



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2337580 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 9/19 (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2012.07.23
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.03.28
(86)	Europeisk søknadsnr	09782562.4
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.09.03
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.06.29
(30)	Prioritet	2008.09.03 US 136402 P 2008.09.03 EP 08163554
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	RS
(73)	Innehaver	Octapharma AG, Seidenstrasse 2, 8853 Lachen, Sveits
(72)	Oppfinner	RIPPNER, Brita, Rödklövervägen 54, S-16573 Hässelby, Sverige ÖSTERBERG, Josefin, Kopparvägen 59, S-17672 Järfälla, Sverige NILSSON, Ulrika, Kiellandsplan 39, S-16843 Bromma, Sverige IVARSSON, Elsa, Andersvägen 3b, S-16969 Solna, Sverige AGERKVIST, Irène, Ridvägen 31, S-18239 Danderyd, Sverige
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Stabiliserte preparater for rekombinant fremstilt faktor VIII
(56)	Anførte publikasjoner	DE-A1- 4 001 451 B1, EP-A- 0 508 194 B1, EP-A- 1 652 534 B1, WO-A-03/080108 B1

Stabiliserte preparater for rekombinant fremstilt faktor VIII

Den foreliggende oppfinnelse vedrører frysetørkede formuleringer med kapasitet til å beskytte rekombinant fremstilt faktor VIII (r-faktor VIII) av høy renhet. Oppfinnelsen
 5 vedrører også flytende formuleringer av r-faktor VIII før frysetørking og etter rekonstituering av den frysetørkede faste formulering til en injiserbar væske.

Faktor VIII er et essensielt blodplasmaprotein involvert i blodkoagulasjonsprosessen. Mangel på denne koagulasjonsfaktor resulterer i hemofili A, en livstruende sykdom
 10 som må behandles ved faktor VIII erstatningsterapi. Tradisjonelt er konsentrater av rensset plasmaavledet faktor VIII (p-faktor VIII) blitt anvendt for erstatningsterapi. I det senere er rekombinant produsert faktor VIII (r-faktor VIII) blitt tilgjengelig som tilveiebringer en tilgang uavhengig av plasmadonasjon, som reduserer risikoen for virusoverførte sykdommer.

15 Faktor VIII er et kompleks molekyl og et svært sensitivt protein assosiert med aktivitetstap over tid. I blodet, vil andre blodproteiner slik som humant serumalbumin (HSA) og von Willebrand faktor (vWF) medvirke til å bevare koagulasjonsaktiviteten av faktor VIII. Det er imidlertid ønskelig å unngå tilstedeværelsen av proteiner opp-
 20 nådd ved rensing av blodplasma i farmasøytiske formuleringer av r-faktor VIII, på grunn av risikoen av virusoverføring. Det er således vesentlig å tilveiebringe preparater av andre farmasøytisk aksepterbare eksipienser for å beskytte r-faktor VIII mot fysisk og kjemisk nedbrytning og aggregering, som fører til aktivitetstap. En vanlig anvendt teknikk for å forhindre tap av proteinaktivitet under langtidslagring er å frem-
 25 stille tørre faste farmasøytiske formuleringer ved lyofilisering (frysetørking). De farmasøytiske eksipienser må også beskytte faktor VIII under den farmasøytiske prosessen, under langtidslagring og etter rekonstituering av den frysetørkede formulering til en oppløsning for administrering.

30 DNA sekvensen i faktor VIII er oppdelt i seks domener; tre A-, to C- og ett B-domene og proteinet inneholder interaksjons seter for andre koagulasjonsfaktorer vWF, fosfolipider og metallioner. Den minste aktive formen av faktor VIII proteinet mangler B domenet og er sammensatt av en lett kjede av 80 kDa assosiert med en tung kjede av 90 kDa (Wang W., *et al*, 2003). Både fullengde (Kogenate®, Bayer, Helixate®, CSL
 35 Behring, Recombinate®, Baxter og Advate®, Baxter) og B-domene deletert (ReFacto®, Wyeth og Xyntha®, Wyeth) r-faktor VIII legemiddelprodukter er på markedet i dag.

I en farmasøytisk formulering av faktor VIII behøver alle komponenter å velges med omhu. Hver eksipiens tilveiebringer en beskyttende funksjon for å holde på et høyt utbytte av faktor VIII gjennom den farmasøytiske prosessen, langtidslagring og til slutt rekonstituering og administrering til pasienten. I tillegg vurderes den kliniske sikkerheten til alle eksipienser.

Formålet med frysetørkingen (Manning, M. C. *et al.* 1989, Tang, X *et al.*, 2004, Schwegman, J. J. *et al.* 2005) er å fjerne vann fra formuleringen, da uheldige fysiske og kjemiske reaksjoner ofte finner sted i den vandige fasen.

10

Kryo-/lyobeskyttere kreves for å beskytte proteinet under frysetørkingsprosessen og under lagring, ved å danne en amorf matriks som omgir proteinet.

Et fyllstoff er inkludert til å virke som et kakedannende middel for å gi mekanisk støtte under frysetørking og for å øke tørrvekten av legemiddelproduktet. Fyllstoffet bidrar derved til å tilveiebringe en homogen kvalitet og utseende av et frysetørket produkt.

15

Et buffermiddel kan tilsettes for å opprettholde pH ved en verdi som er egnet for proteinet og for den terapeutiske bruken av produktet.

20

På grunn av den høye potensen til faktor VIII, er konsentrasjonen av faktor VIII i terapeutiske oppløsninger lav. I tillegg vil faktor VIII lett adsorberes til overflater, som gjør overflateadsorpsjon til en viktig kilde for aktivitetstap under produksjon og etter rekonstituering av produktet. For nåværende markedsførte faktor VIII produkter, kreves det vanligvis at et overflateaktivt middel anvendes over dets kritiske micellekonsentrasjon (cmc), som er oppløsningskonsentrasjonen hvorved det overflateaktive middel danner micelleaggregater. (cmc verdiene til polyoksyetylen-inneholdende ikke-ioniske detergenter er temperaturavhengig ved at cmc verdien blir høyere ved lavere temperaturer (Alexandridis, P. *et al.*, 1994, Nilsson, M. *et al.*, 2007). cmc til Poloxamer 188 er minst 20-39 mg/ml ved 37°C (Kabanov, A. V. *et al.*, 1995, Alexandridis, P. *et al.*, 1994, Moghimi, S. M. *et al.*, 2004) og økende til 100 mg/ml ved 20°C (Nakashima, K, *et al.*, 1994). Således, i henhold til disse rapporter, er cmc til Poloxamer 188 innen intervallet 20-100 mg/ml ved 25°C.

