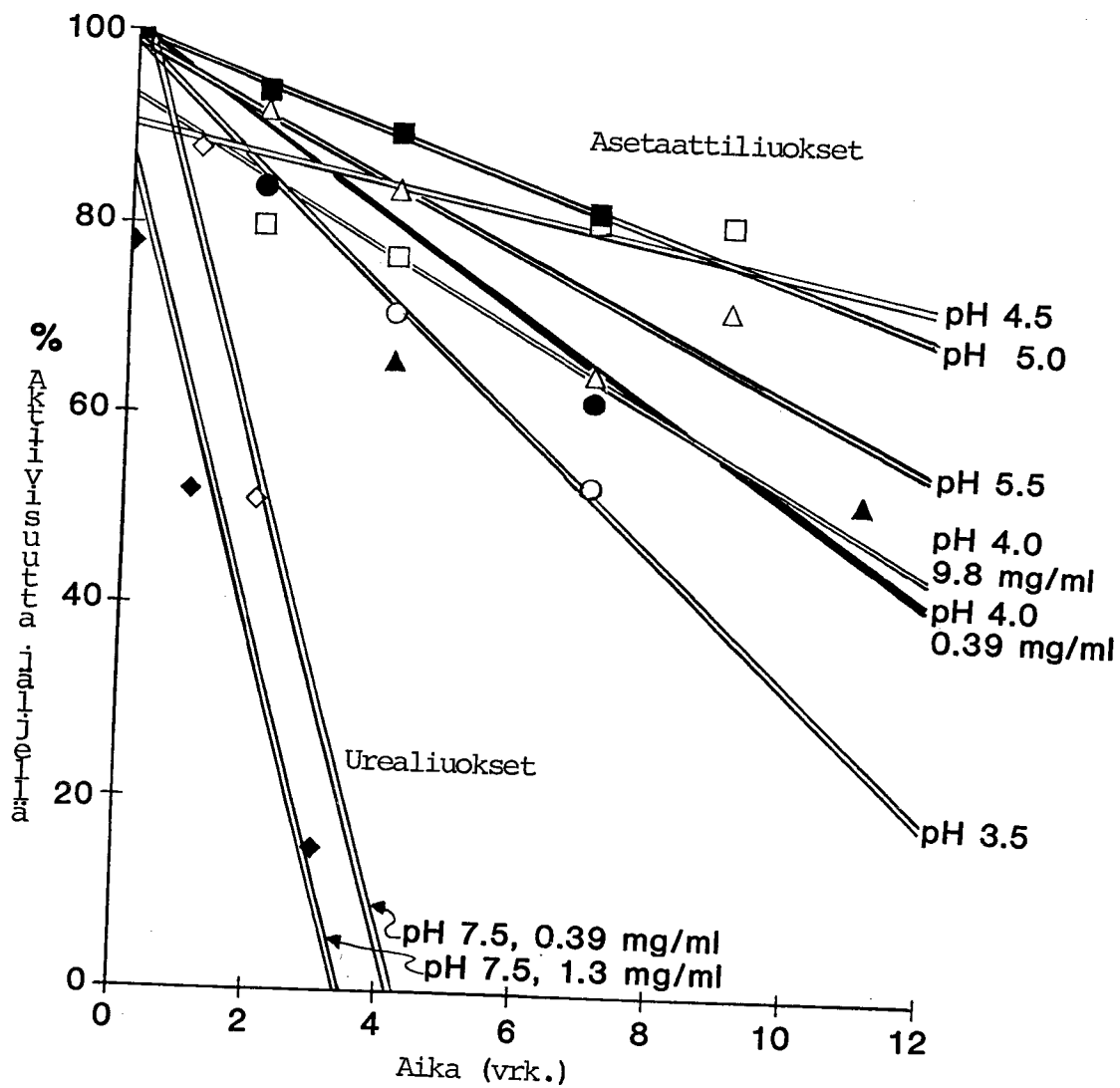
34. Lyofilisaatti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää tPA:ta ja farmaseuttisesti hyväksyttävää puskuria lyofilisoidussa muodossa.

35. Lyofilisaatti, t u n n e t t u siitä, että se sisältää tPA:ta ja farmaseuttisesti hyväksyttävää puskuria lyofilisoidussa muodossa, joka rekonstruoitaessa antaa farmaseuttisesti hyväksyttävän, minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-12 mukaisen annosyksikön.

36. Patenttivaatimuksen 35 mukainen lyofilisaatti, t u n n e t t u siitä, että se rekonstruoitaessa vedellä neutraalissa pH:ssa antaa farmaseuttisesti hyväksyttävän, minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-12 mukaisen annosyksikön.

37. Patenttivaatimuksen 36 mukainen lyofilisaatti, t u n n e t t u siitä, että puskuuri on adipiinihappo tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

Alkuhajoamisnopeus



- | | |
|---------------------|----------------------|
| ■ pH 5.0 | ● pH 4.0, 0.39 mg/ml |
| □ pH 4.5 | ○ pH 3.5 |
| △ pH 5.5 | ◇ pH 7.5, 0.39 mg/ml |
| ▲ pH 4.0, 9.8 mg/ml | ◆ pH 7.5, 1.3 mg/ml |