



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2001125929/15, 22.02.2000

(24) Дата начала действия патента: 22.02.2000

(30) Приоритет: 22.02.1999 US 09/255,279
 01.12.1999 US 09/452,752

(43) Дата публикации заявки: 10.06.2003

(45) Опубликовано: 20.01.2005 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 5328694 A, 12.07.1994. EP 0818204 A1, 14.01.1998. RU 2136294 C1, 10.09.1999. DE 4431833 A, 18.05.1995. WO 9407510 A1, 14.04.1994. WO 9426286 A1, 24.11.1994.

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 24.09.2001

(86) Заявка PCT:
 US 00/40068 (22.02.2000)

(87) Публикация PCT:
 WO 00/48635 (24.08.2000)

Адрес для переписки:
 129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО
 "Юридическая фирма Городисский и Партнеры",
 пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

БЕСМАН Марк (US),
 БЬЕРНСОН Эрик (US),
 ДЖАМИЛЬ Фероз (US),
 КАШИ Рамеш (US),
 ПАЙКАЛ Майкл (US),
 ЧЕССАЛОВ Сергей (US),
 КАРПЕНТЕР Джон (US)

(73) Патентообладатель(ли):

ЮНИВЕРСИТИ ОФ КОННЕКТИКУТ (US),
 БАКСТЕР ИНТЕРНЭШНЛ ИНК. (US)

(54) НОВЫЕ НЕ СОДЕРЖАЩИЕ АЛЬБУМИН СОСТАВЫ ФАКТОРА VIII

(57) Реферат:

Композиция фактора VIII, составленная без добавления альбумина, включающая следующие эксципиенты состава в дополнение к фактору VIII: от 4% до 10% наполнителя, выбранного из группы, состоящей из маннита, глицина и аланина; от 1% до 4% стабилизирующего агента, выбранного из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина; от 1 мМ до 5 мМ соли кальция, от 100 мМ до 300 мМ NaCl, и буферный агент для поддержания pH приблизительно между 6 и 8. Альтернативно, состав может включать от 2% до 6% гидроксиэтилкрахмала; от 1% до 4% стабилизирующего агента, выбранного из группы,

состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина; от 1 мМ до 5 мМ соли кальция, от 100 мМ до 300 мМ NaCl, и буферный агент для поддержания pH приблизительно между 6 и 8. В дополнительном варианте осуществления состав может включать: от 300 мМ до 500 мМ NaCl, от 1% до 4% стабилизирующего агента, выбранного из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, рафинозы и аргинина; от 1 мМ до 5 мМ соли кальция и буферный агент. Технический результат - композиция обеспечивает стабильность в отсутствии альбумина или других белков. 4 н. и 31 з.п. ф-лы, 11 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2001125929/15, 22.02.2000

(24) Effective date for property rights: 22.02.2000

(30) Priority: 22.02.1999 US 09/255,279
01.12.1999 US 09/452,752

(43) Application published: 10.06.2003

(45) Date of publication: 20.01.2005 Bull. 2

(85) Commencement of national phase: 24.09.2001

(86) PCT application:
US 00/40068 (22.02.2000)

(87) PCT publication:
WO 00/48635 (24.08.2000)

Mail address:

129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj

(72) Inventor(s):

BESMAN Mark (US),
B'ERNSON Ehrik (US),
DZhAMIL' Feroz (US),
KASHI Ramesh (US),
PAJKAL Majkl (US),
ChESSALOV Sergej (US),
KARPENTER Dzhon (US)

(73) Proprietor(s):

JuNIVERSITI OF KONNEKTIKUT (US),
BAKSTER INTERNEhShNL INK. (US)

(54) NEW ALBUMIN-FREE COMPOSITIONS OF FACTOR VIII

(57) Abstract:

FIELD: medicine, hematology, pharmacy.

SUBSTANCE: invention relates to the composition of factor VIII composed without addition of albumin and comprising the following excipients of composition in addition to factor VIII: from 4% to 10% of filling agent taken among group consisting of mannitol, glycine and alanine; from 1% to 4% of stabilizing agent taken among group consisting of sucrose, trehalose, raffinose, arginine; from 1 mM to 5 mM of calcium salt, from 100 mM to 300 mM of NaCl, and buffer agent for pH value maintenance about between 6 and 8. Alternatively, the composition can comprise from 2% to 6% of hydroxyethylstarch; from

1% to 4% of stabilizing agent taken among group consisting of sucrose, trehalose, raffinose, arginine; from 1 mM to 5 mM of calcium salt, from 100 mM to 300 mM of NaCl, and buffer agent for pH value maintenance between 6 and 8. In additional variant of realization of invention the composition can comprise: from 300 mM to 500 mM of NaCl, from 1% to 4% of stabilizing agent taken among group consisting of sucrose, trehalose, raffinose and arginine; from 1 mM to 5 mM of calcium salt, and buffer agent. The composition provides stability in the absence of albumin or other proteins.

EFFECT: valuable properties of compositions.
35 cl, 11 tbl, 7 ex

Фактор VIII представляет собой белок, обнаруженный в плазме крови, который выступает в качестве кофактора в каскаде реакций, ведущих к коагуляции крови. Дефицит количества активности фактора VIII в крови приводит к нарушению свертывания крови, известному как гемофилия А, наследственно передающемуся болезненному состоянию, в основном поражающему мужчин. Гемофилию А обычно лечат терапевтическими препаратами фактора VIII, полученными из плазмы крови или изготовленными с использованием технологий рекомбинантной ДНК. Такие препараты вводят либо в ответ на случай кровотечения (лечение по требованию), либо с частыми регулярными интервалами для предотвращения неконтролируемого кровотечения (профилактика).

Известно, что фактор VIII является относительно нестойким в терапевтических препаратах. В плазме крови фактор VIII обычно закомплексован с другим белком плазмы, фактором фон Виллебранда (von Willebrand, vWF), который присутствует в плазме в большом мольном избытке относительно фактора VIII, и предполагается, что он защищает фактор VIII от преждевременного разложения. Другой циркулирующий белок плазмы, альбумин, также может играть роль в стабилизации фактора VIII *in vivo*. Предлагаемые в настоящее время к продаже препараты фактора VIII, следовательно, рассчитаны в основном на применение альбумина и/или vWF для стабилизации фактора VIII в процессе способа изготовления и во время хранения.

Однако альбумин и vWF, используемые в предлагаемых на рынке в настоящее время препаратах фактора VIII, получают из плазмы человеческой крови, и применение таких материалов имеет некоторые недостатки. Поскольку с целью увеличения стабильности фактора VIII в такие препараты обычно добавляют большой молярный избыток альбумина по сравнению с фактором VIII, то трудно охарактеризовать белок фактора VIII в таких препаратах. Добавление полученного от человека альбумина к фактору VIII также воспринимается как невыгодное в отношении рекомбинантно получаемых препаратов. Это связано с тем, что рекомбинантно полученные препараты фактора VIII в отсутствие такого добавленного альбумина могли бы в противном случае не содержать полученных от человека белков, и теоретический риск передачи вируса был бы снижен.