25

30

Metallioner er blitt vist til å være involvert i assosiasjonen av lette og tunge kjeder i faktor VIII (Wang W *et al.*, 2003) og kalsiumioner (Ca^{2+}) er derfor normal til stede i

35

formuleringer av faktor VIII for å opprettholde assosiasjonen av komplekset av 80 og 90 kDa kjedene.

Betydelige innsatser er blitt gjort for å finne passende formuleringer av faktor VIII,
5 f.eks.:

En publikasjon av Österberg *et al* (1997) beskriver en formulering som omfatter natriumklorid som fyllstoff, i kombinasjon med en surfaktant, kalsiumklorid og sukrose som stabilisator og histidin som buffermiddel.

10

US-B-7247707 (Besman *et al*) omhandler albuminfrie formuleringer som omfatter 300 til 500 mM natriumklorid, 1 til 4 % av en stabilisator valgt fra gruppen bestående av sukrose, trehalose, raffinose og arginin, 1 til 5 mM CaCl_2 , og et buffermiddel, foretrukket histidin. En surfaktant er også inkludert i preparatet, i en konsentrasjon opp til
15 0,1 %.

US-A-5874408 (Nayar) beskriver en formulering av rekombinant faktor VIII, som omfatter glycin, histidin, sukrose, CaCl_2 og små mengder av natriumklorid. Nayar oppdaget at histidin, som er inkludert som buffermiddel i alle kommersielt tilgjengelige r-
20 faktor VIII preparater i dag, hadde en destabiliserende effekt i frysetørkede faktor VIII formuleringer. Denne effekt ble imidlertid overvunnet ved tilsetninger av salter, glysin og sukrose.

US-A-4877608 (Lee *et al*) beskriver bruken av en sterkt rensert faktor VIII protein-formulering i en vandig oppløsning bestående i alt vesentlig av terapeutisk aktiv faktor
25 VIII med en aktivitet på minst 130 IU/mg; 0,4 til 1,2 M natriumklorid, kaliumklorid eller blandinger derav; 1,5 til 40 mM kalsiumklorid og 1 til 50 mM histidin, og eventuelt opp til 10 % sukker valgt fra gruppen bestående av mannitol, sukrose og maltose.

30

US-A-2005/0256038 (White *et al*) lærer et lyofilisert faktor VIII preparat som omfatter en surfaktant, kalsiumklorid, sukrose, natriumklorid, trinatriumcitrat og en buffer fri for aminosyrer.

35 WO-A-99/10011 (Kanellos *et al*) omhandler varmebehandlede formuleringer for plasma faktor VIII, med høy renhet. Formuleringen omfatter en stabiliserende effektiv mengde sukrose, trehalose og minst en aminosyre. Aminosyren som er foretrukket er

lysin, men andre som kan anvendes er isoleucin, leucin, lysin, metionin, fenylalanin, treonin, tryptofan, valin, alanin, arginin, histidin, prolin, serin og glysin.

5 EP-A-1016673 (Österberg *et al*) lærer bruken av formuleringer som omfatter en ikke-ionisk surfaktant som en stabilisator og faktor VIII med en spesifikk aktivitet som er større enn 5000 IU/mg. Videre er det angitt at surfaktantkonsentrasjonen ikke bør være over den kritiske micellekonsentrasjon, i en mengde på minst 0,01 mg/ml.

10 US-B-6887852 (Paik *et al*) beskriver en frysetørket faktor VIII formulering som omfatter en blanding av L-arginin, L-isoleucin og L-glutaminsyre som en stabilisator. Basisformuleringen omfatter lave mengder av natriumklorid, kalsiumklorid og histidin. Ikke noe overflateaktivt middel er tilsatt til preparatet, da formuleringen som omtalt viser en bedre stabilitet sammenlignet med formuleringer som omfatter surfaktant.

15 US-A-5565427 (Freudenberg) lærer bruken av en stabil oppløsning av faktor VIII som omfatter en detergent og en aminosyre eller ett av dens salter. Den spesifikke aktiviteten av proteinet er minst 2000 IU/mg.

20 US-A-5328694 (Schwinn) omhandler en stabil injiserbar oppløsning som omfatter faktor VIII rensset fra plasma og en kombinasjon av disakkarider og en eller flere aminosyrer. Foretrukket er aminosyren lysin eller glysin.

25 Den foreliggende oppfinnelse vedrører preparater av rekombinant fremstilt faktor VIII (r-faktor VIII) med høy renhet. Preparatene er histidinfrie. For å utvise maksimale beskyttende effekter, er de nå oppfunne preparater basert på forsettlige seleksjoner av eksipienser slik som et kryo-/lyo-beskyttende middel, og fyllstoff og et overflateaktivt middel. Hver tilsatte eksipiens må ikke utvise sine beskyttende effekter i alle stadier, dvs. under den farmasøytiske prosess, langtidslagring og under rekonstituering og administrering.

30

De frysetørkede formuleringene ifølge oppfinnelsen er ikke begrenset til å ha det samme fylte volum og rekonstitueringsvolum. For en fagkyndig på området vil det klart fremgå at det formulerte produkt også kan rekonstitueres i en mere fortynnet form.

35

Den foreliggende oppfinnelse vedrører et preparat ifølge krav 1 som har kapasitet til å beskytte rekombinant produsert faktor VIII.

