



(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(21) A bejelentés ügyszáma: P 95 03171  
(22) A bejelentés napja: 1994. 03. 24.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
93/01581 1993. 05. 07. SE  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/SE 94/00265  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/26286

(40) A közzététel napja: 1996. 09. 30.  
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1998. 11. 30.

(11) Lajstromszám:

**215 263 B**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

**A 61 K 35/16**  
A 61 K 38/37

(72) Feltalálók:

Fatouros, Angelica, Stockholm (SE)  
Österberg, Thomas, Stockholm (SE)

(73) Szabadalmas:

Pharmacia AB, Stockholm (SE)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,  
Budapest

(54)

### **VIII faktor csökkentett oxigéntartalmú vizes oldata**

#### **KIVONAT**

A találmány egy stabil, kész gyógyszerkészítményre vonatkozik, amely a felhasználásra kész végső tartályában 10–100 000 IU/ml aktivitásnak megfelelő mennyiségű koagulációs VIII faktort tartalmaz vizes oldatban csökkentett oxigénkoncentráció mellett, és ily módon a

VIII faktor aktivitása hosszabb tárolás alatt is lényegében megmarad.

A találmány vonatkozik továbbá a megnövekedett stabilitású VIII koagulációs faktort tartalmazó vizes oldatok előállítási eljárásra is.

A találmány egy stabil, kész gyógyszertermékre vonatkozik, amely vizes oldatban csökkentett oxigénkoncentráció mellett VIII koagulációs faktort tartalmaz. A találmány szerinti termékben a VIII faktor aktivitása meglepetésszerűen nagy mértékben megtartható tárolás során. A VIII faktor-aktivitás hosszú időn át megtartható, ha a kész gyógyszertermék még továbbá inert gázt és/vagy egy antixodiánt is tartalmaz. A találmány vonatkozik továbbá a vizes oldat oxigénkoncentrációjának csökkentésére, valamint vonatkozik a VIII faktor stabilitásának fokozására vizes oldatban oly módon, hogy a tárolás inert gázatmoszférában történik. A találmány szerinti megoldással lehetővé válik a VIII faktor eredeti aktivitásának legalább 50%-át megtartani legalább 6 hónapos tárolási időn át 2–10 °C hőmérsékleten, pH=6,5–8,5 közötti értéken.

A proteinek stabilitása általában probléma a gyógyszeripar területén. Ezt gyakran úgy oldják meg, hogy a proteint különböző szárítási eljárásokkal, például fagyasztva szárítással megszárítják. A proteint ezután ilyen szárított formában forgalmazzák és tárolják. A szárítás vagy fagyasztva szárítás előtt oldatnak, a szárított anyagnak, valamint az ismételt oldott terméknek stabilnak kell lenni, hogy az aktivitás csökkenését elkerülhessük mind a szárítási eljárás, mind a tárolás vagy a forgalmazás ideje alatt.

A fagyasztva szárítási eljárás egy költséges és időigényes eljárási lépés, és igen nagy előny lenne, ha ez a lépés elkerülhető lenne a kereskedelmi termékek előállításánál. Továbbá a szárított proteint a betegnek szükségyszerűen a felhasználás előtt ismételtelen oldani kell, ami körülményes lehet a beteg számára.

A haemophilia veleszületett betegség, és századok óta ismert, de csak az utolsó 30 esztendőben sikerült a három különböző formáját megkülönböztetni, ezek a haemophilia A, haemophilia B és haemophilia C. A leggyakoribb a haemophilia A előfordulása. Ez csak hím egyedeket támad meg, és az előfordulási gyakoriság 10 000 élve született férfi esetén kettő. A betegséget a biológiailag aktív koagulációs VIII faktor (antihaemophiliás faktor) hiánya vagy erősen csökkentett szintje okozza, mely protein normál esetben a plazmában van jelen. A haemophilia A klinikai megjelenési formája egy erős vérzési tendencia, és mielőtt a VIII faktor-koncentrátumokkal való kezelést bevezették, a betegek átlagos életkora kevesebb mint 20 év volt. A VIII faktor-koncentrátumokat plazmából nyerik körülbelül 30 éve. Ez jelentős mértékben javította a haemophiliás betegek körülményeit, és lehetőséget biztosított számukra a normál életvitelre.

A terápiás célú VIII faktor-koncentrátumokat mostanáig plazmafrakcionálással állították elő. Azonban ismertek most már módszerek a VIII faktor előállítására sejtkultúrában is, rekombináns DNS-eljárás alkalmazásával (J. Gitschier és munkatársai, Nature 312, 330–37, 1984 és az EP-A-160457 számú szabadalmi leírás).

A humán plazmából származó VIII faktor-koncentrátumok több teljesen aktív VIII faktor-fragmentumot tartalmaznak (Andersson és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2979–83, 1986. május). A legki-

sebb aktív forma molekulatömege 170 kDa, és ez egy 90 kDa és egy 80 kDa molekulatömegű láncot tartalmaz, amelyet egy fémion híd köt össze (EP-A 197901 számú szabadalmi leírás).