Описано несколько попыток составить рецептуру фактора VIII без альбумина или vWF (или при относительно низком уровне таких эксципиентов). Например, в патенте США №5565427 (EP 508194) Freudenberg (правопреемник Behringwerke) описаны препараты фактора VIII, которые содержат определенные сочетания детергента и аминокислот, конкретно аргинина и глицина, в дополнение к эксципиентам, таким как хлорид натрия и сахара. Указано, что детергент, полисорбат 20 или полисорбат 80, присутствует в количествах от 0,001 до 0,5% (об/об), тогда как аргинин и глицин присутствуют в количествах от 0,01 до 1 моль/л. Указано, что сахара присутствуют в количествах от 0,1 до 10%. В примере 2 данного патента утверждается, что растворы из (1) 0,75% сахарозы, 0,4М глицина и 0,15М NaCl и (2) 0,01 М цитрата натрия, 0,08 М глицина, 0,016 М лизина, 0,0025 М хлорида кальция и 0,4 М хлорида натрия были нестабильными в растворе свыше 16 часов, тогда как растворы из (3) 1% сахарозы, 0,14 М аргинина, 0,1 М хлорида натрия и (4) 1% сахарозы, 0,4 М глицина, 0,14 М аргинина, 0,1 М хлорида натрия и 0,05% Tween 80 продемонстрировали стабильность.

В патенте США №5763401 (EP 818204) Nayer (правопреемник Bayer) также описана терапевтическая композиция фактора VIII, не содержащая альбумина, включающая 15-60 мМ сахарозы, вплоть до 50 мМ NaCl, вплоть до 5 мМ хлорида кальция, 65-400 мМ глицина и вплоть до 50 мМ гистидина. Указываются как стабильные следующие конкретные составы: (1) 150 мМ NaCl, 2,5 мМ хлорида кальция и 165 мМ маннита; и (2) 1% сахарозы, 30 мМ хлорида натрия, 2,5 мМ хлорида кальция, 20 мМ гистидина и 290 мМ глицина. Было установлено, что состав, содержащий более высокое количество сахара (10% мальтозы, 50 мМ NaCl, 2,5 мМ хлорида кальция и 5 мМ гистидина), обладает низкой стабильностью в лиофилизованном состоянии по сравнению с составом (2).

В патенте США №5733873 (EP 627924) Osterberg (правопреемник Pharmacia & Upjohn) описаны составы, которые включают от 0,01 до 1 мг/мл поверхностно-активного вещества.

В данном патенте описаны составы, имеющие следующие диапазоны эксципиентов: полисорбат 20 или 80 в количестве, по крайней мере, 0,01 мг/мл, предпочтительно 0,02-1,0 мг/мл; по крайней мере, 0,1 М NaCl; по крайней мере, 0,5 мМ соли кальция; и, по крайней мере, 1 мМ гистидина. Более конкретно, описаны следующие определенные составы: (1) 14,7-50-65 мМ гистидина, 0,31-0,6 М NaCl, 4 мМ хлорида кальция, 0,001-0,02-0,025% полисорбата 80, в присутствии или в отсутствие 0,1% PEG4000 или 19,9 мМ сахарозы; и (2) 20 мг/мл маннита, 2,67 мг/мл гистидина, 18 мг/мл NaCl, 3,7 мМ хлорида кальция и 0,23 мг/мл полисорбата 80.

Также описаны другие попытки применения низкой или высокой концентрации хлорида натрия. В патенте США №4877608 (EP 315968) Lee (правопреемник Rhone-Poulenc Rorer) указаны составы с относительно низкими концентрациями хлорида натрия, а именно составы, включающие 0,5 мМ-15 мМ NaCl, 5 мМ хлорида кальция, 0,2 мМ-5 мМ гистидина, 0,01-10 мМ гидрохлорида лизина и вплоть до 10% сахара. "Сахар" может представлять собой вплоть до 10% мальтозы, 10% сахарозы или 5% маннита.

В патенте США №5605884 (EP 0314095) Lee (правопреемник Rhone-Poulenc Rorer) описано применение составов с относительно высокими концентрациями хлорида натрия. Данные составы включают 0,35 М-1,2 М NaCl, 1,5-40 мМ хлорида кальция, 1 мМ-50 мМ гистидина и вплоть до 10% "сахара", такого как маннит, сахароза или мальтоза. В качестве примера приведен состав, включающий 0,45 М NaCl, 2,3 мМ хлорида кальция и 1,4 мМ гистидина.

В публикации международной патентной заявки WO 96/22107 Roser (правопреемник Quadrant Holdings Cambridge Limited) описаны составы, включающие сахар - трегалозу. Данные составы включают: (1) 0,1 М NaCl, 15 мМ хлорида кальция, 15 мМ гистидина и 1,27 М (48%) трегалозы; или (2) 0,011% хлорида кальция, 0,12% гистидина, 0,002% Tris, 0,002% Tween 80, 0,004% PEG 3350, 7,5% трегалозы и либо 0,13%, либо 1,03% NaCl.

Другие терапевтические составы фактора VIII из предшествующего уровня техники обычно включают альбумин и/или vWF с целью стабилизации фактора VIII и, следовательно, не существенны для настоящего изобретения. Например, в патенте США 5328694 (EP 511234) Schwinn (правопреемник Ocrapharma AG) описывается состав, который включает 100-650 мМ дисахарида и 100 мМ-1,0М аминокислоты. Конкретно, раскрываются следующие композиции: (1) 0,9 М сахарозы, 0,25 М глицина, 0,25М лизина и 3 мМ хлорида кальция; и (2) 0,7 М сахарозы, 0,5 М глицина и 5 мМ хлорида кальция.

В то время как предпринимались попытки получить состав фактора VIII, не содержащий альбумин или vWF, все еще сохраняется необходимость в терапевтических составах фактора VIII, которые являются стабильными в отсутствие альбумина или других белков.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к терапевтическим композициям фактора VIII, которые являются стабильными в отсутствие альбумина. В частности, настоящее изобретение относится к композиции фактора VIII, включающей, в дополнение к фактору VIII: от 4% до 10% наполнителя, выбранного из группы, состоящей из маннита, глицина и аланина; от 1% до 4% стабилизирующего агента, выбранного из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина; от 1 мМ до 5 мМ соли кальция, от 100 мМ до 300 NaCl, и буферный агент для поддержания pH в интервале приблизительно от 6 до 8. Данная композиция может дополнительно включать поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 20, полисорбат 80, Pluronic F68 или Brij35. Когда поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80, то последний должен присутствовать в количестве менее 0,1%.

Буфер в композициях фактора VIII согласно настоящему изобретению предпочтительно присутствует в концентрации от 10 мМ до 50 мМ и, предпочтительно, его выбирают из группы, состоящей из гистидина, Tris, BIS-TrisPropane, PIPES, MOPS, HEPES, MES и ACES. Преимущественно, буферный агент представляет собой либо гистидин, либо Tris. Композиция фактора VIII по настоящему изобретению может дополнительно включать антиоксидант.

Композиции фактора VIII настоящего изобретения включают как наполнитель, так и стабилизатор. Наполнитель может присутствовать в количестве от примерно 6% до примерно 8%, предпочтительно примерно 8%. Стабилизирующий агент предпочтительно присутствует в количестве примерно 2%. Хлорид натрия также присутствует в таких композициях, предпочтительно в количестве от 150 до 350 мМ и более предпочтительно в количестве примерно 225 мМ. Соль кальция в композиции также предпочтительно представляет собой хлорид кальция, а сама композиция предпочтительно находится в лиофилизованной форме.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение может включать композицию фактора VIII, составленную без добавления альбумина, которая включает следующие эксципиенты в дополнение к фактору VIII: от 2% до 6% гидроксиэтилкрахмала; от 1% до 4% стабилизирующего агента, выбранного из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина; от 1 мМ до 5 мМ соли кальция; от 100 мМ до 300 мМ NaCl и буферный агент для поддержания pH в интервале приблизительно от 6 до 8.

