



⑫ A Terinzagelegging ⑪ 8601355

Nederland

⑲ NL

- 
- ⑤4 Nieuwe samenstelling.
- ⑤1 Int.Cl.: A61K37/465, C12N9/48, C07K15/12.
- ⑦1 Aanvrager: The Wellcome Foundation Limited te Londen, Groot-Brittannië.
- ⑦4 Gem.: Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s.  
Vereenigde Octroobureaux  
Nieuwe Parklaan 107  
2587 BP 's-Gravenhage.

- 
- ②1 Aanvraag Nr. 8601355.
- ②2 Ingediend 27 mei 1986.
- ③2 Voorrang vanaf 28 mei 1985, 31 augustus 1985.
- ③3 Land van voorrang: Groot-Brittannië (GB).
- ③1 Nummers van de voorrangsaanvragen: 8513358, 8521705.
- ⑥2 --

- 
- ④3 Ter inzage gelegd 16 december 1986.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

---

VO 8205

Nieuwe samenstelling.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op weefselplasminogeenactivator en in het bijzonder op farmaceutische samenstellingen die weefselplasminogeenactivator bevatten, hun bereiding, en hun gebruik in de mens- en diergeneeskunde.

5 Men meent dat er een dynamisch evenwicht bestaat tussen het enzymstelsel dat bloedstolsels kan vormen - het coagulatiesysteem - en het enzymstelsel dat bloedstolsels kan oplossen - het fibrinolytische systeem - dat een intact voortreffelijk vaatbed in stand houdt. Om bloedverlies bij beschadigingen te beperken, worden in de beschadigde vaten  
10 bloedstolsels gevormd. Na natuurlijke reparatie van de schade, worden de overbodige bloedstolsels opgelost door de werking van het fibrinolytische systeem. Soms vormen bloedstolsels zich zonder traumatische schade en blijven ze zitten in belangrijke bloedvaten, hetgeen resulteert in een gedeeltelijke of zelfs totale obstructie van de bloedstroming. Wanneer  
15 dit in het hart, de longen of hersenen gebeurt, kan het resultaat een myocardiaal infarct, longembolie of beroerte zijn. Deze condities zijn in combinatie de belangrijkste oorzaak voor ziekte en sterfte in de ge-industrialiseerde landen.

Bloedstolsels bestaan uit een vezelhoudend netwerk dat door het  
20 proteolytische enzym plasmine kan worden opgelost. Het enzym is afgeleid van het inactieve pro-enzym, plasminogeen, een component van bloedplasma, door de werking van een plasminogeenactivator. Er zijn twee immunologisch verschillende plasminogeenactivatoren bij zoogdieren. Intrinsieke plasminogeenactivator, ook bekend als urokinase, is een enzym dat door  
25 de nieren wordt geproduceerd en uit urine kan worden geïsoleerd. Het kan ook uit een aantal weefselkweekbronnen worden bereid. Extrinsieke plasminogeenactivator, ook bekend als vaatplasminogeenactivator en als weefselplasminogeenactivator (t-PA), kan uit vele weefselhomogenaten (met name humane uterus), de vaatcelwand en uit enkele celkweken worden  
30 geïsoleerd. Behalve deze twee soorten plasminogeenactivator is er ook een bacterieel produkt, streptokinase, bereid uit  $\beta$ -haemolytische streptococci. Een belangrijk nadeel van zowel urokinase als streptokinase is dat ze in de hele bloedsomloop actief zijn en niet alleen op de plaats van een bloedstolsel. Ze kunnen bijvoorbeeld andere bloed-  
35 eiwitten zoals fibrinogeen, prothrombine, factor V, en factor VIII ver-

8601355

nietigen waardoor het vermogen van bloedstolling wordt verminderd en het risico van bloedingen wordt vergroot. Daarentegen is de biologische werkzaamheid van t-PA afhankelijk van de aanwezigheid van fibrine waaraan het bindt en waar het wordt geactiveerd. Maximale activiteit wordt derhalve  
5 alleen ontwikkeld op de plaats van een bloedstolsel, dat wil zeggen in tegenwoordigheid van het fibrine netwerk dat moet worden opgelost, en hierdoor wordt het risico van bloedingen in hoge mate vermeden.

De belangrijkste toedieningsroute van t-PA is door intravasculaire infusie, hetgeen vereist dat de t-PA bevattende samenstelling een paren-  
10 terale oplossing is. In het geval van een eiwit heeft het de voorkeur dat het geneesmiddel aan de arts of diergeneeskundige wordt gepresenteerd in de vorm van een gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling, vanwege zijn significante transport- en bewaarvoordelen ten opzichte van een vloeibare samenstelling. Het is echter belangrijk dat een dergelijke  
15 gelyofiliseerde samenstelling gemakkelijk kan worden omgezet in de gewenste parenterale oplossing zonder al te veel ongemakken en moeilijkheden en dat de arts of diergeneeskundige de vereiste geneesmiddelconcentratie in elke gegeven situatie eenvoudig kan bereiken door reconstitutie van de samenstelling in de gepaste hoeveelheid oplosmiddel. Het is  
20 bijvoorbeeld niet raadzaam om een grote volumehoeveelheid oplossing aan een patiënt met een hart- of nierprobleem toe te dienen omdat daardoor het hart of de nieren onder nog grotere spanning zouden komen te staan. De volumehoeveelheid moet daarom onder dergelijke omstandigheden op een minimum worden gehouden. Het is derhalve gewenst dat een parenterale op-  
25 lossing niet alleen met een relatief lage concentratie maar ook met een hoge concentratie van het geneesmiddel kan worden verkregen.