A Kabi Pharmacia kifejlesztett egy rekombináns VIII faktor terméket, amely megfelel a 170 kDa VIII plazma faktornak terápiás VIII faktor-koncentrátum formájában. A csonkított rekombináns VIII faktor molekulát r-VIII SQ-ként jelölik, és ezt kínaihörcsög-petesejtekből (CHO) állítják elő sejtkultúrában, szérumentes közegben, passzálassal.

Az r-VIII SQ specifikus aktivitása körülbelül 15 000 IU VIII:C 1 mg proteinben.

A rekombináns VIII SQ faktort klasszikus haemophilia kezelésére alkalmazzák. Az adagolás dózisa hasonló a plazma VIII faktor-koncentrátumok dózisához.

A rekombináns VIII faktor termékek szerkezetét és biokémiáját általánosságban a következő irodalmi helyen ismertetik: (Kaufman, Tibtech, 9, 1991 és Hematology 63, 155–65, 1991). Az r-VIII SQ szerkezetét és biokémiáját a WO-A-91/09122 számú közzétételi irat ismerteti.

A VIII faktort, amelyet plazmából frakcionálással állítanak elő, általában fagyasztva szárított por formájában hozzák forgalomba, és azt vízben a felhasználáskor oldani kell.

A kis mennyiségű proteint tartalmazó készítmények általában elvesztik aktivitásukat a tisztítás, steril gyártás, csomagolás és adagolás során. Ezt a problémát általában humán albumin adagolásával oldják meg, amely jelentősen csökkenti a proteinaktivitás veszteségét. A humán albumin mint egy általános stabilizálóanyag funkcionál a tisztítás, a steril gyártás és a fagyasztva szárítás során (Wang és munkatársai, J. of Parenteral Sci. and Tech. 42, No. 2S, 1988). Az albumin alkalmazása a VIII faktor stabilizálására ismert, és jelenleg is alkalmazzák minden, a kereskedelembe kapható nagy tisztaságú termék esetén.

Azonban szükséges lenne a humán albumin adagolásának elkerülése a gyógyhatású, rekombináns DNS-technológiával előállított proteinek esetén. Továbbá a humán albumin mint kiszerezési adalék gyakran korlátozza a leghatásosabb és érzékenyebb analitikai módszerek alkalmazását a proteinek jellemzéséhez.

A különböző proteinek stabilizálására különböző megoldásokat javasoltak. Így például az EP 35204 számú szabadalmi leírásban ismertetett eljárás szerint a proteinek termikus stabilitását poliol adagolásával fokozzák, továbbá a WO-A 89/09614 számú közzétételi iratban egy stabilizált humán növekedéshormon-készítményt ismertetnek, amely glicint, mannitolt és egy puffert, valamint egy előnyös kiviteli formánál nemionos felületaktív anyagot, így például poliszorbát 80-at tartalmaz. A nemionos felületaktív anyagot az aggregáció és a denaturálás csökkentése érdekében adagolják. A készítmény megnövekedett stabilitású fagyasztva szárított formában, valamint annak oldása után is. Az US A 4 783 441 számú szabadalmi leírásban egy proteint, így például inzulint vagy felületaktív anyagot tartalmazó vizes oldatot ismertetnek.

Az EP 77870 számú szabadalmi leírásban aminosavakat, monoszacharidokat, oligoszacharidokat vagy cukoralkoholokat vagy szénhidrogén-karbonsavakat adagolnak a VIII faktort tartalmazó oldatok stabilitásának fokozására. Az EP 117064 számú szabadalmi leírásban ismertetett megoldás szerint cukoralkoholt vagy diszacharidokat adagolnak a VIII faktor vizes oldatához annak hőkezelése alatti stabilitás fokozására.

A WO-A-91/10439 számú szabadalmi leírásban stabil injekcióoldatot ismertetnek, amely a VIII faktor vagy IX faktor mellett diszacharidot, előnyösen szacharózt és egy vagy több aminosavat tartalmaz. Az EP 315968 és EP 314095 számú szabadalmi leírásokban különböző ionerősségű VIII faktort tartalmazó stabil készítményeket ismertetnek.