Предпочтительно такая композиция включает примерно 4% гидроксиэтилкрахмала, и NaCl присутствует в количестве примерно 200 мМ. Стабилизирующий агент также предпочтительно присутствует в количестве примерно 2%.

В следующем варианте осуществления настоящее изобретение включает композицию фактора VIII, составленную без альбумина и содержащую: от 300 мМ до 500 мМ NaCl; от 1% до 4% стабилизирующего агента, выбранного из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина; от 1 мМ до 5 мМ соли кальция; и буферный агент для поддержания pH в интервале приблизительно от 6 до 8. Предпочтительно NaCl присутствует в концентрации примерно 400 мМ.

Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лиофилизации водной композиции фактора VIII в контейнере с использованием лиофилизатора, где способ включает первоначальную стадию замораживания и первоначальная стадия замораживания дополнительно включает стадии: (а) понижения температуры в камере лиофилизатора до, по крайней мере, -45°C ; (b) повышения температуры в камере до температуры в интервале примерно от -15°C до -25°C ; и далее (с) понижение температуры в камере до, по крайней мере, -45°C . В данном способе температуру в камере, предпочтительно, понижают или повышают со скоростью между примерно $0,5^{\circ}\text{C}$ и примерно $1,0^{\circ}\text{C}$ в минуту. На стадии (а) температуру, предпочтительно, поддерживают в течение примерно 1 часа и ее понижают примерно до -55°C . На стадии (b) температуру, предпочтительно, поддерживают в интервале между -15°C и -25°C в течение от 1 до 3 часов и, более предпочтительно, она составляет -22°C , и температуру на стадии (с), предпочтительно, поддерживают в течение примерно 1 часа. Композиция фактора VIII, используемая в данном способе, предпочтительно, включает от 4% до 10% агента, выбранного из группы, состоящей из маннита, глицина и аланина, и также, предпочтительно, включает от 1% до 4% агента, выбранного из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы и аргинина. Кроме того, композиция фактора VIII, используемая в данном способе, также предпочтительно содержит от 100 мМ до 300 мМ NaCl.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Как использовано в данном описании, термины, приведенные ниже, и их вариации будут определяться следующим образом, если не указано другого.

Фактор VIII - молекула фактора VIII существует в природе и в терапевтических лекарственных формах в виде гетерогенного распределения полипептидов, являющихся продуктом единственного гена (смотри Andersson et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 83, 2979-2983, май 1986). Термин "фактор VIII", как он использован в данном описании, относится ко всем таким полипептидам, либо полученным из плазмы крови, либо полученным с использованием методики рекомбинантной ДНК. Коммерчески доступные примеры терапевтических лекарственных форм, содержащих фактор VIII, включают

продаваемые под торговыми наименованиями HEMOFIL M и RECOMBINATE (доступны от Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, Illinois, USA). Другие лекарственные препараты, находящиеся в настоящее время в разработке, включают, в основном, единственную субпопуляцию молекул фактора VIII, у которых не хватает части домена В в молекуле.

5 Международная единица, МЕ - международная единица или МЕ представляет собой единицу измерения активности (способности) фактора VIII к коагуляции крови, измеренную в стандартном анализе, таком как один из следующих.

Одностадийный анализ. В данной области известны такие одностадийные анализы, как описанные в Lee, Martin L., et al. An Effect of Predilution on Potency Assays of Factor VIII Concentrates, Thrombosis Research (Pergamon Press Ltd.) 30, 511-519 (1983).

10 Хромогенный анализ. Хромогенные анализы могут быть закуплены коммерчески, такие как Coatest Factor VIII, доступные от Chromogenix AB, Molndal, Sweden.

Отжиг - термин "отжиг" будет использоваться для указания стадии способа лиофилизации фармацевтического препарата, подвергающегося лиофилизации перед 15 сушкой препарата вымораживанием, в котором температуру препарата повышают от более низкой температуры до более высокой температуры, а затем опять охлаждают через некоторый период времени.

Наполнитель - для целей данной заявки наполнители представляют собой такие химические объекты, которые обеспечивают структуру "брикета" или остаточной твердой 20 массы фармацевтического препарата после лиофилизации и которые защищают его от потери устойчивости. Способный к кристаллизации наполнитель будет означать наполнитель, как описано в данной заявке, который может кристаллизоваться во время лиофилизации и отличается от хлорида натрия. HES не включен в данную группу способных к кристаллизации наполнителей.

25 Сублимационная сушка, вымораживание, лиофилизация - "сушка вымораживанием", если не указано другого в контексте, где появляется данный термин, будет использоваться для обозначения части процесса лиофилизации, в котором температуру фармацевтического препарата повышают для удаления воды из препарата. Стадии "вымораживания" способа лиофилизации представляют собой те стадии, которые 30 происходят перед стадией сублимационной сушки. "Ллиофилизация", если не указано другого, будет относиться к способу лиофилизации в целом, включая как стадии вымораживания, так и стадии сублимационной сушки.

Если не указано другого, термин проценты выражает вес/объем проценты, а температура приведена в градусах Цельсия.

35 Компоненты состава

Композиции фактора VIII настоящего изобретения включают наполнители, стабилизирующие агенты, буферные агенты, хлорид натрия, соли кальция и, преимущественно, другие эксципиенты. Данные эксципиенты были выбраны для обеспечения максимума стабильности фактора VIII в лиофилизованных лекарственных 40 препаратах. Однако композиции фактора VIII настоящего изобретения проявляют также стабильность в жидком состоянии.

Наполнители, использованные в настоящих составах, которые образуют кристаллическую часть лиофилизованного продукта (за исключением случая HES), выбирают из группы, состоящей из маннита, глицина, аланина и гидроксипропилкрахмала 45 (HES). Маннит, глицин или аланин присутствуют в количестве 4-10%, предпочтительно 6-9%, и, более предпочтительно, примерно 8%. Когда в качестве наполнителя используют HES, он присутствует в количестве 2-6%, предпочтительно 3-5%, и, более предпочтительно, примерно 4%.

Стабилизирующие агенты, используемые в составах настоящего изобретения, выбирают 50 из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы и аргинина. Данные агенты присутствуют в составах настоящего изобретения в количестве от 1 до 4%, предпочтительно 2-3%, более предпочтительно, примерно 2%. Сорбит и глицерин были оценены как возможные стабилизаторы, но было установлено, что они являются слабыми

стабилизаторами в настоящих составах.

Хлорид натрия включают в настоящие составы в количестве 100-300 мМ, предпочтительно 150-250 мМ, и, наиболее предпочтительно, примерно 225 мМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения может быть использован сам хлорид натрия без каких-либо вышеуказанных наполнителей, в таком случае он будет включен в состав в количестве от 300 мМ до 500 мМ NaCl, предпочтительно от 350 мМ до 450 мМ NaCl, и, более предпочтительно, примерно 400 мМ NaCl.