Een aantal gelyofiliseerde farmaceutische samenstellingen van t-PA zijn beschreven in EP-A-113 319 en EP-A-123 304. De samenstellingen worden bereid uit waterige zoutoplossingen van t-PA, waarin de pH  
30 ongeveer neutraal is, en hebben het nadeel dat de oplosbaarheid van t-PA in dergelijke oplossingen laag is in afwezigheid van een toename in de ionconcentratie. Daardoor bevatten de uit dergelijke gelyofiliseerde samenstellingen verkregen parenterale oplossingen lage t-PA concen-  
35 traties, zodat in sommige situaties de toediening van ongewenst grote volumehoeveelheden oplossing aan een patiënt nodig is, of zijn de samenstellingen hypertoonisch, hetgeen bij toediening voor de rode bloedcellen schadelijk kan zijn.

Thans is gevonden, dat de oplosbaarheid van t-PA in een waterige oplossing kan worden verbeterd wanneer de pH van de oplossing binnen een zuur gebied is gelegen, dat een gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling kan worden bereid uit een zure oplossing van t-PA, en dat de  
5 samenstelling een parenterale oplossing kan geven die bij toediening geen significante fysiologische problemen scheidt. Derhalve verschaft de onderhavige uitvinding een werkwijze voor het bereiden van een gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling van t-PA, omvattende het vacuüm drogen van een ingevroren waterige oplossing van t-PA, waarin de  
10 pH 2 - 5 is.

Als gevolg van de betere oplosbaarheid van t-PA, kan een gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling volgens de onderhavige uitvinding worden bereid die een parenterale oplossing kan geven welke een hoge t-PA concentratie bevat zonder dat een groot gevaar bestaat voor een  
15 uit de oplossing neerslaan van t-PA. De gelyofiliseerde samenstelling kan derhalve aan artsen of diergeneeskundigen worden gepresenteerd die de samenstelling op de gewenste wijze en tijd kunnen oplossen tot de gewenste concentratie, waarbij bijvoorbeeld water met een neutrale of zure pH wordt gebruikt. De onderhavige uitvinding verschaft derhalve een sta-  
20 biele gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling die een grotere flexibiliteit creëert in zijn hantering en gebruik door artsen en diergeneeskundigen, en tevens voorziet in een gemakkelijker wijze van transport en opslag.

Het volgens de onderhavige uitvinding te gebruiken t-PA kan  
25 elk bioactief eiwit zijn dat in essentie overeenstemt met t-PA van zoogdieren, in het bijzonder de mens, en omvat vormen met en zonder glycosylering. Het kan uit één of uit twee ketens bestaand t-PA zijn, of een mengsel daarvan, zoals beschreven in EP-A-112 122, en heeft in het geval van volledig geglycosyleerd humaan t-PA een schijnbaar molecuul-  
30 gewicht op polyacrylamidegels van ongeveer 70.000 en een isoëlektrisch punt tussen 7,5 en 8,0. Bij voorkeur heeft het t-PA een specifieke activiteit van ongeveer 500.000 IU/mg (Internationale eenheden/mg, waarbij de internationale eenheid een activiteitseenheid is zoals gedefinieerd door WHO, National Institute for Biological Standards and  
35 Control, Holly Hill, Hampstead, London, NW3 6 RB, U.K.).

8601355

De aminozuurvolgorde van t-PA correspondeert bij voorkeur in hoge mate met de in fig. 1 vermelde aminozuurvolgorde. De volgorde is derhalve identiek aan die in fig. 1 of bevat één of meerdere aminozuurdeleties, substituties, invoegingen, omkeringen of toevoegingen van 5 allel oorsprong of anderszins, waarbij de resulterende volgorde ten minste 80 % en bij voorkeur 90 % homologie heeft met de volgorde in fig. 1 en in essentie dezelfde biologische en immunologische eigenschappen van het eiwit behoudt. In het bijzonder is de t-PA volgorde identiek aan die in fig. 1 of heeft het dezelfde volgorde maar met 10 dien verstande dat het aminozuur op de 245ste positie vanaf de serine N-terminus valine is in plaats van methionine, waarbij elke volgorde desgewenst één of meer van de eerste drie aminozuren mist of desgewenst een aditionele polypeptide N-terminale voorsequentie van Gly-Ala-Arg heeft.