Az US-A-4 727 027 számú szabadalmi leírásban eljárást ismertetnek vérből vagy vérkomponensekből származó biológiailag aktív proteinek vizes oldatainak fotokémiai szennyezésmentesítésére az aktivitásvesztés minimalizálása érdekében. Az eljárásnál legalább egy furokumarint adagolnak a készítményhez, és a kapott készítményt UV fénnel besugározzák. A besugárzás előtt a vizes oldat oxigénkoncentrációját csökkenteni lehet a denaturálódás megakadályozására. Ezt például úgy érik el, hogy oxigénmegkötő anyagokat, albumin és/vagy enzimszereket adagolnak és/vagy inert gázzal átöblítik a rendszert. A VIII faktort tartalmazó oldatokat argonnal öblítették át aszorbát jelenlétében vagy anélkül, maximum 6 órán át. Az US-A-4 727 027 számú szabadalmi leírás azonban nem tesz említést az oldatok hosszabb időn át történő tárolásáról, valamint a csökkentett oxigénkoncentráció esetleges hatásáról a VIII faktor aktivitására tárolás alatt. Az EP A 212040 számú szabadalmi leírásban ismertetett megoldás VIII faktor vírus-inaktiválására vonatkozik, amelynél a száraz anyagot csökkentett oxigéntartalmú környezetben melegítik. A hőkezelést stabilizátorok nélkül végzik, mivel ez utóbbiak a vírusokat is védik, és így módon csökkentik a kezelés hatékonyságát. A vizsgálatot 30 órán át, 90 °C hőmérsékleten végzik. Az EP-A-212040 számú szabadalmi leírásban azonban nem tesznek említést a VIII faktort tartalmazó vizes oldatok gyenge stabilitási problémájáról, amelynek leküzdése egy sokkal nagyobb probléma, mint a száraz termék nagyobb stabilitásának leküzdése. Ennek oka, hogy a kémiai változások, így például hidrolízis és dezamidáció, sokkal kifejezettebben mennek végbe oldatban, mint száraz állapotban.

A proteinek különböznek a fizikokémiai tulajdonságaik alapján. A gyógyszerkészítmények előállításánál, amelyeknek fiziológiailag elfogadhatónak és hosszú időn át stabilnak kell lenni, nemcsak a proteinek tulajdonságait, hanem más egyéb szempontokat is figyelembe kell venni. Ezen utóbbiak közé tartozik például az ipari gyártás, valamint a könnyű kezelhetőség és a beteg számára való biztonságosság. Ezen szempontok következményei a különböző készítmények vizsgálatánál előre nem jósolhatók, és így módon az egyes proteinek számára gyakran külön, egyedülálló megoldást kell találni.

A VIII faktor gyártását és aktivitását megkönnyíteni, ha a proteint stabil oldat formájában lehetne kialakítani és a betegnek eljuttatni albumin adagolása nélkül hosszú tárolhatósággal.

5 A beteg számára is megkönnyítené az ilyen oldat a végső gyógyászati termék kezelését. A beteg így módon ezt a kész gyógyászati terméket közvetlenül, oldás nélkül tudná alkalmazni.

Oxigénre érzékeny kémiai vegyületek, így például 10 proteinektől eltérő hatóanyagok vizes oldatait a következőképpen lehet oxigénmentesíteni: az injekció céljára szolgáló vizet nitrogénnel átöblítik az oxigén koncentrációjának csökkentésére. A komponenseket feloldják, és az oldatot nitrogénnel öblítik, majd ezután nitrogén- 15 atmoszférában tartják. A töltés alatt az üvegeket nitrogéngázzal öblítik, majd az üvegeket szintén nitrogén-áramban zárják.

Nem lehetséges azonban a proteinoldatokat gáz- 20 borékkoltatással oxigénmentesíteni. A proteinoldatok erősen habosodnak, és számos protein hatóanyag, így például a VIII koagulációs faktor denaturálódik, ha ilyen kezelésnek vetik alá. Ezért korábban soha nem javasolták, hogy a VIII koagulációs faktort tartalmazó vizes oldatokat inert gázatmoszférában, így például nitro- 25 rogénben tárolják.

Mi azonban azt tapasztaltuk, hogy a VIII koagulációs faktort tartalmazó oldatokat oxigénmentesíteni lehet proteindenaturálás nélkül. Így legnagyobb meglepetésünkre azt találtuk, hogy a VIII koagulációs faktort sta- 30 bilizálni lehet albumin nélkül, és hogy az ilyen vizes oldat, amelynek oxigéntartalma alacsony, stabil, ha 2–8 °C között tárolják.

A fentiek alapján a találmány egy kész gyógyászati termékre vonatkozik, amely csökkentett oxigénkon- 35 centrációjú vizes oldatban VIII koagulációs faktort tartalmaz, és a tárolás alatt a VIII faktor aktivitása lényegében megmarad.

A VIII faktor lehet plazmából származó VIII faktor vagy rekombináns VIII faktor. Ha a VIII faktor 40 rekombináns, az lehet teljes hosszúságú forma vagy előnyösen annak deléciós származéka. Különösen előnyösen a deléciós származék a rekombináns deléciós FVIIISQ(r-VIII SQ) származék.

A VIII faktor aktivitása lehet 10–100 000 IU/ml, 45 előnyösen 50–10 000 IU/ml.

A példákban alkalmazott VIII faktor nagymértékben tisztított, azaz a specifikus aktivitása több mint 5000 IU/mg protein, és a készítményt a találmány szerinti megoldással albumin adagolása nélkül stabili- 50 záljuk.