Кроме того, в данных составах присутствуют буферы, поскольку предполагается, что на молекулу фактора VIII может дополнительно влиять сдвиг pH во время лиофилизации. Предпочтительно, pH следует поддерживать в диапазоне между 6 и 8 во время лиофилизации и, более предпочтительно, pH составляет примерно 7. Буферный агент может представлять собой любой физиологически приемлемый химический объект или сочетание химических объектов, который обладает способностью выступать в виде буфера, включая гистидин, Tris, BIS-Tris Propane, PIPES, MOPS, HEPES, MES и ACES. Полное химическое описание данных буферных агентов перечислено ниже в таблице 1. Обычно, буферный агент включают в концентрации 10-50 мМ. Когда к составам добавляют гистидин, используют концентрации свыше 20 мМ и, предпочтительно, примерно 25 мМ, по отдельности или в сочетании с другими буферами, такими как Tris. Гистидин является особенно предпочтительным для применения в композициях настоящего изобретения, как более подробно описано далее.

Таблица 1

Буферные агенты

Tris	Трис-(гидроксиэтил)аминометан
BIS-Tris Propane	1,3-бис-[трис-(гидроксиэтил)метиламино]пропан
PIPES	пиперазин-N,N'-бис-(2-этансульфоновая кислота)
MOPS	3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота
HEPES	N-2-гидроксиэтил-пиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота
MES	2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
ACES	N-2-ацетиламино-2-аминоэтансульфоновая кислота

Для сохранения активности фактора VIII важно, чтобы составы настоящего изобретения также включали кальций или другой двухвалентный катион, способный взаимодействовать с фактором VIII и поддерживать его активность, предпочтительно, путем поддержания ассоциации тяжелых и легких цепей фактора VIII. Можно использовать от 1 мМ до 5 мМ соли кальция, более предпочтительно, 3-4 мМ и, наиболее предпочтительно, примерно 4 мМ. Соль кальция предпочтительно представляет собой хлорид кальция, но также она может представлять собой другие соли кальция, такие как глюконат кальция, глюбионат кальция или глюцептат кальция.

Композиции фактора VIII настоящего изобретения также предпочтительно включают поверхностно-активное вещество, предпочтительно, в количестве 0,1% или менее и, более предпочтительно, в количестве примерно 0,03%. Поверхностно-активное вещество, например, может быть выбрано из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 80, плюроновых многоатомных спиртов и Brij 35 (лауриловый простой эфир полиоксиэтилена 23). Доступно несколько марок плюроновых многоатомных спиртов (продаваемых под торговым названием Pluronic, производимых BASF Wyandotte Corporation). Данные многоатомные спирты с разнообразными молекулярными массами (от 1000 до свыше 16000) и физико-химическими свойствами используют в качестве поверхностно-активных веществ. Pluronic F-38, с молекулярной массой 5000, и Pluronic F-68, с молекулярной массой 9000, оба содержат (по весу) 80 процентов гидрофильных полиоксиэтиленовых групп и 20 процентов гидрофобных полиоксипропиленовых групп. Однако предпочтительным в настоящих составах является Tween-80, коммерчески доступный полисорбат, в частности Tween-80 растительного происхождения.

Составы фактора VIII настоящего изобретения также, предпочтительно, включают антиоксидант. Было установлено, что добавление антиоксидантов к лиофилизированным

составам изобретения улучшает стабильность таких составов и таким образом увеличивает продолжительность срока хранения. Применяемые антиоксиданты должны быть совместимы для применения с фармацевтическим препаратом и, кроме того, предпочтительно являются водорастворимыми. При добавлении антиоксидантов к составу предпочтительным является добавление таких антиоксидантов как можно позднее перед лиофилизацией, для исключения спонтанного окисления антиоксиданта. Ниже в таблице 2 перечислены подходящие антиоксиданты, являющиеся коммерчески доступными от компаний, таких как Calbiochem и Sigma.

Таблица 2

Антиоксиданты

N-Ацетил-L-Цистеин/Гомоцистеин

Глутатион

6-Гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота (Trolox)

Липоевая кислота

Метионин

Тиосульфат натрия

Платина

Глицин-глицин-гистидин (трипептид)

Бутилированный гидрокситолуол (BHT)

Среди вышеуказанных антиоксидантов глутатион является предпочтительным. Было установлено, что все концентрации в диапазоне от примерно 0,05 мг/мл до более чем 1,0 мг/мл увеличивают стабильность композиций фактора VIII, и предполагается, что более высокие концентрации также могли бы быть полезными (вплоть до момента появления какого-либо токсического действия или неблагоприятного влияния на получение, как, например, снижение температуры стеклования лиофилизованного продукта).

В частности, было установлено, что сочетание гистидина и глутатиона оказывает синергическое благоприятное действие на стабильность композиций фактора VIII. Гистидин, хотя и выступает в качестве буфера, также может действовать в качестве хелатора металла. В той мере, в которой инактивация фактора VIII вызывается металл-индуцированным окислением, гистидин, следовательно, может действовать в качестве стабилизатора фактора VIII путем связывания таких окисляющих ионов металлов. Предполагают, что путем связывания данных металлов глутатион (или фактически любой присутствующий антиоксидант) способен таким образом обеспечивать дополнительную антиоксидантную защиту, так как рассматривается окислительное действие ионов металлов, связанных с гистидином.

Другие хелатирующие агенты также могут использоваться в композициях настоящего изобретения. Такие агенты должны предпочтительно связывать металлы, такие как медь и железо, с большей степенью аффинности, чем кальций, если соль кальция используется в композиции. Один из таких хелаторов представляет собой дефероксамин, хелатирующий агент, который облегчает удаление $A1^{++}$ и железа. Дефероксамин мезилат, $C_{25}H_{48}N_6O_8 \cdot CH_4O_3S$, доступен от Sigma (Sigma Prod.N D9533). Он является хелатором для алюминия и железа(II), который хелатирует железо (в виде 1:1 хелатного комплекса) только в состоянии окисления +3, а не в состоянии окисления +2, и может также связывать ионы марганца и других металлов. Дефероксамин преимущественно может использоваться в количестве 0,25 мг/л.

Фактор VIII, используемый в настоящих составах, может представлять собой либо высоко очищенный, полученный из плазмы крови человека фактор VIII, или, предпочтительно, он может быть рекомбинантно полученным фактором VIII. Рекомбинантный фактор VIII может продуцироваться клетками яичника китайского хомяка (CHO), трансфектированными вектором, несущим ДНК-последовательность, кодирующую молекулу фактора VIII. Способы создания таких трансфектированных CHO клеток описаны, наряду с прочим, в патенте США 4757006, Toole Jr., хотя в данной области также известны альтернативные способы (смотри, например, патент США 4868112, также Toole, Jr., и

публикацию Международной заявки WO-A-91/09122). Способы, используемые для культивирования таких CHO клеток для получения фактора VIII, также известны в данной области, например, описаны в заявке на Европейский патент №0362218, принадлежащей Институту Генетики (Genetics Institute), озаглавленной "Улучшенные способы получения белков типа фактор VIII:C". Рекомбинантный фактор VIII также может продуцироваться другими клеточными линиями, такими как клетки почки новорожденного хомяка (ВНК). Сама молекула фактора VIII при рекомбинантном получении может представлять собой либо фактор VIII полной длины, либо его делецированное производное, такое как молекула фактора VIII с делецией В-домена.