15 De in fig. 1 getoonde aminozuurvolgorde heeft 35 cysteine-residuen en daardoor het potentieel om 17 disulfide bruggen te vormen. Gebaseerd op analogie met andere eiwitten waarvan de structuur in groter detail is bepaald, is de gepostuleerde structuur voor de volgorde (volgens uit de vorming van disulfide banden) tussen het aminozuur op de 20 90ste positie en de proline C-terminus in fig. 2 getoond. De structuur van het N-terminale gebied is minder zeker hoewel daarvoor enkele voorstellen zijn gedaan (Progress in Fibrinolysis, 1983, 6, 269 - 273; and Proc. Natl. Acad. Sci., 1984, 81, 5355 - 5359). De belangrijkste kenmerken van de structuur van t-PA zijn de twee kringel-gebieden (tussen 25 de 92ste en 173ste aminozuren en tussen de 180ste en 261ste aminozuren), die verantwoordelijk zijn voor de binding van het eiwit aan fibrine, en het serine protease gebied, dat het belangrijkste deel van de B-keten omvat en verantwoordelijk is voor de activering van plasminogeen. De aminozuren van bijzonder belang in serine proteases zijn de katalytische triade His/Asp/Ser. In t-PA treden deze op op de 322ste, 371ste 30 en de 463ste posities. De disulfide brug tussen de 264ste en 395ste cysteine aminozuur residuen is ook belangrijk doordat deze de A en B-ketens bij elkaar houdt in de uit twee ketens bestaande vorm van t-PA.

In de figuren 1 en 2 zijn de conventionele één en drie letter- 35 codes gebruikt voor de aminozuur residuen, welke code als volgt is:

8601355

Asp	D	Aspartinezuur	Ile	I	Isoleucine
Thr	T	Threonine	Leu	L	Leucine
Ser	S	Serine	Tyr	Y	Tyrosine
Glu	E	Glutaminezuur	Phe	F	Phenylalanine
5 Pro	P	Proline	His	H	Histidine
Gly	G	Glycine	Lys	K	Lysine
Ala	A	Alanine	Arg	R	Arginine
Cys	C	Cysteine	Trp	W	Tryptofaan
Val	V	Valine	Gln	Q	Glutamine
10 Met	M	Methionine	Asn	N	Asparagine

Het t-PA kan worden verkregen volgens elk van de eerder beschreven of bekende procedures. Het kan bijvoorbeeld worden verkregen uit een normale of neoplastische cellijn van de soort, beschreven in Biochimica et Biophysica Acta, 1979, 580, 140-153; EP-A-41 766 of EP-A-113 319. De voorkeur heeft echter dat t-PA verkregen is van een gekweekte getransformeerde of getransfecteerde cellijn, afgeleid met behulp van recombinant DNA technologie zoals beschreven in bijvoorbeeld EP-A 93 619; EP-A-117 059 of EP-A-117 060. Het heeft bijzondere voorkeur dat Chinese hamsterovarium (CHO) cellen gebruikt worden voor de productie van t-PA en afgeleid zijn op de wijze, beschreven in Molecular and Cellular Biology, 1985, 5(7), 1750-1759. Op deze wijze wordt het geclo-  
neerde gen samen met het gen dat codeert voor dihydrofolaat reductase (dhfr) getransfecteerd in dhfr<sup>-</sup> CHO cellen. Transformanten waarin dhfr tot expressie komt, worden geselecteerd op media die nucleosiden missen en worden blootgesteld aan toenemende concentraties methotrexaat. De dhfr en t-PA genen worden aldus samen geamplificeerd hetgeen leidt tot een stabiele cellijn die in staat is tot een sterke expressie van t-PA.

Het t-PA wordt bij voorkeur gezuiverd onder toepassing van één van de eerder beschreven of bekende procedures, zoals de procedures beschreven in Biochimica et Biophysica Acta, 1979, 580, 140-153; J. Biol. Chem., 1979, 254(6), 1998-2003; ibid, 1981, 256(13), 7035-7041; Eur. J. Biochem., 1983, 132, 681-686; EP-A-41 766; EP-A-113 319 of GB-A-2 122 219.

Er lijkt geen bovengrens te bestaan voor de oplosbaarheid van

8801355

t-PA in de waterige oplossing die in de werkwijze volgens de uitvinding wordt gebruikt. Bij zeer hoge concentraties, zoals boven 150.000.000 IU/ml (Internationale eenheden/ml), wordt de oplossing alleen visceus zonder dat enige significante precipitatie van het t-PA optreedt. De concentratie van t-PA in de waterige oplossing kan derhalve binnen ruime grenzen variëren, bijvoorbeeld van 50.000 tot 50.000.000 IU/ml. Om een maximaal profijt van de onderhavige uitvinding te verzekeren, heeft het de voorkeur dat de concentratie van t-PA groter is dan 100.000 IU/ml, meer in het bijzonder groter dan 500.000 IU/ml, en liefst groter dan 1.000.000 IU/ml. De grootste voorkeur heeft dat de t-PA concentratie ongeveer 5.000.000 IU/ml bedraagt.

De bovengrens voor de pH van de waterige oplossing is bij voorkeur 4,5. In fiete ligt de pH bij voorkeur in een bereik van 2,5 tot 4,0, liever dan 2,8 tot 3,5, en liefst ongeveer 3,0. De gewenste pH van de waterige oplossing wordt op een geschikte wijze verkregen door een fysiologisch aanvaardbaar anorganisch of organisch zuur te gebruiken. Voorbeelden van een dergelijk zuur zijn zoutzuur, zwavelzuur en salpeterzuur, alsmede citroenzuur, wijnsteenzuur en benzeensulfonzuur. Van deze voorbeelden heeft zoutzuur de voorkeur.

Hoewel behalve water desgewenst een fysiologisch aanvaardbaar co-solvent aanwezig kan zijn, heeft het de voorkeur dat het medium voor de waterige oplossing geheel of nagenoeg volledig op waterbasis is.