Az oxigén koncentrációját vagy úgy csökkenthetjük, hogy a vizes oldatot inert gázatmoszférának tesszük ki, vagy először csökkentjük a nyomást, majd azután bevezetjük az inert gáz. Ez utóbbi eljárást előnyösen több 55 ciklusban ismételjük. Ennél a módszernél az oldat oxigéntartalma alacsony szintre csökkenthető anélkül, hogy a VIII faktor aktivitásában lényeges csökkenés következne be. Az oldat oxigéntartalma 200 ppm, előnyösen 50 ppm, még előnyösebben 10 ppm, különösen előnyö- 60 sen 2 ppm alatti érték. A tartályban az oxigéntartalmat

hasonlóképpen lehet csökkenteni, előnyösen úgy, hogy a tartály inert gázatmoszférának tesszük ki.

A végső vagy kész gyógyszertermék formulázott gyógyszerre vonatkozik, amely a végső tartályában van. Alkalmas tartályok a találmány értelmében például a fiolák, fecskendők vagy injekciós eszközök. Az oldatot alkalmasan inert gázatmoszférában, így például nitrogén-, argon- vagy héliumatmoszférában tároljuk az alacsony oxigéntartalom fenntartása érdekében. Az inert gáz előnyösen nem nemes inert gáz, még előnyösebben nitrogén.

Az alacsony oxigéntartalmat lényegében úgy is fenntarthatjuk, hogy a vizes oldathoz antioxidánszt adagolunk. Így az oldat előnyösen tartalmazhat még legalább egy antioxidánszt, így például glutationt, acetil-ciszteint, metionint, tokoferolt, butil-hidroxi-toluint, butil-hidroxi-anizolt vagy valamely fenolos vegyületet. Antioxidánsként előnyösen legalább egy, valamely következő vegyületet alkalmazunk: glutation, acetil-cisztein vagy metionin. Komplexképző szerek, így például EDTA és citromsav tovább javítják a VIII faktor stabilitását.

Az antioxidáns mennyisége függ a felhasznált vegyülettől. Ennek megfelelően koncentrációt vagy mennyiséget általában nem adhatunk meg, fontos azonban, hogy az antioxidáns mennyisége, ha jelen van, gyógyszerészetileg elfogadható mennyiség kell hogy legyen.

Az oldat pH-ja 6,5–8,5, előnyösen 7 körüli érték.

Az oldatban nemionos felületaktív anyag is van előnyösen.

A nemionos felületaktív anyag, ha jelen van, az előnyösen valamely blokk-kopolimer, így például poloxamer vagy poli(oxi-etilén)-szorbitán-zsírsvészter, így például poliszorbát 20 vagy poliszorbát 80.

A nemionos felületaktív anyag mennyisége, ha jelen van, a kritikus micellakoncentráció (critical micelle concentration, CMC) felett kell hogy legyen (Wan és Lee, Journal of Pharm. Sci, 63, 136, 1974). A poli(oxi-etilén)-szorbitán zsírsvészter mennyisége így előnyösen legalább 0,01 mg/ml.

A vizes oldat tartalmazhat továbbá még nátrium- vagy kálium-kloridot, előnyösen több mint 0,1 M mennyiségben.

A VIII faktor nehéz és könnyű láncainak egyesülése függ a kalcium (vagy más, kétértékű fémion jelenlététől). Jelen esetben kalcium-kloridot ( $\text{CaCl}_2$ ) adagoltunk, de más sók, így például kalcium-glükonát, kalcium-glubionát vagy kalcium-glüceptát is alkalmazható előnyösen 0,5 mM-nál nagyobb mennyiségben.

A vizes oldat tartalmaz valamely aminosavat, így például L-hisztidint, lizint és/vagy arginint több mint 1 mM koncentrációban. Mono- vagy diszacharidok, így például szacharóz vagy cukoralkoholok szintén adagolhatók. Az oldat előnyösen L-hisztidint és szacharózt tartalmaz.

A kész gyógyászati termék előnyösen vizes oldatban a következőket tartalmazza:

i) 10–100 000 IU/ml rekombináns koagulációs VIII faktor,

ii) legalább 0,01 mg/ml poli(etilén-oxi)-szorbitán-zsírsvészter,

iii) nátrium-klorid, előnyösen több mint 0,1 M mennyiségben,

5 iv) kalciumsó, így például kalcium-klorid vagy kalcium-glükonát, előnyösen több mint 0,5 mM mennyiségben,

v) aminosav, így például L-hisztidin 1 mM-nál nagyobb mennyiségben,

10 vi) mono- vagy diszacharid vagy cukoralkohol, előnyösen szacharóz vagy mannit.

Ehhez az oldathoz még antioxidáns is adagolható gyógyszerészetileg elfogadható mennyiségben.