Хотя композиции фактора VIII, описанные в данной заявке, могут быть лиофилизированы и восстановлены в указанных концентрациях, специалисту в данной области будет понятно, что влагосодержание данных препаратов может быть также восстановлено в более разбавленной форме. Например, препарат согласно настоящему изобретению, который лиофилизирован и/или нормально восстановлен по влагосодержанию в 2 мл раствора, также может быть восстановлен в большем объеме разбавителя, таком как 5 мл. Это является особенно подходящим, когда препарат фактора VIII сразу же вводят в виде инъекции пациенту, так как в данном случае менее вероятно, что фактор VIII потеряет активность, что может происходить более быстро в более разбавленных растворах фактора VIII.

Состав (рецептура) и разработка лиофилизации

Для достижения максимальной стабильности композиции фактора VIII настоящего изобретения предпочтительно лиофилизуют. Во время лиофилизации фактор VIII превращают из находящегося в водной фазе до находящегося в аморфной твердой фазе, которая, как полагают, защищает белок от химической и/или конформационной нестабильности. Лиофилизированный препарат не только содержит аморфную фазу, но также включает компонент, который кристаллизуется во время лиофилизации. Это, как предполагается, дает возможность быстрой лиофилизации композиции фактора VIII и образования более изящного брикета (то есть брикета с минимальной усадкой с боковых сторон контейнера, в котором его лиофилизуют). В составах настоящего изобретения стабилизирующие агенты выбраны так, чтобы они существовали в основном в аморфной фазе лиофилизованного продукта, тогда как наполнители (за исключением HES) выбраны так, чтобы они кристаллизовались во время замораживания.

Как фактор VIII, так и стабилизатор предпочтительно диспергированы в аморфной фазе лиофилизованного брикета. Масса стабилизатора также, предпочтительно, в большой степени совместима с другими эксципиентами аморфной формы. Кроме того, видимая температура стеклования (T_g') аморфной фазы, предпочтительно, является относительно высокой во время сушки вымораживанием, а температура стеклования (T_g) твердого вещества является аналогично, предпочтительно, высокой во время хранения. Было установлено, что кристаллизация хлорида натрия в продукте является желательной, так как аморфный хлорид натрия будет снижать T_g' аморфной фазы.

Для того, чтобы избежать потери устойчивости брикета для конкретной композиции, первоначальную сушку предпочтительно осуществляют при температуре продукта ниже видимой температуры стеклования замороженного концентрата. Увеличение времени сушки также может потребоваться для смещения понижения T_g' . Дополнительная информация по лиофилизации может быть найдена в Carpenter J.F. and Chang B.S., *Lyophilization of Protein Pharmaceuticals, Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing and Preservation*, K.E.Avis and V.L.Wu, eds. (Buffalo Grove, IL: Interpharm Press, Inc.), pp.199-264 (1996).

Пример 1

Влияние концентрации фактора VIII и добавления стабилизатора на восстановление фактора VIII были исследованы в нескольких исследованиях. Данные исследования проводили с использованием маннита в качестве модельного наполнителя и сахарозы в качестве модельного стабилизатора. В данных исследованиях использовали составы трех образцов, описанные ниже в таблице 3. Все составы, использованные в данных

исследованиях, включали 10 мМ Tris, 200 мМ NaCl, 8% маннита, 4 мМ CaCl₂ и 0,02% Tween-80 и проводились при pH 7,0.

Таблица 3

5

Идентиф. номер образца	Первоначальное содержание фактора VIII (МЕ/мл)	Сахароза%
IA	600	-
IB	60	-
IC	60	2

10

Данные образцы лиофилизировали с использованием цикла сушки вымораживанием, показанного ниже в таблице 4, для поддержания температуры продукта ниже видимой температуры стеклования (T_g). Исследования с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) указывали на присутствие перехода при приблизительно -40°C в составах, содержащих маннит. Для поддержания температуры продукта ниже данного значения температуру хранения устанавливали на -32°C во время первичной сушки. Первичную сушку в данных условиях осуществляли в течение примерно 55 часов, при общем времени цикла примерно 80 часов.

Таблица 4

20

Способ замораживания/ обработки	Описание
I (вымораживание)	Охлаждение до +5°C; Охлаждение до -5°C со скоростью 1°C/минуту, выдерживание в течение 20 минут; Охлаждение до -20±5°C со скоростью 1°C/минуту, выдерживание в течение 1 часа (вплоть до 3 часов); Охлаждение до -45°C со скоростью 0,5°C/минуту, выдерживание в течение 1 часа.
II	Замораживание посредством способа I. Выдерживание при -35°C в течение 48 часов
III	Замораживание посредством способа I. Выдерживание при -35°C в течение 48 часов
	Выдерживание при -20°C в течение 48 часов
IV (Сушка вымораживанием)	Хранение при -32°C во время первичной сушки в течение примерно 55 часов (вплоть до 100 часов); Продукт <-40°C во время первичной сушки; Линейный подъем от -32°C до +40°C со скоростью 0,2°C/минуту; Хранение при +40°C во время вторичной сушки в течение 3 часов

25

Активность фактора VIII данных образцов, определенную с помощью одностадийного анализа коагулирующей активности крови, сравнивали с контролем, хранившимся при -45°C. Результаты анализа представлены ниже в таблице 5.

Таблица 5

35

Способ обработки	% Потери активности фактора VIII во время каждой стадии		
	Состав IA (600 МЕ/мл)	Состав IB (60 МЕ/мл)	Состав IC (60 МЕ/мл, 2% сахарозы)
I	6,7	37,5	41,7
II	2,0	9,3	3,9
III	7,3	11,6	5,0
IV (лиофилизация)	20,0	24,2	18/3

40

Данные результаты указывают, что концентрация белка оказывает влияние на восстановление фактора VIII во время вымораживания. Составы, содержащие 60 МЕ/мл, теряли приблизительно 37-42% первоначальной активности фактора VIII во время стадии вымораживания, тогда как 6,7% активности фактора VIII было утеряно для состава, содержащего 600 МЕ/мл. Данные результаты указывают, что более высокая концентрация белка оказывает защитное действие во время вымораживания. Хотя сахароза, обеспечивающая некоторую защиту фактора VIII при промежуточной температуре, действует так же, как во время сушки вымораживанием, она не способна защитить белок во время первоначальной стадии вымораживания.

45

Пример 2

50

После разработки способа лиофилизации, охарактеризованного в общих чертах в примере 1, была предпринята дальнейшая оптимизация данного способа. Было установлено, что лиофилизованная композиция, имеющая более высокую температуру стеклования (и, теоретически, лучшую стабильность фактора VIII), может быть получена

путем: (1) понижения температуры вымораживания первоначально до -45°C или ниже (как, например, до примерно -50°C или -55°C); (2) повышения температуры до -20°C или -22°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$); и затем (3) понижения температуры опять до -45°C или ниже. Температуру понижают или повышают, в зависимости от стадии, со скоростью от примерно $0,5^{\circ}\text{C}$ до примерно $1,0^{\circ}\text{C}$ в минуту. По достижении желаемой температуры композицию выдерживают при данной температуре в течение промежутка времени от 1 до 3 часов. Такой усовершенствованный способ вымораживания показан ниже в таблице 6.