De parenterale oplossing, verkregen uit de gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling, kan hypertonisch, hypotonisch of isotonisch zijn met het bloedserum van de patiënt. Om ongewenste neveneffecten te vermijden is de parenterale oplossing echter bij voorkeur isotonisch, hoewel ondergeschikte afwijkingen niet van grote fysiologische betekenis zijn. Een in hoge mate isotonische parenterale oplossing kan worden verkregen door een fysiologisch aanvaardbaar middel op te nemen dat de toniciteit van de oplossing tot het vereiste niveau kan verhogen. Het middel kan in de te vriesdrogen waterige oplossing worden opgenomen zodat het reeds in de gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling aanwezig is, of kan worden opgenomen in het water met neutrale of zure pH, dat gebruikt wordt voor het oplossen van de samenstelling om de gewenste parenterale oplossing te verkrijgen. Voorbeelden van een dergelijk middel zijn op zichzelf bekend en omvatten dextrose (in watervrije of monohydraatvorm) en natriumchloride en mengsels daarvan. De concentratie

van het middel in de waterige oplossing of in het oploswater zal natuurlijk van middel tot middel variëren. In het geval van natriumchloride is de concentratie bij voorkeur 7 - 10 mg/ml, en liefst ongeveer 8,5 mg/ml, welke concentratie vaak wordt aangeduid als een fysiologische zoutoplossing of alleen maar fysiologisch zout. In het geval van water-vrije dextrose is de concentratie bij voorkeur 30 tot 70 mg/ml, liefst ongeveer 50 mg/ml.

De waterige oplossing kan desgewenst normaliter aan gelyofiliseerde farmaceutische samenstellingen van dit type verbonden additieven bevatten. Voorbeelden omvatten humaan serum albumine en bindmiddelen en vulstoffen zoals mannitol, lactose en glucose. Bovendien heeft t-PA neiging om te adsorberen aan glazen en kunststoffen oppervlakken en het kan daarom gewenst zijn om een oppervlakte-actief middel in de waterige oplossing op te nemen om een dergelijke adsorptie te verhinderen of tot een minimum te beperken. Voorbeelden van een dergelijk middel omvatten polyoxyëthyleen derivaten van partiële vetzuuresters van sorbitol-anhydriden, zoals die welke in de handel zijn onder de naam "Tween 80".

Eén van de verrassende voordelen van de onderhavige uitvinding, afgezien nog van de aanzienlijk verhoogde oplosbaarheid van t-PA, is dat het gebruik van een zure parenterale oplossing, verkregen door reconstitutie van de gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling, geen significante nadelige fysiologische effecten blijkt te hebben op de toediening aan de patiënt. Men zou verwachten dat de bloedstroom in het algemeen in staat is om de pH van de oplossing bijna zondra contact wordt gemaakt tot de neutrale waarde te verhogen, waarbij het t-PA snel in de bloedstroom wordt verdeeld. Het heeft echter de voorkeur dat dit proces niet wezenlijk op wat voor manier dan ook wordt belemmerd en dat de parenterale oplossing en dus de te vriesdrogen waterige oplossing en het voor reconstitutie gebruikte water geen sterk buffermiddel bevatten. Evenwel kan een zwak buffermiddel dat dit proces niet in significante mate belemmert, worden opgenomen en bij zure pH blijkt t-PA zelf als zijn eigen zwakke buffermiddel te werken. Bovendien kan humaan serum albumine als een zwak buffermiddel fungeren.

Vanwege de sterk verhoogde oplosbaarheid van t-PA in een waterige oplossing waarin de pH 2 - 5 is, is het niet nodig dat in de door reconstitutie van de gelyofiliseerde samenstelling verkregen parenterale oplossing additionele materialen zoals lysine of ornithine of

8601355



zouten daarvan worden opgenomen om de oplosbaarheid van t-PA te vergroten.

De waterige t-PA oplossing kan worden bereid door het verkrijgen van een oplossing van gezuiverd t-PA en het uitwisselen van het medium voor een waterig medium met een pH van 2 - 5; of door het oplossen van gezuiverd t-PA in een waterig medium met een pH van 2 - 5.

De zuivering van t-PA kan als laatste stap de elutie van het eiwit uit een chromatografische kolom omvatten als een oplossing die een sterk buffermiddel bevat. Zoals eerder vermeld heeft het de voorkeur dat de parenterale oplossing en dus de gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling en waterige oplossing, geen sterk buffermiddel bevat en daarom is een geschikt middel om zijn verwijdering te realiseren onder uitwisseling van het medium, het gebruik van dialyse. Dit kan worden uitgevoerd door dialyseslangen of een kunstnier te gebruiken waarin de gezuiverde oplossing wordt gedialyseerd tegen een waterig medium waarin de pH 2 - 5 is. In het bijzonder wanneer de t-PA concentratie in de gezuiverde oplossing hoog is, kan het gewenst zijn om eerst de pH van de oplossing zodanig in te stellen dat deze 2 - 5 bedraagt. Een ander middel om de verwijdering van een sterk buffermiddel te realiseren terwijl het medium wordt uitgewisseld, is het onderwerpen van de gezuiverde oplossing aan gelfiltratie en het ontwikkelen van de kolom met een waterig medium waarin de pH 2 - 5 is.

t-PA in de vorm van een neergeslagen vaste stof kan bij voorkeur worden verkregen uit een gezuiverde oplossing door de pH op ongeveer 5,5 in te stellen, de oplossing af te koelen tot net boven het vriespunt, en het eiwit te winnen door bijvoorbeeld centrifugeren. De neergeslagen vaste stof kan vervolgens worden opgelost in een waterig medium met een pH van 2 - 5 op een conventionele wijze.