De histidinfrie preparatene av r-faktor VIII ifølge den foreliggende oppfinnelse inkluderer generelt en kombinasjon av arginin og sukrose; et fyllstoff som er natriumklorid eller arginin; et overflateaktivt middel; og eventuelt et pH buffermiddel. Betegnelsen "histidinfri" som anvendt i den foreliggende sammenheng skal ikke bety preparater "uten histidin", da mindre mengder kan følge med bulklegemiddelsubstansen fra tidligere produksjonstrinn, men heller at det ikke er blitt tilsatt noe histidin under den farmasøytiske prosessering. Histidin anvendes ofte som buffermiddel i faktor VIII preparater og mens noen kilder rapporterer en stabiliserende effekt på faktor VIII (EP-A-1016673, Österberg *et al*), rapporterer andre kilder om en destabiliserende effekt i formuleringer av faktor VIII (US-A-5874408, Nayar). Den foreliggende oppfinnelse omfatter, når passende, natriumcitrat, maleinsyre eller Tris (tris(hydroksymetyl)-aminometan) som et pH buffermiddel. Buffermiddelet er f.eks. natriumcitrat, til stede i en mengde for å opprettholde en pH som strekker seg fra 6,5 til 7,5. En passende form av natriumcitratet er dihydratsaltet. Generelt kan preparatene ifølge oppfinnelsen være i frysetørket form, men de er også representert ved oppløsninger slik som en oppløsning som skal frysetørkes og en oppløsning rekonstituert fra et frysetørket preparat.

Preparatene kan videre omfatte kalsiumklorid i en mengde på omtrent 0,5 til 10 mM for å forbedre spesifikk stabilisering av faktor VIII molekylet. Preparatene kan videre omfatte andre forbindelser slik som antioksidanter, slik som glutatation eller metionin.

Et fyllstoff omtales som en eksipiens til stede i formuleringen for å tilveiebringe mekanisk støtte til den lyofiliserte kaken og for å øke tørrvekten. Fyllstoffet kan enten være i en krystallinsk tilstand, som natriumklorid eller i en amorf tilstand, som arginin.

Med et pH buffermiddel er det vist til en forbindelse med en bufferkapasitet i pH området mellom omtrent pH 5 og 9. Bufferkapasiteten relaterer til en pKa verdi av buffermiddelet innen nevnte pH intervall.

Et ionestyrketilveiebringende middel er omtalt som en ionisk forbindelse som er til stede i formuleringen for å øke ionestyrken.

Et kryo- og lyo-beskyttende middel (kryo-/lyo-beskyttene middel) er en forbindelse til stede i formuleringen for å nedsette eller til og med forhindre tap av proteinaktivitet

under frysetørkingstrinn og tørkettrinn i frysetørkingsprosessen og under den etterfølgende lagring av det frysetørkede produktet.

Et overflateaktivt middel skal bety en forbindelse som adsorberer til overflater og grenseflater og som dermed motvirker aktivitetstap av faktor VIII på grunn av adsorpsjon. Denne typen av aktivitetstap kan foregå under hele den farmasøytiske prosessering så vel som under håndteringen av det rekonstituerende produktet før og under administrering til en pasient. Enkelte overflateaktive midler danner micelle-aggregater i oppløsning. Den kritiske micellekonsentrasjonen av et overflateaktivt middel er den konsentrasjon over hvilken miceller dannes.

En beskyttende sammensetning av faktor VIII betyr en formulering som er sammensatt av valgte eksipienser, hvor hver av eksipiensene tilveiebringer en beskyttende funksjon for å holde et høyt utbytte av faktor VIII gjennom den farmasøytiske prosessering, langtidslagring og endelig rekonstituering og administrering til pasienten. Den farmasøytiske prosessering referer særlig til de siste trinnene i produksjonsprosessen, som starter med ankomsten av bulk-legemiddelsubstans fra produksjon inntil slutten av frysetørking av det formulerte legemiddelprodukt. Det bør forstås at trinnene i den farmasøytiske prosessering er generelt vel kjent for en fagkyndig på området innen proteinformulering og inkluderer trinn slik som formulering, sterilfiltrering, fylling i rør og frysetørking.

Tap av aktiv faktor VIII har en vid betydning som inkluderer, men som ikke er begrenset til, tap som skyldes overflateadsorpsjon, aggregering, fysiske og/eller kjemiske forandringer av proteinstrukturen, eller tap fra forkasting av lyofilisater som viser seg å være utilfredsstillende.

r-faktor VIII, er særlig et delesjonsderivat som fullstendig eller delvis mangler B-domenet, og som derved tilveiebringer en spesifikk aktivitet som i omfattende grad kan overskride 5000 IU/mg før formulering. Eksempler på slike delesjonsderivater som fullstendig eller delvis mangler deres B-domener er omtalt og fremstilt i EP-A-1136553 (Hausen *et al*) og EP-A-1739179 (Schröder *et al*) fra humane cellerlinjer. Det skal forstås at de nå oppfunne preparater, slik det er beskrevet i den etterfølgende delen, er særlig godt egnet til å beskytte slike delesjonsderivater av faktor VIII.

I overensstemmelse med den foreliggende oppfinnelse er det kryo-/lyo-beskyttende middel en kombinasjon av arginin og sukrose. Arginin kan typisk være et salt eller et derivat av arginin, slik som argininhydroklorid.