Таблица 6

Способ вымораживания	Описание
I	Охлаждение до $+5^{\circ}\text{C}$; Охлаждение до -5°C со скоростью $0,5-1^{\circ}\text{C/минуту}$, выдерживание в течение 20 минут; Охлаждение до температуры от -55°C до -45°C со скоростью $0,5-1^{\circ}\text{C/минуту}$, выдерживание в течение 1 часа; Нагревание до $-22(\pm 5^{\circ}\text{C})$ со скоростью $0,5-1^{\circ}\text{C/минуту}$, выдерживание от 1 до 3 часов; Охлаждение до -45°C со скоростью $0,5-1^{\circ}\text{C/минуту}$, выдерживание в течение примерно 1 часа.

Если не указано другого, указанные температуры, на которые ссылаются в данном примере и других примерах, относятся к температуре лиофилизата, а не к температуре продукта самого по себе. Следуя усовершенствованному циклу вымораживания, оставшаяся часть способа лиофилизации может быть осуществлена, как охарактеризовано выше в примере 1, или по-другому, как дополнительно описано здесь, или как определено специалистом в данной области.

Установлено, что данный усовершенствованный способ лиофилизации может быть использован для составов, которые включают глицин в качестве наполнителя, а также для тех составов, в которых использован маннит. Дополнительно предполагается, что способ также может быть применен для составов, в которых используют другие наполнители настоящего изобретения.

Пример 3

Предполагается, что для получения высушенного сушкой вымораживанием продукта с приемлемым внешним видом брикета и температурой стеклования, для наполнителя лиофилизированных фармацевтических препаратов, содержащих хлорид натрия, такого как глицин или маннит, может потребоваться кристаллизация. Поэтому был разработан следующий усовершенствованный способ лиофилизации для способных к кристаллизации наполнителей.

Таблица 7a

Стадии вымораживания

Стадия способа	Температура	Продолжительность стадии
Первоначальное вымораживание	-40°C или менее	1 час
Первый отжиг	между -23°C и -27°C	3 часа
Второе вымораживание	-55°C	1 час
Второй отжиг	-36°C	4 часа
Третье вымораживание	-50°C	1 час

Таблица 7b

Стадии сушки вымораживанием

Стадия способа	Температура	Продолжительность стадии
Первичная сушка	-35°C	вплоть до 100 часов
Вторичная сушка: первая стадия	40°C	3 часа
Вторичная сушка: вторая стадия	45°C	3 часа
Вторичная сушка: третья стадия	50°C	3 часа

На стадиях вымораживания изменения температуры проходили со скоростью от примерно $0,5^{\circ}\text{C/минуту}$ до 1°C/минуту . Предполагается, что стадии большей продолжительности также были бы эффективны.

Перед первой стадией вымораживания температуру доводят до $2-8^{\circ}\text{C}$ в течение

примерно одного часа с целью доведения всех ампул до приблизительно одной и той же температуры. После этого лиофилизатор охлаждают до -5°C . Первую стадию вымораживания следует осуществлять при температуре ниже -30°C , предпочтительно ниже -35°C , и более предпочтительно при примерно -40°C . В соответствии с этим первую стадию отжига следует проводить при температуре между -30°C и -19°C , более предпочтительно либо между примерно -25°C и -28°C (если глицин является наполнителем), или между -21°C и -24°C (если маннит является наполнителем), при температуре между -23°C и -26°C , являющейся наиболее предпочтительной, предполагается, что при данной температуре кристаллизуется, по крайней мере, частично, наполнитель, способный кристаллизоваться. Однако более низкий диапазон в области -27°C не рекомендуется для составов, содержащих маннит и аргинин. Данную стадию предпочтительно проводят в течение примерно 3 часов.

После первой стадии отжига температуру понижают, предпочтительно, до температуры ниже примерно -50°C и, более предпочтительно, ниже -55°C в течение примерно 1 часа. Предполагают, что хлорид натрия в препарате в это время образует зародыши кристаллов.

Во время второй стадии отжига температуру фармацевтического препарата повышают до температуры между примерно -30°C и -39°C и предпочтительно до примерно -33°C для маннитсодержащих композиций и -36°C для глицинсодержащих композиций. Предполагают, что в это время происходит рост кристаллов NaCl , по крайней мере частично. Данную стадию предпочтительно проводят в течение 4 часов. После этого температуру лиофилизатора снижают до примерно -50°C , предпочтительно, в течение примерно 1 часа для снижения температуры препарата.

В последующих стадиях сушки вымораживанием изменения температуры проводят со скоростью между примерно $0,1^{\circ}\text{C}/\text{минуту}$ и $0,5^{\circ}\text{C}/\text{минуту}$. После снижения давления в лиофилизаторе до примерно 65 мТорр температуру повышают до температуры между примерно от -32°C до -35°C для первичной сушки. При данной температуре кристаллы льда в препарате будут сублимироваться (возгоняться). Данную стадию проводят на протяжении вплоть до 100 часов или до тех пор, пока большая часть льда не сублимируется из препарата. Точка, при которой большая часть льда сублимировалась, может быть определена, например, с использованием индикатора точки росы, который показывает конец сублимации льда, когда показания исчезают (точка перегиба).

После первичной сушки температуру повышают до $+40^{\circ}\text{C}$ предпочтительно со скоростью $0,2^{\circ}\text{C}/\text{минуту}$ для начала вторичной сушки для дальнейшего удаления воды из препарата. Данную температуру предпочтительно поддерживают в течение примерно трех часов. За данной первой стадией следуют вторая и третья стадии вторичной сушки, при которых температуру повышают до примерно $+45^{\circ}\text{C}$ в течение примерно трех часов, а затем до примерно $+50^{\circ}\text{C}$ в течение еще трех часов для удаления влаги в лиофилизованном брикете до уровня менее 2% (вес/вес).

Пример 4

Проводили дополнительные исследования для испытания конкретного действия гистидина на лиофилизованные композиции фактора VIII, содержащие глицин или маннит в качестве наполнителей. Необратимый тепловой поток (модулированный ДСК, мДСК) использовали для обнаружения кристаллизации данных наполнителей во время охлаждения. По эндотерме кристаллизации определяли как температуру кристаллизации, так и общую теплоту кристаллизации. Внешний вид эндотермы NaCl эвтектического расплава во время нагревания использовали для обнаружения кристаллизации NaCl . При мДСК определяли степень кристаллизации, как соотношение энтальпии плавления состава к энтальпии плавления чистого раствора NaCl с использованием общего сигнала теплового потока. Кроме того, проводили рентгеноструктурный дифракционный анализ для определения степени кристаллизации лиофилизованных составов.

В то время как концентрации гистидина менее 20 мМ не оказывали существенного влияния на кристаллизацию глицина, 50 мМ гистидина понижали степень кристаллизации глицина. Экзотермы кристаллизации тонкоизмельченного NaCl не наблюдались во время

охлаждения составов, содержащих глицин. Однако эндотермы эвтектического плавления во время нагревания указывали, что NaCl кристаллизовался (>50%) после охлаждения ниже -50°C и отжига при -30°C, -35°C и -40°C. Включение 50 мМ гистидина в содержащий глицин состав замедляло кристаллизацию NaCl. Поэтому для таких составов время отжига увеличивали в 3 раза для достижения эквивалентной кристалличности.