Het heeft de voorkeur dat de verkregen waterige oplossing op conventionele wijze, bijvoorbeeld door filtersterilisatie, wordt gesteriliseerd, en dat hij vervolgens wordt gebracht in steriele, kunststoffen of glazen houders, zoals ampullen of flesjes in volumehoeveelheden van bijvoorbeeld 0,5 tot 20 ml.

De waterige oplossing van t-PA wordt bij voorkeur bij een temperatuur van -10 - -40°C ingevroren. De ingevroren waterige oplossing wordt daarna bij voorkeur op deze temperatuur gehouden tot dat het vacuüm

drogen is begonnen.

Vacuüm drogen van de ingevroren waterige oplossing kan op conventionele wijze worden uitgevoerd en omvat drogen onder een partieel of volledig vacuüm, bijvoorbeeld bij een druk van 0,01 - 0,1 Torr, gedurende een voldoende tijd om verwijdering van nagenoeg alle ingevroren vloeistof te bewerken.

De temperatuur waarbij het vacuüm drogen wordt uitgevoerd, bedraagt gewoonlijk -30 - -40°C aan het begin van het proces om de waterige oplossing in een hoofdzakelijk of volledig ingevroren vorm te houden. Naarmate het proces voortschrijdt en het water wordt verwijderd, kan de temperatuur geleidelijk worden verhoogd totdat hij kamertemperatuur bereikt. Het heeft de voorkeur dat het vacuüm drogen aan het einde van het proces wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur of net daar boven onder een sterk vacuüm van ongeveer 0,01 Torr om zoveel mogelijk van de laatste sporen water te verwijderen. Het vochtgehalte van de resulterende gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling is bij voorkeur lager dan 2,5 %. Wanneer het vacuüm drogen eenmaal is voltooid, wordt de steriele, kunststoffen of glazen houder die de gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling bevat, daarna op een gepaste wijze gesloten.

Tijdens het vacuüm drogen van de ingevroren waterige oplossing wordt het water verwijderd waarbij het t-PA achterblijft in de vorm van een fysiologisch aanvaardbaar zout. Derhalve verschaft de onderhavige uitvinding ook een fysiologisch aanvaardbaar zout, in het bijzonder een fysiologisch aanvaardbaar zuur additiezout, zoals het hydrochloridezout, van t-PA.

Het gebruik van de onderhavige uitvinding maakt voor het eerst mogelijk dat een gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling wordt verkregen die een parenterale oplossing met een hoge concentratie t-PA kan leveren. Derhalve verschaft de onderhavige uitvinding ook een gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling van t-PA, die bij oplossen in water een t-PA concentratie kan geven van meer dan 100.000 IU/ml, meer in het bijzonder groter dan 500.000 IU/ml, en liefst groter dan 1.000.000 IU/ml.

Om een parenterale oplossing van t-PA voor toediening te bereiden, wordt de volgens de onderhavige werkwijze verkregen gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling gereconstitueerd in water met een neutrale of zure pH. Wanneer de waterige oplossing waaruit de gelyofiliseerde farma-

8601355

ceutische samenstelling werd verkregen, in hoge mate isotonisch is, heeft het de voorkeur dat het voor reconstitutie gebruikte water eveneens in hoge mate isotonisch is.

De biologische activiteit van t-PA in het oplossen van het fi-  
5 brine-netwerk van bloedstolsels heeft geleid tot zijn bruikbaarheid in de behandeling van trombosekwalen (The Lancet, 7 November 1981, 1018-1020; ibid, 13 April 1985, 842-847; The New England Journal of Medicine, 1984 310(10), 609-613; en ibid., 1985, 312(14), 932-936). De onderhavige uitvinding verschaft derhalve een methode voor het behandelen van een  
10 trombosekwaal in een zoogdier, omvattende de toediening aan het zoogdier van een parenterale oplossing van t-PA verkregen uit een gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling zoals hierin gedefinieerd. Verder wordt ook een gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling van t-PA verschaft, zoals hierin gedefinieerd, voor gebruik in de humane of diergeneeskunde,  
15 in het bijzonder voor gebruik in de behandeling van een trombosekwaal.

Bijzondere voorbeelden van trombosekwalen zijn op zichzelf bekend en omvatten myocardiaal infarct, diepe adertrombose, longembolie en beroerte.

De hoofdtoedieningsroute van t-PA is door intravasculaire, in het  
20 bijzonder intraveneuze infusie hoewel mogelijk andere toedieningsrouten zoals intramusculaire toediening kunnen worden toegepast. Intravasculaire infusies worden normaliter uitgevoerd met de parenterale oplossing in een infusiezak of fles of binnen een elektrisch bestuurd infusie-  
naald. De oplossing kan uit de infusiezak of fles aan de patiënt worden  
25 afgegeven door zwaartekrachttoevoer of door gebruik te maken van een infusiepomp. Het gebruik van zwaartekrachttoevoer infusiesystemen geeft niet voldoende controle over de toedieningssnelheid van de parenterale oplossing en daarom heeft het gebruik van een infusiepomp de voorkeur, in het bijzonder met oplossingen die betrekkelijk hoge concentraties  
30 t-PA bevatten. Grotere voorkeur heeft echter het gebruik van een elektrisch bestuurd infusie-naald die een nog grotere controle over de toedieningssnelheid biedt.