- 5 Fyllstoffet ifølge oppfinnelsen har også en ytterligere funksjon som er et ionestyrke-tilveiebringende middel, som minimaliserer antall komponenter som er nødvendige for et adekvat klinisk produkt. Fyllstoffer ifølge den foreliggende oppfinnelse kan være natriumklorid eller arginin. Arginin kan være i saltform, særlig hydrokloridformen.
- 10 Ifølge den foreliggende oppfinnelse er det kryo-/lyo-beskyttende middel en kombinasjon av arginin og sukrose. Fyllstoffet og middelet som tilveiebringer ionestyrke er særlig natriumklorid. Dersom natriumklorid virker som et fyllstoff, omfatter preparatet ifølge oppfinnelsen særlig, som et kryo-/lyo-beskyttende middel, fra 3-15 mg/ml sukrose og fra 3-15 mg/ml arginin med den betingelse at minst 6
- 15 mg/ml av det kryo-/lyo-beskyttende middel er til stede, og som et fyllstoff fra 10 mg/ml til 40 mg/ml natriumklorid. Preparatet kan særlig omfatte omtrent 3 mg/ml til 10 mg/ml, særlig fra 4,5 mg/ml til 9 mg/ml sukrose, fra 3 mg/ml til omtrent 8 mg/ml, særlig fra 4,5 mg/ml til 6,8 mg/ml arginin, og særlig fra 15 mg/ml til 23 mg/ml natriumklorid. Andre passende konsentrasjonsområder omfatter spesielt fra 4,5 til 6,8
- 20 mg/ml sukrose, fra 4,5 mg/ml til 6,8 mg/ml arginin og fra 15 mg/ml til 23 mg/ml natriumklorid. Arginin og sukrose er foretrukket til stede i like mengder. Preparatet omfatter deretter opp til 9 mg/ml arginin og opp til 9 mg/ml sukrose. Videre kan preparatet omfatte kalsiumklorid, et overflateaktivt middel og, eventuelt, natriumcitrat som pH buffermiddel. I en annen utførelsesform omfatter preparatet ifølge
- 25 oppfinnelsen sukrose i en mengde fra 10 mg/ml til 25 mg/ml og natriumklorid i en mengde fra 10 mg/ml til 40 mg/ml.

- I henhold til en annen utførelsesform er preparatet som et alternativ i alt vesentlig fri for natriumklorid, kryo-/lyo-beskyttelsesmiddelet er sukrose og fyllstoffet og det ione-
- 30 styrke-tilveiebringende middel er arginin. Spesielt omfatter preparatet fra 5 til 25 mg/ml sukrose og fra 20 til 70 mg/ml arginin. Videre kan dette preparat omfatte kalsiumklorid, et overflateaktivt middel og eventuelt natriumcitrat som buffermiddel. Betegnelsen "i alt vesentlig fritt for natriumklorid" når det fremkommer i den foreliggende sammenheng bør ikke bety preparater "uten noe natriumklorid", men som
 - 35 heller inneholder spor av NaCl f.eks. < 1 %, fordi mindre mengder natriumklorid kan følge bulklegemiddelsubstansen fra tidligere produksjonstrinn, men heller at ikke noe natriumklorid er blitt tilsatt under den farmasøytiske bearbeiding.

Preparatet tilveiebringes typisk i frysetørket form. I en ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen, tilveiebringes preparatet i form av en oppløsning som skal frysetørkes eller i form av en rekonstituert oppløsning fremstilt fra et frysetørket preparat og
5 fortynningsmiddel.

I en ytterligere utførelsesform er det overflateaktive middel i preparatet ifølge oppfinnelsen et protein, særlig et rekombinant protein. Proteinet er særlig rekombinant fremstilt albumin, f.eks. i en mengde fra 0,5 mg/ml til 5 mg/ml. Denne mengden er
10 betydelig mindre enn og er forskjellig fra mengden som er vanlig anvendt i forbindelse med tradisjonelle formuleringer av plasma-avledet faktor VIII, hvor albuminet virker som det eneste kryo/lyo-beskyttende middel. Overraskende er albumin, særlig rekombinant albumin, svært egnet for anvendelse som overflateaktivt middel i formuleringer av rekombinant faktor VIII som skal lagres ved romtemperatur.

15 I en annen utførelsesform av oppfinnelsen er det overflateaktive middel en ikke-ionisk surfaktant, f.eks. en polyoksyetylen-polyoksypropylen-kopolymer. Ifølge oppfinnelsen, er det overflateaktive middel til stede i en konsentrasjon som er mindre enn den kritiske micellekonsentrasjonen, f.eks. for polyoksyetylen-polyoksypropylen-kopolymer
20 mindre enn omtrent 5 mg/ml.

I en utførelsesform av oppfinnelsen, omfatter preparatet en r-faktor VIII med en spesifikk aktivitet ≥ 5000 IU/mg protein.

25 I henhold til en enda ytterligere utførelsesform har preparatet et kryo-/lyo-beskyttende middel og et fyllstoff som arginin, som også virker som et ionestyrke-tilveiebringende middel. Spesielt er arginin til stede i en mengde fra 20 mg/ml til 70 mg/ml. Videre kan dette preparat omfatte kalsiumklorid, et overflateaktivt middel og eventuelt natriumcitrat som buffermiddel.

30 De forskjellige utformede preparater omfatter alle et overflateaktivt middel som i ett aspekt er et ikke-ionisk detergentmiddel, særlig en polymerisk ikke-ionisk surfaktant av blokk-kopolymer type, slik som en polyoksyetylen-polyoksypropylen-kopolymer, f.eks. Poloxamer 188, eller en ikke-ionisk surfaktant av polyoksyetylen-sorbitan-fettsyreester type, f.eks. Polysorbate 20 eller Polysorbate 80. En passende ikke-ionisk
35 surfaktant er Poloxamer 188, som kan anvendes ved en konsentrasjon som er lavere enn dens kritiske micellekonsentrasjon (cmc), spesielt foretrukket ved konsentrasjon-

er som er lavere enn omtrent 5 mg/ml. cmc verdien av Poloxamer 188 er blitt rapportert til å være i området fra 20-100 mg/ml ved 25°C (Karbanov, A. V. *et al*, 1995, Alexandridis, P. *et al*, 1994, Moghimi, S. M. *et al*, 2004, Nakashima, K. *et al*, 1994).

- 5 I et annet aspekt er det overflateaktive middelet et rekombinant fremstilt protein annet enn faktor VIII proteinet, særlig rekombinant humant albumin, og spesielt omfatter slike preparater rekombinant fremstilt albumin i en mengde fra 0,5 mg/ml til 5 mg/ml.
- 10 De forskjellige utførelsesformer vil bli beskrevet mer detaljert i de etterfølgende eksempler som illustrerer oppfinnelsen men som ikke skal betraktes til å være en restriksjon eller en begrensing av rammen for oppfinnelsen.