Однако действие 20 мМ гистидина на кристаллизацию NaCl в содержащих глицин составах было минимальным. При исследованиях лиофильной сушки потеря устойчивости лиофилизованного брикета наблюдалась визуально в содержащих глицин составах, включающих 50 мМ гистидина. Данные рентгеноструктурного диффракционного исследования порошков указывали на уменьшение кристалличности NaCl в образцах, содержащих гистидин. В содержащих маннит составах обычно 83-90% хлорида натрия кристаллизовалось во время охлаждения до температуры между -40°C и -50°C без необходимости в отжиге. В то время как включение 20 мМ гистидина в состав подавляло кристаллизацию NaCl во время охлаждения, отжиг приводил к приблизительно 40%-ной кристаллизации NaCl.

Следовательно, в составах, содержащих способный к кристаллизации наполнитель, такой как глицин или маннит, и NaCl, включение гистидина может снизить степень кристаллизации NaCl. Хотя в некоторых случаях это может привести к потере устойчивости брикета, который образуется во время лиофилизации, применение относительно низких концентраций гистидина в таких составах может ослаблять такое действие. Тем не менее, подходящие брикеты были получены при концентрациях гистидина 35 мМ и 50 мМ. Гистидин также может оказаться предпочтительным перед HEPES в качестве буфера в составах на основе маннита и глицина, поскольку наблюдалось, что применение HEPES понижает T_g' в большей степени, чем аналогичное количество гистидина.

Пример 5

Физические характеристики ряда потенциальных составов фактора VIII, включая семь отобранных стабилизаторов и пять наполнителей, оценивали в другом исследовании. В дополнение к наполнителю и стабилизатору все составы, перечисленные ниже в Таблице 8 (за исключением состава 11), содержали 10 мМ Tris·HCl, 200 мМ NaCl, 0,02% Tween-80, 4 мМ CaCl₂ и имели мМ CaCl₂, также при pH 7,0. Все измерения pH осуществляли при температуре окружающей среды.

Таблица 8

Идентификационный номер образца	Наполнитель	Стабилизатор белка
1	8% маннита	2% сахарозы
2	8% маннита	2% трегалозы
3	8% маннита	2% раффинозы
4	8% маннита	2% аргинина
5	8% маннита	2% лизина
6	8% маннита	2% сорбита
7	8% маннита	2% глицерина
8	4% гидроксиэтилкрахмала	2% сахарозы
9	8% глицина	2% сахарозы
10	8% глицина	2% трегалозы
11	400 мМ NaCl	2% сахарозы
12	8% аланина	2% сахарозы

Измерения температуры потери устойчивости с помощью сублимационной микроскопии и измерения термических переходов с помощью ДСК использовали для предсказания поведения при сушке вымораживанием. Также использовали ДСК, РСА дифракцию порошка и поляризованную световую микроскопию для определения кристалличности лиофилизованных порошков. Также оценивали время восстановления влагосодержания и внешний вид образцов. Результаты всех данных измерений обобщены ниже в таблице 9.

Таблица 9

Образец №	T _{pc} (°C)	T _c (°C)	T _g (°C)	Восстановление влагосодержания (секунды)	Содержание воды (%)	Внешний вид
1	-14	-10	54	64	n/c	изящный
2	-20	-15	53	62	1,4	частичная потеря устойчивости сверху
3	-15	-10	54	77	1,7	изящный
4	-	-	-	-	-	частичная потеря устойчивости
5	-	-	-	-	-	потеря устойчивости
6	n/c	n/c	<10°C*	63	0,6	изящный
7	-	-	<10°C*	-	-	изящный
8	-	-	86	49	0,7	изящный, но сжатый с боковых сторон
9	-	-	54	22	0,8	изящный
10	-	-	63	18	-	изящный
11	-	-	66	11	0,4	изящный (слой на дне)
12	-	-	-	57	0,5	изящный

* Сорбит и глицерин имеют переходы стеклования при <10°C. ДСК сканирующий диапазон не включает температуры в данном интервале;

n/c=не ясно;

T_{pc}=Температура, при которой происходит частичная потеря устойчивости под сублимационным микроскопом;

T_c=Температура, при которой происходит общая потеря устойчивости под сублимационным микроскопом;

T_g=температура стеклования.

За исключением композиции с использованием маннита:лизина оказалось, что все остальные составы имеют адекватный физический вид. Лизин препятствовал кристаллизации в сочетании как с маннитом, так и с глицерином, что вызывало понижение температуры стеклования и потерю устойчивости лиофилизованного брикета.

Пример 6

Композиции фактора VIII, описанные выше в таблице 8, помещали на хранение при -70°C, 25°C, 40°C и 50°C на различные промежутки времени для оценки их стабильности. Уровни активности фактора VIII оценивали через 2 недели, 1 месяц, 2 месяца и 3 месяца, и результаты обобщены ниже в таблице 10. Два образца, один с использованием маннита в качестве наполнителя и сорбита в качестве стабилизатора, а другой с использованием маннита в качестве наполнителя и глицерина в качестве стабилизатора, продемонстрировали низкую стабильность. Все оставшиеся составы продемонстрировали способность стабилизировать фактор VIII.

Таблица 10

Описание состава	Температура (°C)	% от первоначального через количество месяцев				
		0	0,5	1	2	3
Глицин:Сахароза	-70	100,00	97,43	101,71	99,89	97,97
	25	100,00				85,44
	40	100,00		79,87	71,52	63,06
	50	100,00	76,34	67,99	52,14	47,64
Глицин:Трегалоза	-70	100,00	89,22	96,00	95,90	94,64
	25	100,00				83,17
	40	100,00		79,93	72,42	68,03
	50	100,00	80,97	64,28	57,60	50,92
Маннит:Трегалоза	-70	100,00	91,32	97,72	96,10	98,26
	25	100,00				85,79
	40	100,00		82,54	70,72	59,44
	50	100,00	66,16	65,51	48,81	52,06
Маннит:Сахароза	-70	100,00	100,45	100,56	105,47	99,22

RU 2 244 556 C2

	25	100,00				87,04	
	40	100,00		85,59	80,78	55,42	
	50	100,00	81,68	75,53	57,88	43,46	
5	Маннит:Аргинин	-70	100,00	102,26	105,53	103,72	105,08
	25	100,00				95,15	
	40	100,00		91,53	80,93	69,19	
	50	100,00	82,28	68,06	56,32	45,94	
10	Маннит:Раффиноза	-70	100,00	93,88	98,41	100,68	103,62
	25	100,00				83,13	
	40	100,00		81,09	73,61	67,16	
	50	100,00	71,69	68,52	54,25	47,11	
15	Маннит:Глицерин	-70	100,00				
	25	100,00					
	40	100,00					
	50	100,00					
20	Маннит:Сорбит	-70	100,00	104,06			
	25	100,00					
	40	100,00					
25		50	100,00	32,73			
	НЕС:Сахароза	-70	100,00	102,74	103,03	100,90	
	25	100,00					
	40	100,00		76,89	77,47		
30		50	100,00	71,47	67,40	30,02	
	NaCl:Сахароза	-70	100,00	88,54	88,44	95,58	
	25	100,00					
35		40	100,00		71,56	58,30	
		50	100,00	52,71	37,90	30,34	
40	Аланин:Сахароза	-70	100,00	109,78	109,67	108,96	
	25	100,00					
		40	100,00		92,99	73,03	
		50	100,00	83,25	74,91	57,65	
45	Глицин:Раффиноза	-70	100,00	111,57	114,51	105,25	
	25	100,00					
		40	100,00		89,20	82,10	
50		50	100,00	93,21	72,22	53,24	

Пример 7

На основании информации, полученной во время исследований, описанных в примерах 5 и 6, было принято решение, что кандидатом для дальнейшей разработки будут служить

составы, имеющие эксципиенты, представленные ниже в таблице 11.