De voor het behandelen van een zoogdier met een trombosekwaal effectieve hoeveelheid t-PA zal natuurlijk afhangen van een aantal  
35 factoren waaronder bijvoorbeeld de leeftijd en het gewicht van het zoogdier, de precieze conditie die behandeling vereist en de ernst daarvan, de toedieningsroute, en zal uiteindelijk onder de verantwoordelijkheid

van de desbetreffende arts of diergeneeskundige vallen. Het is echter waarschijnlijk dat een effectieve hoeveelheid voor lysis van een coronaire slagadertrombus bijvoorbeeld in het algemeen in een bereik van 150.000 tot 450.000 IU/kg lichaamsgewicht van de patiënt per uur zal 5 bedragen. Voor een volwassen mens van 70 kg zal derhalve een effectieve hoeveelheid per uur in het algemeen 10.000.000 tot 30.000.000 IU, in het bijzonder ongeveer 20.000.000 IU bedragen, en deze hoeveelheid kan met of zonder een voorbehandelingsdosis worden toegediend. Het is ook waarschijnlijk dat de dosering voor sommige trombosecondities geringer 10 zal zijn, bijvoorbeeld voor diepe adertrombose en acute beroerte, of voor het eenvoudig in puike conditie houden van een reeds opnieuw doorstroombaar gemaakte coronair slagader. In deze situaties zal een effectieve hoeveelheid in het algemeen 7.000 tot 36.000 IU/kg lichaamsgewicht van de patiënt per uur zijn.

15 De volgende voorbeelden worden gegeven ter toelichting van de onderhavige uitvinding en dienen niet zodanig te worden uitgelegd dat ze de uitvinding beperken.

#### Voorbeeld I

· Een geklaarde oogst van t-PA, verkregen uit een gekweekte ge- 20 transformeerde CHO-cel lijn die afgeleid was onder toepassing van de procedure volgens Molecular and Cellular Biology, 1985, 5(7), 1750-1759, werd chromatografisch gezuiverd en het t-PA werd verzameld als een waterige oplossing die 0,17 M natriumcitraat en 0,01 % (w/v) Tween 80 bevatte, bij een pH van 5,5. De pH van de oplossing werd met zoutzuur in- 25 gesteld op 3,0 en de verkregen oplossing werd door ultrafiltratie geconcentreerd onder toepassing van een H-10 Cartridge (Amicon Ltd., Upper Hill, Stonehouse, Gloucestershire, England). De geconcentreerde waterige oplossing werd verder gezuiverd door hem aan te brengen op een gelfiltratiekolom (Sephadex G-150; Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden) 30 en te elueren met 0,85 % zoutoplossing die 0,01 % (w/v) Tween 80 bevatte, bij een pH van 3,0. Een sterk gezuiverde waterige oplossing van t-PA werd aldus verkregen, welke oplossing nog één keer werd geconcentreerd onder toepassing van een wegwerp kunstnier. Het t-PA werd uit de oplossing neergeslagen door de pH tot 5,5 te verhogen met behulp van 35 natriumhydroxyde en de suspensie gedurende 2 uur op 4°C te houden. Het t-PA werd gewonnen door centrifugeren gedurende 30 minuten bij 4°C bij

8601353

4000 x g. Het t-PA pellet werd opnieuw opgelost in een waterige oplossing van natriumchloride [0,85 % (w/v)] die 0,01 % (w/v) Tween 80 bevatte, en ingesteld met zoutzuur op een pH van 3,0. Er werd een volumehoeveelheid zoutoplossing gebruikt die nodig was om een concentratie van t-PA te verkrijgen tussen 7.500.000 en 10.000.000 IU/ml. Deze t-PA oplossing werd verdund met een verdere waterige oplossing van natriumchloride [0,85 % (w/v)], die 0,01 % (w/v) Tween 80 bevatte en ingesteld op een pH van 3,0 met behulp van zoutzuur, en ook met een voldoende hoeveelheid van een oplossing van 10 % (w/v) mannitol in dezelfde zure zoutoplossing om eindconcentraties van 5.000.000 IU/ml t-PA en 25 mg/ml mannitol te realiseren. De verkregen oplossing werd aan een filtersterilisatie onderworpen en in volumehoeveelheden van 1 ml gebracht in glazen flesjes die ingevroren werden bij -35°C. Er werd een vacuüm aangelegd bij 0,05 Torr. (6,7 Pa). Na ongeveer 24 uur werd de temperatuur geleidelijk verhoogd tot 5°C en gedurende 16 uur op deze temperatuur gehouden. Daarna werd hij opnieuw verhoogd tot 25°C en werd het vacuüm verhoogd tot 0,02 Torr (2,7 Pa) gedurende nog eens 24 uur, waarna de flesjes onder een partieel vacuüm van 600 Torr (80 kPa) van droog stikstof werden afgesloten.