Eksempler

- 15 Faktoren VIII anvendt i forsøkene er et rekombinant humant B-domene deletert faktor VIII protein, produsert i den humane cellelinjen HEK293F ifølge prosessen beskrevet i EP 1739179 (Schröder *et al*). Renseprosessen består av fem kromatografitrinn og genererte et svært rent faktor VIII proteinpreparat (Winge *et al*, europeisk patentsøknad 08 158 893.1) med et humant glykosyleringslignende mønster (Sandberg *et al*, europeisk patentsøknad 08 162 765.5).
- 20

Proteinaktiviteten ble målt med en kromogen analyse eller med ett-trinns analysen.

- 25 Den kromogene analysen er en to-trinns fotometrisk metode som måler den biologiske aktiviteten til faktor VIII som en kofaktor. Faktor VIII aktiverer faktor X til faktor Xa, som i sin tur spaltes enzymatisk til et produkt som kan kvantifiseres spektrofotometrisk.

- Ett-trinns analysen er basert på en faktor VIII inneholdende prøves evne til å
- 30 korrigere koagulasjonstiden av faktor VIII deficient plasma i nærvær av fosfolipid, kontaktaktivator og kalsiumioner. Tiden til tilsynekomst av en fibrinklump måles i ett trinn.

EKSEMPEL 1

- 35 Den rekombinante faktor VIII ble fremstilt i henhold til beskrivelsen i den eksperimentelle delen ovenfor. Dette forsøk sammenligner en formulering som har et kryolryo-beskyttende middel som er en kombinasjon av arginin og sukrose med for-

muleringer som har enten sukrose eller arginin som kryo-/lyo-beskyttende middel. Natriumklorid virker som et fyllstoff og et ionestyrketilveiebringende middel.

- 5 Formuleringsene ble undersøkt for faktor VIII gjenvinning i frysetørkede formuleringsene, ved en initial konsentrasjon på 150 IU/ml. Preparatene som ble undersøkt er vist i tabell I.

TABELL I – Preparat

	1A	1B	1C
Sukrose, mg/ml	9	-	9
Arginin HCl, mg/ml	9	9	-
Natriumklorid, mg/ml	30	30	30
Kalsiumkloriddihydrat, mg/ml	0,5	0,5	0,5
Poloxamer 188, mg/ml	2	2	2
Natriumcitratdihydrat, mg/ml	2	2	2

- 10 1,5 ml prøvemengder av oppløsningene ble frysetørket i en frysetørker med laboratorieskala. De frysetørkede prøvene ble lagret i opp til 12 måneder ved +5°C, +25°C og + 40°C for å evaluere proteinaktiviteten over tid. Prøvene ble rekonstituert i 1,5 ml vann for injeksjoner og analysert med den kromogene analysen som beskrevet i den eksperimentelle delen ovenfor. Resultatene er oppsummert i tabell II.

15

TABELL II – Resultater

		Faktor VIII aktivitet over tid (måneder), (% av initial verdi)							
		0	0,5	1	2	3	6	9	12
1A	5°C	100	n.a.	107	n.a.	95	116	92	90
	25°C	100	97	99	95	89	96	76	70
	40°C	100	93	102	76	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
1B	5°C	100	n.a.	106	n.a.	81	111	97	92
	25°C	100	98	99	96	84	81	62	45
	40°C	100	85	79	59	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
1C	5°C	100	n.a.	101	n.a.	86	102	88	82
	25°C	100	85	86	80	83	82	71	63
	40°C	100	70	66	56	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. ikke analysert

Resultatene i eksempel 1 viser at det overraskende er en additiv synergistisk kryo-/lyo-beskyttende effekt mellom sukrose og arginin, da formulering 1A viser en bedre aktivitetsgjenvinning over tid sammenlignet med formuleringer 1B og 1C.

5

EKSEMPEL 2

Den rekombinante faktor VIII ble fremstilt i henhold til beskrivelsen i den eksperimentelle delen ovenfor. Dette forsøk undersøker formuleringer som har sukrose som kryo-/lyo-beskyttende middel og arginin som fyllstoff og ionestyrketilveiebringene middel. Formuleringene ble undersøkt for faktor VIII gjenvinning i frysetørkede formuleringer, ved en initial konsentrasjon på 150 IU/ml. Preparatene som ble undersøkt er vist i tabell III.

10

TABELL III – Preparat

	2A	2B	2C
Sukrose, mg/ml	10	10	10
Arginin HCl, mg/ml	50	35	70
Kalsiumkloriddihydrat, mg/ml	0,5	0,5	0,5
Poloxamer 188, mg/ml	2	2	2
Natriumcitratdihydrat, mg/ml	2	2	2

15

1,5 ml prøvemengder av oppløsningene ble frysetørket i en frysetørker med laboratorieskala. De frysetørkede prøvene ble lagret i opp til 12 måneder ved +5°C, +25°C og +40°C for å evaluere proteinaktiviteten over tid. Prøvene ble rekonstituert i 1,5 ml vann for injeksjoner og analysert med den kromogene analysen som beskrevet i den eksperimentelle delen ovenfor. Resultatene er oppsummert i tabell IV, som prosentandel av den initiale verdien.

20

TABELL IV – Resultater

		Faktor VIII aktivitet over tid (måneder), (% av initial verdi)					
		0	1	3	6	9	12
2A	5°C	100	94	80	92	89	101
	25°C	100	94	84	86	74	84
	40°C	100	90	81	n.a	n.a.	n.a.
2B	5°C	100	99	89	90	85	105
	25°C	100	99	93	86	80	86
	40°C	100	97	82	n.a.	n.a.	n.a
2C	5°C	100	97	88	93	88	97
	25°C	100	93	78	87	76	80
	40°C	100	90	n.a	n.a.	n.a	n.a

n.a. ikke analysert

- 5 Resultatene i eksempel 2 viser at arginin virker tilfredsstillende som et fyllstoff og ionestyrketilveiebringende middel i kombinasjon med sukrose som et kryo-/lyo-beskyttende middel.