Таблица 11

5

Эксципиент	Концентрация
Маннит или глицин	6-9%
Аргинин или трегалоза	1-3%
Tween 80	0,005-0,04%
NaCl	200-250 мМ
CaCl ₂	3-5 мМ
TRIS	20-30 мМ
Гистидин или HEPES	10-50 мМ
Глутатион	0,15-0,25 мг/мл

10

На основе данных параметров были разработаны следующие конкретные составы:

15

Состав №1	Состав №2	Состав №3
10 мМ HEPES	10 мМ HEPES	10 мМ HEPES
20 мМ Tris	20 мМ Tris	20 мМ Tris
225 мМ NaCl	225 мМ NaCl	225 мМ NaCl
0,03% (об/об) Tween-80	0,03% (об/об) Tween-80	0,03% (об/об) Tween-80
8% (вес/об) маннита	8% (вес/об) глицина	8% (вес/об) маннита
2% (вес/об) трегалозы	2% (вес/об) трегалозы	2% (вес/об) аргинина
0,2 мг/мл ограниченного глутатиона	0,2 мг/мл ограниченного глутатиона	0,2 мг/мл ограниченного глутатиона
4 мМ CaCl ₂	4 мМ CaCl ₂	4 мМ CaCl ₂

20

25

Состав №4	Состав №5
25 мМ гистидина	25 мМ гистидина
20 мМ Tris	20 мМ Tris
225 мМ NaCl	225 мМ NaCl
0,03% (об/об) Tween-80	0,03% (об/об) Tween-80
8% (вес/об) маннита	8% (вес/об) глицина
2% (вес/об) трегалозы	2% (вес/об) трегалозы
0,2 мг/мл ограниченного глутатиона	0,2 мг/мл ограниченного глутатиона
4 мМ CaCl ₂	4 мМ CaCl ₂

30

Формула изобретения

35

1. Композиция фактора VIII, составленная без добавления альбумина к указанной композиции, включающая следующие эксципиенты рецептуры в дополнение к фактору VIII: 4 - 10% наполнителя, выбранного из группы, состоящей из маннита, глицина и аланина; 1 - 4% стабилизирующего агента, выбранного из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина; 1 - 5 мМ соли кальция; 100 - 300 мМ NaCl, и буферный агент для поддержания pH в интервале приблизительно 6 - 8.

40

2. Композиция фактора VIII по п.1, дополнительно включающая поверхностно-активное вещество.

3. Композиция фактора VIII по п.2, где указанное поверхностно-активное вещество выбирают из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 80, Pluronic F68 или Brij35.

45

4. Композиция фактора VIII по п.3, где указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 и где указанный полисорбат 80 присутствует в количестве менее 0,1%.

5. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-4, где указанное поверхностно-активное вещество присутствует в количестве примерно 0,03%.

50

6. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-5, где указанный буферный агент выбирают из группы, состоящей из Tris, BIS-Tris Propane, гистидина, PIPES, MOPS, HEPES, MES и ACES.

7. Композиция фактора VIII по п.6, где указанный буферный агент представляет собой Tris.

8. Композиция фактора VIII по п.7, где Tris присутствует в количестве примерно 20 мМ.

9. Композиция фактора VIII по п.6, где указанный буферный агент включает от примерно 10 - 50 мМ гистидина.

10. Композиция фактора VIII по п.9, где гистидин присутствует в количестве, составляющем примерно 25 мМ.

11. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-10, дополнительно включающая антиоксидант.

12. Композиция фактора VIII по п.11, где указанный антиоксидант представляет собой глутатион.

13. Композиция фактора VIII по п.12, где указанный глутатион присутствует в количестве от примерно 0,05 - 1,0 мг/мл.

14. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-13, где указанный наполнитель присутствует в количестве примерно 8%.

15. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-14, где указанный наполнитель представляет собой маннит.

16. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-14, где указанный наполнитель представляет собой глицин.

17. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-16, где указанный стабилизирующий агент присутствует в количестве примерно 2%.

18. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-17, где указанный стабилизирующий агент представляет собой сахарозу.

19. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-17, где указанный стабилизирующий агент представляет собой аргинин.

20. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-17, где указанный стабилизирующий агент представляет собой трегалозу.

21. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-20, где указанный NaCl присутствует в количестве примерно 200 мМ - 250 мМ.

22. Композиция фактора VIII по п.21, где указанный NaCl присутствует в количестве примерно 225 мМ.

23. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-22, где указанная соль кальция представляет собой хлорид кальция.

24. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-23, где указанная композиция находится в лиофилизованной форме.

25. Композиция фактора VIII, составленная без добавления альбумина к указанной композиции, включающая следующие эксципиенты рецептуры в дополнение к фактору VIII: 2 - 6% гидроксиэтилкрахмала; 1 - 4% стабилизирующего агента, выбранного из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина; 1 - 5 мМ соли кальция; 100 - 300 мМ NaCl, и буферный агент для поддержания pH в интервале приблизительно 6 - 8.

26. Композиция фактора VIII по п.25, включающая примерно 4% гидроксиэтилкрахмала.

27. Композиция фактора VIII по любому из пп.25 и 26, включающая примерно 200 мМ NaCl.

28. Композиция фактора VIII по любому из пп.25-27, где указанный стабилизирующий агент присутствует в количестве примерно 2%.

29. Композиция фактора VIII по любому из пп.25-28, где указанный стабилизирующий агент представляет собой сахарозу.

30. Композиция фактора VIII по любому из пп.25-28, где указанный стабилизирующий агент представляет собой аргинин.

31. Композиция фактора VIII по любому из пп.25-28, где указанный стабилизирующий агент представляет собой трегалозу.

32. Композиция фактора VIII, составленная без добавления альбумина к указанной композиции, включающая следующие эксципиенты рецептуры в дополнение к фактору VIII: 300 - 500 мМ NaCl; 1 - 48% стабилизирующего агента, выбранного из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина; 1 - 5 мМ соли кальция; буферный агент для

поддержания рН в интервале приблизительно 6 - 8.

33. Композиция по п.32, где NaCl присутствует в количестве примерно 400 мМ.

34. Композиция фактора VIII по любому из пп.1-33, для лечения гемофилии.

5 35. Способ лиофилизации водной композиции фактора VIII, содержащей кристаллизуемый наполнитель и NaCl, где указанный способ включает стадии:

(a) замораживания водного фармацевтического состава при температуре менее примерно -35°C ;

(b) отжига фармацевтического состава при температуре в интервале между примерно -30°C и -19°C ;

10 (c) понижения температуры фармацевтического состава до менее чем примерно -50°C ;

(d) отжига фармацевтического состава при температуре в интервале между примерно -30°C и -39°C ; и затем

(e) сушки вымораживанием фармацевтического состава.

Приоритет по пунктам:

15 22.02.1999 - по пп.1-7, 11, 12, 14-35;

01.12.1999 - по пп.8, 9, 10, 13.

20

25

30

35

40

45

50