15 A találmány szerinti végső gyógyszertermék így egy felhasználásra kész stabil vizes oldat.

A találmány szerinti gyógyszerterméket úgy állítjuk elő, hogy a VIII koagulációs faktort vagy az utolsó tisztítási lépésből származó VIII koagulációs faktort egy vizes oldattal elkeverjük. A megfelelő vizes oldat tartalmaz legalább egy valamely következő adalékot: nemionos felületaktív anyag, antioxidáns, aminosav, így például L-hisztidin, nátriumsó, kalciumsó vagy szacharóz.

A találmány vonatkozik továbbá a VIII koagulációs faktor stabilitásának fokozására szolgáló eljárásra vizes oldatban, amelynél az oldatot inert gázatmoszférában tároljuk. A találmány vonatkozik továbbá egy olyan eljárásra, amelynél lehetséges a kezdeti VIII faktor kezdeti aktivitásának legalább 50, még inkább 80%-ának megtartása 6 hónapos tárolás után, 2–10 °C hőmérsékleten és 6,5–8,5 közötti pH-értéken. A találmány szerinti megoldás alkalmazásával lehetséges a végső gyógyszerterméket, amely vizes oldatban VIII faktort tartalmaz 12, még inkább 24 hónapon át tárolni anélkül, hogy a VIII faktor aktivitásának észrevehető vesztesége következne be. A találmány szerinti megoldás különösen alkalmazható, ha a VIII faktor r-VIII SQ, mivel a példákban bemutatott adatok szerint az r-VIIISQ legalább 6 hónapon át  $5 \pm 3$  °C hőmérsékleten nitrogénatmoszférában tárolva lényegében stabil marad.

40 A következő példákban a találmányt mutatjuk be közelebbről, és stabilitási adatokat adunk meg a különböző vizes oldatok esetén, amely oldatokat a találmány szerinti nitrogén- és argonatmoszférában kezeltünk, összehasonlításhoz levegőn tárolt készítmény adatait adjuk meg. A találmány természetesen nem korlátozódik ezekre a példákra.

#### *Kísérleti rész*

#### *Anyagok és eljárások*

50 A rekombináns VIII SQ faktort (r-VIII SQ) lényegében a WO-A-91/09122 számú közzétételi irat 1–3. példájában leírtak szerint állítottuk elő. A DHFR hiányos CHO-sejtvonalat (DG44N.Y.) elektroporáltunk egy r-VIII SQ gént tartalmazó expressziós vektorral és egy dihidrofolát reduktáz gént tartalmazó expressziós vektorral. A szelektív közegen való szelektálódást követően a túlélő kolóniákat növesztettük, lépcsőzetesen növelve a metotexát mennyiségét. A kapott kolóniák felülűszoját egyenként vizsgáltuk a VIII faktor-aktivitásra. Kiválasztottuk a termelőklónt, és ezt egymást követő szérum-

mentes szuszpenziós tenyésztéséhez adaptáltuk meghatározott közegben, majd végül egy nagyipari méretű fermentációs eljárásnak vetettük alá. A felülűszót bizonyos idő elteltével elválasztottuk, majd tovább tisztítottuk az alábbiakban leírtak szerint.

A tisztított közeg pH-ját beállítottuk, és egy S-Sepharose FF oszlopra adagoltuk. Mosás után a VIII faktort 5 mM  $\text{CaCl}_2$ -t tartalmazó sópufferral eluáltuk.

Immunoaffinitásos gyantán immunoadszorpciót végeztünk, ligandumként a VIII faktor nehéz láncával szembeni monoklón antitestet (8A4) alkalmaztunk. Az oszlopra való felvitel előtt az S-eluátumot 0,3%-os TNBP-vel és 1%-os Octoxynol 9 anyaggal kezeltük.

Az oszlopot kiegyensúlyoztuk, mostuk, a VIII faktort eluáltuk, 0,05 M  $\text{CaCl}_2$  és 50% etilén-glikol-tartalmú pufferral.

Az mAb-eluátumot egy Q-Sepharose oszlopra vittük fel, majd egy elúciós pufferral az immunoaffinitásos lépésnél kiegyensúlyoztuk. Mosás után a VIII faktort 0,05 M L-hisztidint, 4 mM  $\text{CaCl}_2$ -t és 0,6 mól NaCl-t tartalmazó anyaggal eluáltuk (pH=6,8).

A Q-eluátumot egy gélfiltrációs oszlopra vittük (Superdex 200 p. g.). A kiegyensúlyozást és az eluálást a formulációs pufferral végeztük, amikor is az alábbi példák szerinti készítményt nyertük.

Az r-VIII SQ anyagot a végső tisztítási lépésnél nyerjük. A VIII faktor-aktivitást és az inaktív komponensek koncentrációját a megfelelő pufferral való hígítással állítottuk be. Az oldatot ezután sterilen szűrtük (0,22  $\mu\text{m}$ ), kiadagoltuk és oxigénmentesítettük, az oldatot csökkentett nyomásnak tettük ki, majd több ciklusban inert gázt vezettünk be.