20 Voorbeeld II.

De trombolytische werkzaamheid van een parenterale oplossing, verkregen uit de gelyofiliseerde t-PA samenstelling volgens voorbeeld I, werd onderzocht in een in vivo model van halsadertrombose.

(a) Procedure:

25 De experimentele procedure volgde in essentie de procedure beschreven door Collen et al (J. Clin. Invest., 1983, 71, 368-376).

De gelyofiliseerde samenstelling van voorbeeld I werd snel en volledig opgelost in een steriele isotonische zoutoplossing die op een pH van 3,0 was ingesteld en 0,01 % Tween 80 bevatte. Aldus werd een parenterale oplossing verkregen voor een twee uur durend infuus van 30 500.000 IU/kg t-PA. De infusie geschiedde via een canule in de rechterdijader. Vier nieuw Zeelandse witte konijnen werden in dit onderzoek gebruikt. Na infusie werd de trombolysegraad geschat.

(b) Resultaten:

35 Het percentage trombolyse  $28,9 \pm 4,1$ , hetgeen de trombolytische werking van de parenterale oplossing, verkregen uit de gelyofiliseerde t-PA samenstelling volgens voorbeeld I aantoont. Bovendien werden geen nadelige reacties met deze oplossing waargenomen.

C O N C L U S I E S :

1. Werkwijze voor het bereiden van een gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling van t-PA, omvattende het vacuüm drogen van een ingevroren waterige t-PA oplossing, waarin de pH 2 - 5 bedraagt.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarin het t-PA in de uit één-  
5 keten bestaande vorm of in de uit twee-ketens bestaande vorm verkeert.
3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, waarin het t-PA de aminozuurvolgorde heeft volgens fig. 1 of dezelfde aminozuurvolgorde heeft, met dien verstande dat het aminozuur op de 245ste positie vanaf de serine N-terminus valine is in plaats van methionine, waarbij elke  
10 volgorde desgewenst één of meer van de drie eerste aminozuren mist of desgewenst een extra polypeptide N-terminale voorsequentie van Gly-Ala-Arg heeft.
4. Werkwijze volgens één of meer van de voorgaande conclusies, waarin het t-PA verkregen is uit een gekweekte getransformeerde  
15 of getransfecteerde cellijn, afgeleid onder toepassing van recombinant DNA-technologie.
5. Werkwijze volgens één of meer van de voorgaande conclusies, waarin de t-PA concentratie in de waterige oplossing groter is dan 100.000 IU/ml.
- 20 6. Werkwijze volgens conclusie 5, waarin de concentratie van t-PA groter is dan 500.000 IU/ml.
7. Werkwijze volgens conclusie 6, waarin de concentratie van t-PA groter is dan 1.000.000 IU/ml.
8. Werkwijze volgens conclusie 7, waarin de concentratie van t-PA  
25 ongeveer 5.000.000 IU/ml is.
9. Werkwijze volgens één of meer van de voorgaande conclusies, waarin de pH van de waterige oplossing 2 - 4,5 is.
10. Werkwijze volgens conclusie 9, waarin de pH 2,5 - 4,0 is.
11. Werkwijze volgens conclusie 10, waarin de pH 2,8 - 3,5 bedraagt.
- 30 12. Werkwijze volgens conclusie 11, waarin de pH ongeveer 3,0 is.
13. Werkwijze volgens één of meer van de voorgaande conclusies, waarin het medium voor de waterige oplossing geheel of in hoofdzaak op waterbasis is.

8601355

14. Werkwijze volgens één of meer van de voorgaande conclusies, waarin het medium voor de waterige oplossing een fysiologisch aanvaardbaar middel omvat dat de oplossing nagenoeg isotonisch met humaan bloedserum maakt.
- 5 15. Werkwijze volgens conclusie 14, waarin het fysiologisch aanvaardbare middel natriumchloride is.
16. Werkwijze volgens conclusie 14, waarin het fysiologisch aanvaardbare middel dextrose is.
17. Werkwijze volgens één of meer van de voorgaande conclusies, 10 waarin de waterige oplossing een oppervlakte-actief middel omvat.
18. Werkwijze volgens één of meer van de voorgaande conclusies, waarin de waterige oplossing in hoofdzaak ongebufferd is.
19. Werkwijze volgens één of meer van de voorgaande conclusies, waarin de waterige oplossing in hoofdzaak vrij is van lysine of ornithine of een zout daarvan. 15
20. Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies, waarin de waterige oplossing wordt gesteriliseerd.
21. Gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling, verkregen met de werkwijze volgens één of meer van de voorgaande conclusies.
- 20 22. Gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling van t-PA, welke bij oplossen in water een t-PA concentratie kan geven boven 100.000 IU/ml.
23. Gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling volgens conclusie 22, waarin de concentratie groter is dan 500.000 IU/ml.
24. Gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling volgens conclusie 25 23, waarin de concentratie groter is dan 1.000.000 IU/ml.
25. Gesloten houder met een gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling, zoals gedefinieerd in één of meer van de conclusies 21 - 24.
26. Fysiologisch aanvaardbaar zout van t-PA.
27. Fysiologisch aanvaardbaar zuur additiezout van t-PA.
- 30 28. Hydrochloride zout van t-PA.
29. Werkwijze voor het behandelen van een trombosekwaal in een zoogdier, omvattende de toediening aan het zoogdier van een parenterale oplossing van t-PA, verkregen uit een gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling zoals gedefinieerd in één of meer van de conclusies 21 - 24.
- 35 30. Gelyofiliseerde farmaceutische samenstelling, zoals gedefinieerd in één of meer van de conclusies 21 - 24, voor gebruik in de mensgeneeskunde of diergeneeskunde, in het bijzonder voor gebruik in de behandeling van een trombosekwaal.