EKSEMPEL 3

- 10 Den rekombinante faktoren VIII ble fremstilt i henhold til beskrivelsen i den eksperimentelle delen ovenfor. Dette forsøk sammenligner formuleringer med enten Poloxamer 188 eller Polysorbate 80 som et overflateaktivt middel med en formulering uten overflateaktivt middel. Det kryo-/lyo-beskyttende middel er en kombinasjon av arginin og sukrose, og natriumklorid anvendes som et fyllstoff og et ionestyrketil-
- 15 veiebringende middel. Formuleringene som vist i tabell 5 ble undersøkt med hensyn til faktor VIII utvinning over frysetørkingstrinnet ved en initial faktor VIII konsentrasjon på 150 IU/ml.

TABELL V – Preparat

	3A	3B	3C
Sukrose, mg/ml	9	9	9
Arginin HCl, mg/ml	9	9	9
Natriumklorid, mg/ml	30	30	30
Kalsiumkloriddihydrat, mg/ml	0,5	0,5	0,5
Poloxamer 188, mg/ml	2	-	-
Polysorbate 80, mg/ml	-	0,2	-
Natriumcitratihydrat, mg/ml	2	2	2

1,5 ml prøvemengde av oppløsningene ble frysetørket i en frysetørker med labora-
 torieskala. Prøver ble tatt før frysetørking og frosset. Frysetørkede prøver ble re-
 5 konstituert i 1,5 ml vann for injeksjoner før analyse. Faktor VIII aktivitet ble analysert
 med den kromogene analysen beskrevet i den eksperimentelle delen ovenfor.
 Resultatene av aktivitetgjenvinning i fryse-tinte prøver og over frysetørkingstrinnet er
 vist i tabell VI.

10 TABELL VI – Resultater, aktivitetgjenvinning over frysetørkingstrinnet

Faktor VIII aktivitet (% av tilsatt mengde)			
	Tilsatt mengde	Fryse- tint	Rekonstituert etter frysetørking
3A	100	104	93
3B	100	101	97
3C	100	18	0

Resultatene i eksempel 3 viser at et overflateaktivt middel er nødvendig i formule-
 ringen for å motvirke proteintap som trolig skyldes overflateadsorpsjon både over et
 fryse-tint trinn og over frysetørkingsprosessen. Dette eksempel viser videre at det
 15 ikke-ioniske polymere overflateaktive middel Poloxamer 188, når anvendt i en kon-
 sentrasjon som er under den kritiske micellekonsentrasjon (cmc), effektivt beskytter
 faktor VIII under frysetørking. Den beskyttende effekt er like høy som den til det ikke-
 ioniske overflateaktive middel Polysorbate 80, anvendt over sin cmc verdi.

EKSEMPEL 4

Eksempel 3 viste at et overflateaktivt middel er nødvendig i formuleringen for å unngå faktor VIII aktivitetstap forårsaket av overflateadsorpsjon, og dette eksempel undersøker om rekombinant albumin kan anvendes for dette formål.

5

Den rekombinante faktor VIII ble fremstilt i henhold til beskrivelsen i den eksperimentelle delen ovenfor. Formuleringene vist i tabell VII ble undersøkt for faktor VIII aktivitetgjenvinning i oppløsning, ved en initial faktor VIII konsentrasjon på 140 IU/ml. Proteinformuleringene ble lagret ved +25°C og ble analysert på dag 0, 3, 7 og 10 med den kromogene analysen beskrevet i den eksperimentelle delen ovenfor. Resultatene er vist i tabell VIII, som prosentandel av initial verdi.

10

TABELL VII - Preparat

	4A	4B	4C	4D
Sukrose, mg/ml	9	9	9	9
Arginin HCl, mg/ml	9	9	9	9
Natriumklorid, mg/ml	30	30	30	30
Kalsiumklorid, mg/ml	0,5	0,5	0,5	0,5
Polxamer 188, mg/ml	2	-	-	-
Rekombinant albumin, mg/ml	-	1	2	4
Natriumcitrat, mg/ml	2	2	2	2

15

TABELL VIII – Resultater

Faktor VIII aktivitet over tid (døgn)				
(% av initial verdi)				
	0	3	7	10
4A	100	93	87	83
4B	100	103	99	96
4C	100	110	104	100
4D	100	96	95	85

Resultatene i eksempel 4 viser at rekombinant albumin kan beskytte r-faktor VIII mot aktivitetstap som sannsynligvis skyldes overflateadsorpsjon.

20

EKSEMPEL 5

Eksempel 3 viste at et overflateaktivt middel er nødvendig i formuleringen for å unngå faktor VIII aktivitetstap som sannsynligvis skyldes overflateadsorpsjon, og eksempel 4 viste at rekombinant albumin kunne anvendes for å hindre tap av proteinaktivitet i oppløsning. Dette eksempel undersøker om rekombinant albumin beskytter protein-aktivitetstap som sannsynligvis skyldes overflateadsorpsjon også i frysetørkings-trinnet.

Den rekombinante faktoren VIII ble fremstilt i henhold til beskrivelsen i den eksperimentelle delen ovenfor. Formuleringene er uten ikke-ionisk detergent, men med rekombinant albumin tilsatt for å forhindre aktivitetstap. Det kryo-/lyo-beskyttende middel er en kombinasjon av arginin og sukrose, natriumklorid anvendes som et fyllstoff og et ionestyrketilveiebringende middel. Formuleringene vist i tabell VII ble undersøkt for faktor VIII gjenvinning i frysetørkede formuleringer, ved en initial faktor VIII konsentrasjon på 150 IU/ml.

1,5 ml prøvemengder av oppløsningen ble frysetørket i en frysetørker med laboratorieskala. De frysetørkede prøvene lagres i opp til 12 måneder ved +5°C, +25°C og +40°C for å evaluere proteinaktiviteten over tid. Prøvene ble rekonstituert i 1,5 ml vann for injeksjoner og analysert med den kromogene analysen, beskrevet i den eksperimentelle delen ovenfor. Resultatene er oppsummert i tabell IX.