5 A VIII koagulációs faktor aktivitását kromogén szubsztrátumvizsgálattal (Coatest Factor VIII, Chromogenix AB, Mölndal, Sweden) határoztuk meg. Az aktivált X faktort (Xa) belső úton nyertük, ahol a VIII faktor kofaktorként szerepelt. Az Xa faktort ezután vizsgáltuk szintetikus kromogén szubsztrátum, S-2222 alkalmazásával I-2581 trombin inhibitor jelenlétében a szubsztrátum hidrolízisének megakadályozására. A reakciót savval megállítottuk, majd meghatároztuk fotometrikus úton 450 nm-en reagens vakpróbával szemben a VIII:C mennyiségét, amely arányos a pNA (para-nitroanilin) felszabadulásával. A VIII:C faktor-egységet nemzetközi egységben (IU) fejeztük ki, amelyet a WHO határozott meg, a jelenlegi International Concentrate Standard (IS)-ben.

#### 1. példa

*Levegő- vagy nitrogénatmoszférában tárolt oldatok összehasonlítása*

Rekombináns VIII faktort állítottunk elő az előzőekben leírtak szerint.

Az oldatokat három különböző hőmérsékleten, 7,25 és 30 °C hőmérsékleten tároltuk.

A fiolákba szétosztott mennyiség 2 ml volt.

#### 1. táblázat

Az összetételek a következők:

|                    | 1A             | 1B             | 1C     | 1D             | 1E             | 1F     |
|--------------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|--------|
| L-Histidine, mM    | 14,7           | 14,7           | 14,7   | 14,7           | 14,7           | 14,7   |
| Nátrium-klorid, M  | 0,31           | 0,31           | 0,31   | 0,31           | 0,31           | 0,31   |
| Kalcium-klorid mM  | 3,7            | 3,7            | 3,7    | 3,7            | 3,7            | 3,7    |
| Poliszorbát, mg/ml | 0,23           | 0,23           | 0,23   | 0,23           | 0,23           | 0,23   |
| pH                 | 7              | 6              | 7      | 7              | 6              | 7      |
| Atmoszféra         | N <sub>2</sub> | N <sub>2</sub> | levegő | N <sub>2</sub> | N <sub>2</sub> | levegő |
| VIII:C IU/ml       |                |                |        |                |                |        |
| kezdeti            | 267            | 258            | 267    | 260            | 259            | 260    |
| 3 hónap után 7 °C  | 238            | 219            | –      | 224            | 151            | –      |
| 6 hónap után 7 °C  | 217            | 186            | 158    | 204            | 84             | 20     |
| 1 hónap után 25 °C | 220            | –              | –      | 232            | –              | –      |
| 3 hónap után 25 °C | 198            | –              | –      | 186            | –              | –      |
| 1 hónap után 30 °C | 210            | 181            | 136    | 210            | 160            | 8      |
| 3 hónap után 30 °C | 158            | 126            | 26     | 152            | 54             | 2      |

Mint az a fenti példából kitűnik, oxigén nélkül 7 °C hőmérsékleten elfogadható mennyiségű VIII:C van jelen 6 hónapos oldatban való tárolás után is. 25 vagy 30 °C hőmérsékleten is lehet a találmány szerinti megoldással a tárolást végezni az aktivitás túlzott vesztesége nélkül. Látható továbbá, hogy a stabilitás jobb pH=7 értéknél, mint pH=6 értéknél.

## 2. példa

### Antioxidáns és szacharózt tartalmazó oldatok

A rekombináns VIII faktort a kísérleti részben leírtak szerint állítjuk elő.

Az oldatokat két különböző hőmérsékleten, 7°, illetve 25 °C hőmérsékleten tároltuk.

A fiolákba szétosztott mennyiség 2 ml volt

## 2. táblázat

Az összetételek a következők:

|                       | 2A    | 2B    |
|-----------------------|-------|-------|
| Nátrium-klorid, mg/ml | 0,3 l | 0,3 l |
| Kalcium-klorid, mM    | 3,7   | 3,7   |
| Poliszorbát, mg/ml    | 0,23  | 0,23  |
| L-Histidine, mM       | 14,7  | 59    |
| Szacharóz, mg/ml      | 200   | 200   |

|                        | 2A             | 2B             |
|------------------------|----------------|----------------|
| Glutation, mg/ml       | 0,3            | –              |
| Acetil-cisztein, mg/ml | –              | 3              |
| pH                     | 7              | 7              |
| Atmoszféra             | N <sub>2</sub> | N <sub>2</sub> |
| VIII:C IU/ml           |                |                |
| kezdeti                | 105            | 108            |
| 3 hónap után, 7 °C     | 99             | 105            |
| 6 hónap után, 7 °C     | 90             | 91             |
| 2 hónap után, 25 °C    | 85             | 78             |
| 3 hónap után, 25 °C    | 78             | 66             |

Mindegyik oldat esetén elfogadható stabilitást határoztunk meg a VIII:C esetén 7°-on, 6 hónap elteltével.