8601355

FIG. 1

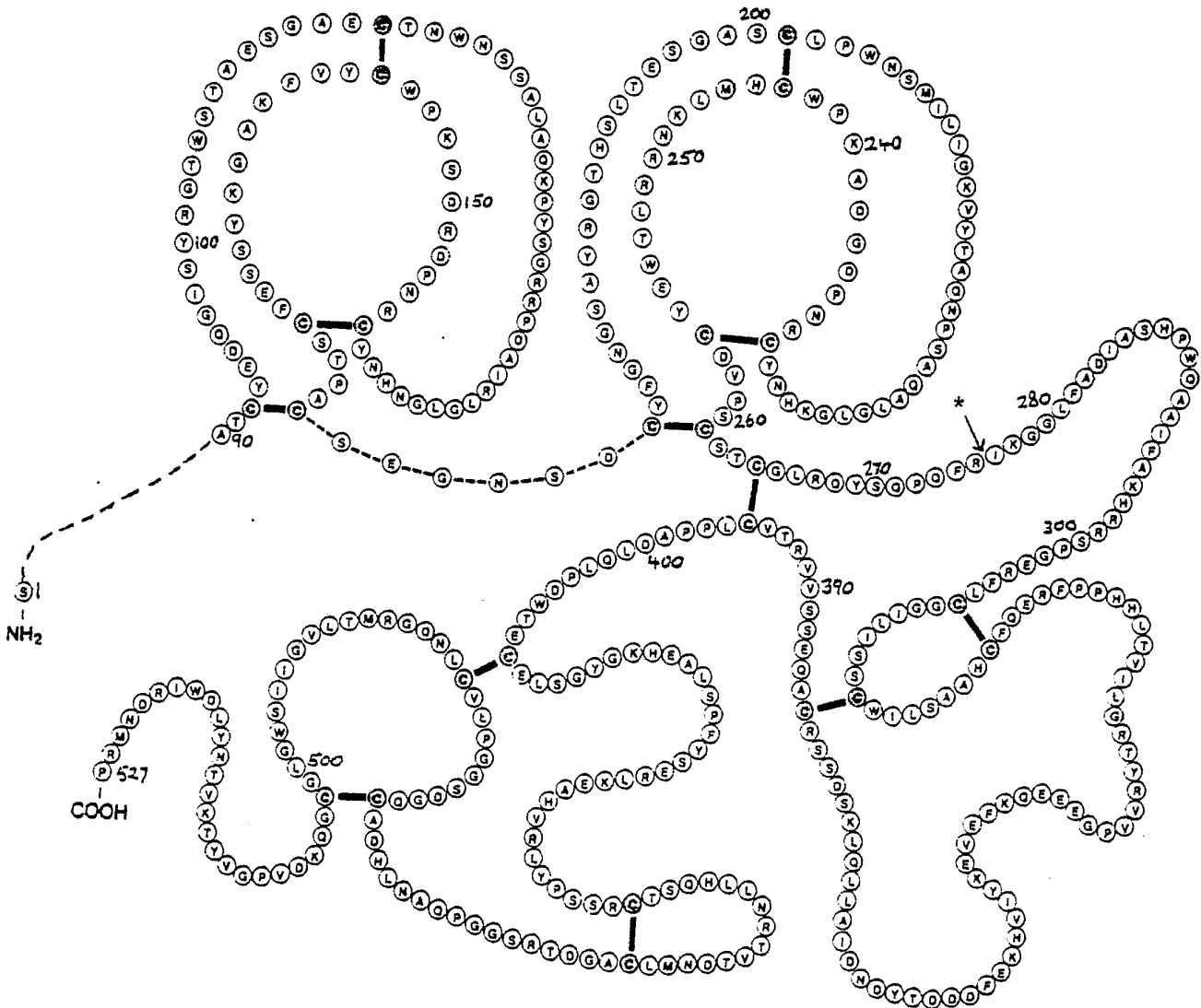
Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser  
 1  
 Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly  
 Arg Ala Gln Cys His Ser Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn  
 50  
 Gly Gly Thr Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu  
 Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr Glu Asp Gln  
 Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp  
 100  
 Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg  
 Leu Gly Leu Gly Asn His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp  
 150  
 Cys Tyr Val Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys  
 Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg Gly Thr His  
 Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys  
 200  
 Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr  
 Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Met Leu Lys Asn Arg Arg  
 250  
 Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr  
 Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp  
 Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly  
 300  
 Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe  
 Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu  
 Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr  
 350  
 Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln  
 Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp  
 400  
 Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr  
 Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser  
 Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg  
 450  
 Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
 Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu  
 500  
 Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp  
 Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro

527

8601355



FIG. 2



\* Plaats in uit één keten bestaand t-PA waar de splitsing in uit twee ketens bestaand t-PA plaats vindt, waarvan de A-keten de twee kringle gebieden bevat en de B-keten het serine protease gebieden bevat.

8601355