TABELL IX – Resultater

		Faktor VIII aktivitet over tid (måneder) (% av initial verdi)					
		0	1	3	6	9	12
4A	5°C	100	110	117	93	112	100
	25°C	100	104	95	75	74	59
	49°C	100	84	47	n.a	n.a.	n.a.
4B	5°C	100	99	100	94	97	95
	25°C	100	100	98	92	95	92
	49°C	100	81	74	n.a.	n.a.	n.a.
4C	5°C	100	101	114	103	106	112
	25°C	100	106	105	102	102	102
	49°C	100	108	101	n.a.	n.a.	n.a.
4D	5°C	100	100	103	99	96	101
	25°C	100	99	112	103	99	99
	49°C	100	101	93	n.a.	n.a	n.a.

n.a. ikke analysert

- 5 Resultatene i eksempel 5 viser at rekombinant albumin kan erstatte en ikke-ionisk detergent i r-faktor VIII formuleringer (formuleringer 4B til 4D) for å unngå aktivitets-tap som sannsynligvis skyldes overflateadsorpsjon i frysetørkingstrinnet. Det viser også at rekombinant albumin er svært egnet for anvendelse som et overflateaktivt middel i formuleringer av rekombinant faktor VIII som skal lagres ved romtemperatur.

10

EKSEMPEL 6

- Rekombinant faktor VIII ble fremstilt i henhold til beskrivelsen i den eksperimentelle delen ovenfor. Formuleringene er uten ikke-ionisk detergent, men med rekombinant albumin tilsatt for å forhindre aktivitetstap som kan skyldes overflateadsorpsjon. Kry-
 15 /lyo-beskyttelsesmiddelet er sukrose, og natriumklorid anvendes som et fyllstoff og et ionestyrketilveiebringende middel. Formuleringene vist i tabell X ble undersøkt for faktor VIII gjenvinning i frysetørkede formuleringer, ved en initial faktor VIII konsen-
 trasjon på 160 IU/ml.

20

TABELL X- Preparat

	6A	6B
Sukrose, mg/ml	24	24
Natriumklorid, mg/ml	30	30
Kalsiumklorid, mg/ml	0,5	0,5
Rekombinant albumin, mg/ml	2	4
Natriumcitrat, mg/ml	2	2

1,5 ml prøvemengder av oppløsningene ble frysetørket i en frysetørker med laboratorieskala. De frysetørkede prøvene ble lagret i opp til 6 måneder ved +5°C, +25°C og +40°C for å evaluere proteinaktiviteten over tid. Prøvene rekonstitueres i 1,5 ml vann for injeksjoner og analyseres med den kromogene analysen beskrevet i den eksperimentelle delen ovenfor. Resultatene er vist i tabell XI.

TABELL XI – Resultater

		Faktor VIII aktivitet over tid (måneder), (% av initial verdi)				
		0	1	2	3	6
6A	5°C	100	n.a.	n.a.	93	101
	25°C	100	96	n.a.	106	101
	40°C	100	99	89	89	n.a.
6B	5°C	100	n.a.	n.a.	95	107
	25°C	100	102	n.a.	79	104
	40°C	100	101	99	102	n.a.

n.a. ikke analyser

Resultatene i eksempel 6 viser at rekombinant albumin kan erstatte en ikke-ionisk detergent i r-faktor VIII formuleringer for å unngå aktivitetstap som kan skyldes overflateadsorpsjon i frysetørkingstrinnet. Det viser også at rekombinant albumin er svært egnet for anvendelse som et overflateaktivt middel i formuleringer av rekombinant faktor VIII for lagring ved romtemperatur.

EKSEMPEL 7

Dette eksempel undersøker faktor VIII aktivitetgjenvinning i en oppløsning som inneholder histidin som et pH buffermiddel sammenlignet med en oppløsning uten pH buffermiddel.

- Den rekombinante faktor VIII ble fremstilt i henhold til beskrivelsen i den eksperimentelle delen ovenfor. Oppløsningene vist i tabell XII ble undersøkt for faktor VIII aktivitetgjenvinning i oppløsning, ved en initial faktor VIII konsentrasjon på 100 IU/ml.

TABELL XII – Preparat

	7A	7B
Natriumklorid, mg/ml	18	18
Kalsiumkloriddihydrat, mg/ml	0,5	0,5
Polysorbate 80, mg/ml	0,2	0,2
Histidin, mg/ml	3	-

- Proteinformuleringene ble lagret ved +25°C og ble analysert på dag 0 og etter 3 og 7 døgn med den kromogene analysen, beskrevet i den eksperimentelle delen ovenfor. Resultatene er vist i tabell XIV som prosentandel av initial verdi.

TABELL XIV – Resultater

Faktor VIII aktivitet over tid (døgn), (% av initial verdi)				
		0	3	7
7A	25°C	100	81	72
7B	25°C	100	95	90

- Resultatene i eksempel 7 viser at en formulering uten histidin beskytter faktor VIII bedre enn en formulering som inneholder histidin.

EKSEMPEL 8

- Den rekombinante faktor VIII ble fremstilt i henhold til beskrivelsen i den eksperimentelle delen ovenfor. Dette forsøk undersøker formuleringer som har arginin som både kryo-/lyo-beskyttelsesmiddel, fyllstoff og ionestyrketilveiebringende middel. Formuleringene ble undersøkt for faktor VIII gjenvinning i frysetørkede formuleringer ved en initial konsentrasjon på 160 IU/ml. Preparatene som ble undersøkt er vist i tabell XV.

TABELL XV – Preparat

	8A
Arginin HCl, mg/ml	70
Kalsiumkloriddihydrat, mg/ml	0,5
Poloxamer 188, mg/ml	2
Natriumcitratdihydrat, mg/ml	2

1,5 ml prøvemengder av oppløsningene ble frysetørket i en frysetørker med laboratorieskala. De frysetørkede prøvene ble lagret i opp til 9 måneder ved +5°C, +25°C og +40°C for å evaluere proteinaktiviteten over tid. Prøvene ble rekonstituert i 1,5 ml vann for injeksjoner og analysert med den kromogene analysen, som beskrevet i den eksperimentelle delen ovenfor. Resultatene er oppsummert i tabell XVI, som prosentandel av den initiale verdien.