## 3. példa

### Glutaciont vagy aszkorbinsavat tartalmazó oldatok összehasonlítása levegő- vagy nitrogénatmoszférában való tárolás esetén

A rekombináns VIII faktort a kísérleti részben leírtak szerint állítjuk elő.

Az oldatokat 25 °C hőmérsékleten tároltuk.

A fiolákba szétosztott mennyiség 2 ml volt.

## 3. táblázat

Az összetételek a következők:

|                       | 3A             | 3B     | 3C             | 3D     | 3E             | 3F     |
|-----------------------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|
| Histidine, mg/ml      | 2,27           | 2,27   | 2,27           | 2,27   | 2,27           | 2,27   |
| Nátrim-klorid, mg/ml  | 18,1           | 18,1   | 18,1           | 18,1   | 18,1           | 18,1   |
| Kalcium-klorid, mM    | 3,7            | 3,7    | 3,7            | 3,7    | 3,7            | 3,7    |
| Poliszorbát 80, mg/ml | 0,23           | 0,23   | 0,23           | 0,23   | 0,23           | 0,23   |
| Glutation, mg/ml      | 0              | 0      | 0,3            | 0,3    | 0              | 0      |
| Aszkorbinsav, mg/ml   | 0              | 0      | 0              | 0      | 4              | 4      |
| pH                    | 7              | 7      | 7              | 7      | 7              | 7      |
| Atmoszféra            | N <sub>2</sub> | levegő | N <sub>2</sub> | levegő | N <sub>2</sub> | levegő |
| VIII:C IU/ml kezdeti  | 231            | 231    | 225            | 225    | 220            | 220    |
| 1 hónap után          | 212            | 15     | 203            | 170    | 169            | 2      |
| 2 hónap után          | 200            | 6      | 177            | 113    | –              | –      |
| 3 hónap után          | 210            | –      | 163            | –      | –              | –      |

2 hónapos nitrogénatmoszférában való tárolás után a VIII faktor kezdeti aktivitásának körülbelül 80%-a megmaradt. Ez független attól, hogy glutation jelen volt vagy nem. Azonban a glutation jelentős mértékben növelte a stabilitást, ha az oldatot levegőn tároltuk. Az aszkorbinsav a VIII faktor stabilitását csökkentette.

## 4. példa

### Glutaciont tartalmazó és glutation nélküli oldatok összehasonlítása levegő- vagy argonatmoszférában való tárolás során

A rekombináns VIII faktort a kísérleti részben leírtak szerint állítjuk elő.

Az oldatokat két különböző hőmérsékleten, 7°, illetve 25 °C hőmérsékleten tároltuk.

A fiolákba bemért mennyiség 2 ml volt.

## 4. táblázat

Az összetételek a következők:

|                         | 4A   | 4B   | 4C     | 4D   | 4E   | 4F     |
|-------------------------|------|------|--------|------|------|--------|
| Histidine, mg/ml        | 2,29 | 2,29 | 2,29   | 2,29 | 2,29 | 2,29   |
| Nátrium-klorid, mg/ml   | 18,1 | 18,1 | 18,1   | 18,1 | 18,1 | 18,1   |
| Kalcium-klorid, mM      | 3,7  | 3,7  | 3,7    | 3,7  | 3,7  | 3,7    |
| Poliszorbát 80, mg/ml   | 0,23 | 0,23 | 0,23   | 0,23 | 0,23 | 0,23   |
| Glutation, mg/ml        | –    | 0,6  | 0,6    | –    | 0,6  | 0,6    |
| pH                      | 7    | 7    | 7      | 7    | 7    | 7      |
| Tárolási hőmérséklet °C | 25   | 25   | 25     | 7    | 7    | 7      |
| Atmoszféra              | Ar   | Ar   | levegő | Ar   | Ar   | levegő |
| VIII:C IU/ml kezdeti    | 234  | 176  | 234    | 234  | 176  | 234    |
| 1 hónap után            | 213  | 157  | 133    | 232  | 172  | 160    |
| 2 hónap után            | 187  | 139  | 90     | 200  | 153  | 148    |
| 3 hónap után            | 185  | 138  | 72     | 207  | 159  | 131    |
| 4 hónap után            | 158  | 116  | –      | 186  | 144  | 125    |
| 6 hónap után            | 149  | 111  | –      | 188  | 147  | 114    |
| 9 hónap után            | –    | –    | –      | 130  | 106  | 67     |