10 TABELL XVI – Resultater

		Faktor VIII aktivitet over tid (måneder), (% av initial verdi)					
		0	1	2	3	6	9
8A	5°C	100	88	n.a.	98	85	92
	25°C	100	83	n.a.	97	81	80
	40°C	100	85	79	85	n.a.	n.a.

n.a. ikke analysert

Resultatene i eksempel 8 viser at arginin kan være en multifunksjonell eksipiens da den virker tilfredsstillende som både fyllstoff og ionestyrketilveiebringende middel, så vel som kryo-/lyo-beskyttelsesmiddel.

Referansliste

- Wang, W., Wang, Y. W. and Kelner, D. N., Coagulation factor VIII: structure and stability (Review), *Int. J. Pharm.*, 259, (2003), 1-15
- 5 Schwegman, J. J., Hardwick, L. M. and Akers, M. J., Practical Formulation and process Development of Freeze-Dried Products, *Pharm. Dev. and Techn.*, 10, (2005), 151-173
- Tang, X. and Pikal, M. J., Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice, *Pharm. Res.*, 21 (2), (2004), 191-200
- 10 Manning, M. C., Patel, K. and Borchardt, R. T., Stability of Protein Pharmaceuticals, *Pharm. Res.*, 6 (11), (1989), 903-918
- 15 Österberg, T., Fatouros, A. and Mikaelsson, M., Development of a Freeze-Dried Albumin-Free Formulation of Recombinant Factor VIII SQ, *Pharm. Res.*, 14, (1997), 892-898
- Alexandridis, P. *et al*, Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association, *Macromolecules*, 27, (1994), 2414-2425
- 20 Kabanov, A. V. *et al*, Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent Probes in Poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) Solutions, *Macromolecules*, 28, (1995), 2303-2314
- 25 Moghimi, S. M. *et al*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1689, 103-113
- Nakashima, K. *et al*, Fluorescence Studies on the Properties of a Pluronic F68 Micelle, *Langmuir*, 10, (1994), 658-661
- 30 Nilsson, M. *et al*, Influence of Polydispersity on the Micellization of Triblock Copolymers Investigated by Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance, *Macromolecules*, 40, (2007), 8250-8258
- 35

PATENKRAV

1. Histidin-fritt preparat, som omfatter:
 - 5 en høyren faktor VIII eller r-faktor VIII;
arginin og sukrose;
et overflateaktivt middel for å forhindre eller i det minste inhibere overflateadsorpsjon
av faktor VIII;
en mengde kalsiumklorid for spesifikk stabilisering av faktor VIII.
- 10 2. Histidin-fritt preparat ifølge krav 1, hvor natriumklorid er til stede som fyllstoff
dersom arginin og sukrose virker som kryo-/lyo-beskyttelsesmiddel men ikke som
fyllstoff.
- 15 3. Histidin-fritt preparat ifølge krav 1, hvor i alt vesentlig ikke noe natriumklorid
er til stede, særlig dersom arginin anvendes som kryo-/lyo-beskyttelsesmiddel og
fyllstoff.
4. Preparat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvor r-faktor VIII er et
20 delesjonsderivat av nativ faktor VIII, som delvis eller fullstendig mangler B-domenet
av nativ faktor VIII.
5. Preparat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4 i frysetørket form.
- 25 6. Preparat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4 i form av en oppløsning som
skal frysetørkes eller i form av en rekonstituert oppløsning fremstilt fra et frysetørket
preparat og fortynningsmiddel.
7. Preparat ifølge hvilket som helst av kravene 2, og 4 til 6, som omfatter som et
30 kryo-/lyo-beskyttelsesmiddel fra 3-15 mg/ml sukrose og 3-15 mg/ml arginin med den
betingelse at minst 6 mg/ml kryo-/lyo-beskyttelsesmiddel er til stede, og som et fyll-
stoff fra 10 mg/ml til 40 mg/ml natriumklorid.
8. Preparat ifølge krav 7, hvor kryo-/lyo-beskyttelsesmiddelet inkluderer både
35 arginin og sukrose, særlig 3 mg/ml til 10 mg/ml, særlig 4,5 mg/ml til 9 mg/ml
sukrose, 3 mg/ml til 8 mg/ml, særlig 4,5 mg/ml til 6,8 mg/ml arginin og 10 til 40
mg/ml NaCl, særlig 15 mg/ml til 23 mg/ml natriumklorid.

9. Preparat ifølge krav 1 eller 2 hvor sukrose er til stede i en mengde av 10 mg/ml til 25 mg/ml og natriumklorid er til stede i en mengde av 10 mg/ml til 40 mg/ml.
- 5
10. Preparat ifølge hvilket som helst av kravene 3 til 6 som omfatter et kryo-/lyo-beskyttelsesmiddel som er sukrose og et fyllstoff som er arginin, særlig fra 5 mg/ml til 25 mg/ml sukrose og fra 20 mg/ml til 70 mg/ml arginin.
- 10
11. Preparat ifølge hvilket som helst av kravene 3 til 6, hvor arginin virker som både fyllstoff og kryo-/lyo-beskyttelsesmiddel, særlig i en mengde fra 20 mg/ml til 70 mg/ml.
- 15
12. Preparat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 11, hvor det overflateaktive middelet er et protein, særlig et rekombinant protein slik som rekombinant fremstilt albumin, særlig i en mengde fra 0,5 mg/ml til 5 mg/ml.
- 20
13. Preparat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 11, hvor det overflateaktive middel er en ikke-ionisk surfaktant, særlig i en konsentrasjon som er lavere enn den kritiske micellekonsentrasjonen.
14. Preparat ifølge krav 13, hvor den ikke-ioniske surfaktant er en polyoksyetylen-polyoksypropylen-kopolymer, særlig i en konsentrasjon fra 0,1 mg/ml til 5 mg/ml.
- 25
15. Preparat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 14, hvor den spesifikke aktiviteten av r-faktor VIII er ≥ 5000 IU/mg protein.