6 hónapos argonatmoszférában való tárolás után a VIII faktor aktivitása az eredeti érték 65%-a vagy ennél több volt 25 °C hőmérsékleten. 7 °C hőmérsékleten a megfelelő érték 80% vagy még több.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Stabil, beadásra alkalmas gyógyszerkészítmény, amely a végső, felhasználásra kész tartályában 10–100 000 IU/ml aktivitásnak megfelelő koagulációs VIII faktort tartalmaz vizes oldatban csökkentett oxigénkoncentráció mellett, a VIII faktor-aktivitás túlnyomó részének tárolás alatti megtartása érdekében. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

2. Az 1. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amely inert gáz is tartalmaz. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

3. A 2. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amely inert gázként nitrogént tartalmaz. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben a vizes oldat még legalább egy antioxidáns is tartalmaz a következőkből: glutation, acetil-cisztein, metionin, tokoferol, butil-hidroxi-toluol, butil-hidroxi-anizol vagy valamely fenolos vegyület. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

5. A 4. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amely antioxidánsként glutationt, acetil-ciszteint vagy metionint tartalmaz. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amely nagy tisztaságú koagulációs VIII faktort tartalmaz, és az oldat albumin adagolása nélkül stabil. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti végső gyógyszerkészítmény, amelyben a koagulációs VIII fak-

tor egy teljes hosszúságú rekombináns VIII faktor vagy annak deléciós származéka. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

8. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben az aktív koagulációs VIII faktor mennyisége 50–10 000 IU/ml. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

9. Az 1–8. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amelynél a vizes oldat még egy nemionos felületaktív anyagot is tartalmaz. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

10. A 9. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben a nemionos felületaktív anyag mennyisége a kritikus micellakoncentráció feletti érték. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

11. A 9. vagy 10. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amely nemionos felületaktív anyagként valamely blokk-kopolimert vagy poli(etilén-oxi)-szorbitán-zsír-savésztert tartalmaz. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

12. A 1–11. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amelynél a vizes oldat még valamely kalciumsót, így kalcium-kloridot vagy kalcium-glükonátot tartalmaz, előnyösen 0,5 mM feletti koncentrációban. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

13. Az 1–12. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amelynél a vizes oldat még valamely aminosavat, így például L-hisztidint tartalmaz 1 mM feletti mennyiségben. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

14. Az 1–13. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amelynél a vizes oldat még valamely mono- vagy diszacharidot vagy cukor-alkoholt, előnyösen szacharózt tartalmaz. Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

15. Az 1–14. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amelynél a vizes oldat összetétele a következő:

i) 10–100 000 IU/ml rekombináns koagulációs VIII faktor,

ii) legalább 0,01 mg/ml poli(etilén-oxi)-szorbitán-zsír-sav-észter,

iii) nátrium-klorid, előnyösen 0,1 M feletti mennyiségben,

iv) kalciumsó, így például kalcium-klorid vagy kalcium-glükonát, előnyösen 0,5 mM feletti mennyiségben,

v) valamely aminosav, így például L-hisztidin 1 mM feletti mennyiségben,

vi) egy mono- vagy diszacharid vagy cukoralkohol, előnyösen szacharóz vagy mannit Elsőbbsége: 1994. 07. 01.

16. Eljárás az 1–15. igénypontok bármelyike szerinti oldat előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy vizes oldatot elkeverünk 10–100 000 IU/ml aktivitásnak megfelelő mennyiségű koagulációs VIII faktorról, majd csökkentjük az oxigénkoncentrációt az oldat inert gázatmoszféra alá helyezésével. Elsőbbsége: 1993. 05. 07.

17. Eljárás az 1–15. igénypontok bármelyike szerinti oldat előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy vizes oldatot elkeverünk a VIII koagulációs faktorról,

majd csökkentjük az oxigénkoncentrációt úgy, hogy először csökkentjük a nyomást, majd inert gázt vezetünk be, előnyösen több ciklusban. Elsőbbsége: 1993. 05. 07.

5 18. Eljárás az 1–15. igénypontok bármelyike szerinti oldat előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a VIII koagulációs faktort az utolsó tisztítási lépésnél egy vizes puffer oldattal eluáljuk, majd csökkentjük az oxigénkoncentrációt az oldat inert gázatmoszféra alá helyezésével. Elsőbbsége: 1993. 05. 07.

10 19. Eljárás az 1–15. igénypontok bármelyike szerinti oldat előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a koagulációs VIII faktort az utolsó tisztítási lépésnél vizes puffer oldattal eluáljuk, majd csökkentjük az oxigénkoncentrációt úgy, hogy először a nyomást csökkentjük, majd inert gázt vezetünk be, előnyösen több ciklusban. Elsőbbsége: 1993. 05. 07.

15 20. A 16–19. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vizes oldatban még legalább egy további adalékot is alkalmazunk a következők közül: nemionos felületaktív anyag, antioxidáns, aminosav, előnyösen L-hisztidin, nátriumsó, kalciumsó vagy szacharóz. Elsőbbsége: 1993. 05. 07.