



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
А61К 9/16 (2019.05); А61К 38/36 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2017146990, 06.06.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.06.2016

Дата регистрации:
10.10.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
10.06.2015 US 62/173,726

(43) Дата публикации заявки: 10.07.2019 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 10.10.2019 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 10.01.2018

(86) Заявка РСТ:
EP 2016/062775 (06.06.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/198351 (15.12.2016)

Адрес для переписки:
123242, Москва, пл. Кудринская, 1, а/я 35,
"Михайлюк, Сороколат и партнеры -
патентные поверенные"

(72) Автор(ы):

**ТОМЕ АЛЬКАЛЬДЕ Хуан (ES),
ВИНДАБ Норберт (DE),
ЛИФКЕ Мелани (DE),
БЕНЕДИКТ Анне (DE),
МЮЛЛЕР-АЛЬБЕРС Джессика (DE),
ТИС Том (US),
УЛЛЬРИХ Зузанне (DE),
ЭНГЕЛЬ Андреа (DE),
ГЕРМЕР Маттиас (DE),
КИСТНЕР Стеффен (DE),
ДАУФЕНБАХ Дженс (DE)**

(73) Патентообладатель(и):
ЭВОНИК РЁМ ГМБХ (DE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: EP 0805678 A1, 12.11.1997. US 2011/
142930 A1, 16.06.2011. EP 2201940 A1, 30.06.2010.
WO 97/44015 A1, 27.11.1997. US 2014/356437 A1,
04.12.2014. RU 2198678 C2, 20.02.2003. RU
2235539 C1, 10.09.2004. RU 2207845 C2,
10.07.2003.

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОРОШКА, СОДЕРЖАЩЕГО БЕЛОК, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИЙ СОБОЙ
ФАКТОР СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, И ПОЛИМЕР НА ОСНОВЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения порошка, порошку для лечения связанных со свертыванием крови форм недостаточности или заболеваний, фармацевтической композиции, содержащей указанный порошок, а также применению порошка для получения фармацевтической композиции, подходящей для лечения заболевания или генетического нарушения, ассоциированного с белком, представляющим собой фактор свертывания крови человека. Способ получения порошка,

содержащего один или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека, и полимер на основе молочной кислоты, включает следующие стадии: смешивания и диспергирование в воде полимера на основе молочной кислоты с размером частиц d_{50} в диапазоне 0,1-2 мкм и одного или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека; высушивания дисперсии при температуре не более 45°C; прессования высушенной из дисперсии массы;

измельчения спрессованной, высушенной из дисперсии массы в порошок с размером частиц d_{50} в диапазоне от более 0,5 до не более 5 мкм. Полимер на основе молочной кислоты представляет собой сополимер, полимеризованный из звеньев лактида и гликолида. Один или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека, выбраны из группы, включающей фактор VIII = антигемофильный фактор А, фактор IX = антигемофильный фактор В, фактор фон Виллебранда или любые их комбинации.

Стадия с) прессования высушенной массы осуществляется с силой сжатия от 0,2 до 2 кН. Технический результат – получение порошка, подходящего для суспендирования в воде для инъекций, предпочтительно для внутривенных инъекций, в организм человека; разработка мягкого способа получения указанного порошка, сохраняющего терапевтическую или каскадную активность в отношении свертывания крови белка, представляющего собой фактор свертывания крови, без потерь активности или с небольшими потерями. 4 н. п. ф-лы, 8 з.п. ф-лы, 18 табл.

RU 2702740 C2

RU 2702740 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 9/16 (2019.05); A61K 38/36 (2019.05)(21)(22) Application: **2017146990, 06.06.2016**(24) Effective date for property rights:
06.06.2016Registration date:
10.10.2019

Priority:

(30) Convention priority:
10.06.2015 US 62/173,726(43) Application published: **10.07.2019 Bull. № 19**(45) Date of publication: **10.10.2019 Bull. № 28**(85) Commencement of national phase: **10.01.2018**(86) PCT application:
EP 2016/062775 (06.06.2016)(87) PCT publication:
WO 2016/198351 (15.12.2016)

Mail address:

123242, Moskva, pl. Kudrinskaya, 1, a/ya 35,
"Mikhajlyuk, Sorokolat i partnery - patentnye
poverennye"

(72) Inventor(s):

**TOME ALCALDE, Juan (ES),
WINDHAB, Norbert (DE),
LIEFKE, Melanie (DE),
BENEDIKT, Anne (DE),
MULLER-ALBERS, Jessica (DE),
TICE, Tom (US),
ULLRICH, Susanne (DE),
ENGEL, Andrea (DE),
GERMER, Matthias (DE),
KISTNER, Steffen (DE),
DAUFENBACH, Jens (DE)**

(73) Proprietor(s):

EVONIK ROHM GMBH (DE)**(54) METHOD OF PRODUCING POWDER CONTAINING PROTEIN WHICH IS HUMAN BLOOD COAGULATION FACTOR AND LACTIC ACID-BASED POLYMER**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to a method of producing powder, a powder for treating blood coagulation forms of insufficiency or diseases, a pharmaceutical composition containing said powder, as well as using powder for preparing a pharmaceutical composition suitable for treating a disease or genetic disorder associated with a protein which is a human coagulation factor. Method for producing powder containing one or more proteins representing a human blood coagulation factor and a lactic acid-based polymer involves the following steps: mixing and dispersing in

water a polymer based on lactic acid with particle size d_{50} in range of 0.1–2 μm and one or more proteins representing the human blood coagulation factor; drying dispersion at temperature of not more than 45 °C; pressing the mass dried from the dispersion; grinding of pressed, dried from dispersion mass into powder with particle size d_{50} in the range from more than 0.5 to not more than 5 μm . Polymer based on lactic acid is a copolymer polymerised from lactide and glycolide links. One or more proteins representing the human blood coagulation factor are selected from a group comprising factor VIII = anti-haemophilic factor A, factor IX =

anti-hemophilic factor B, von Willebrand factor or any combination thereof. Stage c) pressing of dried mass is carried out with compression force from 0.2 to 2 kN.

EFFECT: technical result is obtaining a powder suitable for suspension in water for injections, preferably for intravenous injections, into the human

body; development of a soft method of producing said powder, preserving therapeutic or cascade activity with respect to blood coagulation protein, which is a blood coagulation factor, without loss of activity or with low losses.

12 cl, 18 tbl

R U 2 7 0 2 7 4 0 C 2

R U 2 7 0 2 7 4 0 C 2

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области порошков, содержащих белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, и полимер на основе молочной кислоты.

5 Предпосылки создания изобретения

В EP 1283699B1 описаны инъекционные суспензии с улучшенными свойствами в отношении способности к введению посредством инъекции. Раскрытые композиции являются подходящими для инъекции в организм хозяина через иглу с диаметром в диапазоне от 18 до 22 калибра. В композициях могут быть раскрыты микрочастицы
10 на основе полимолочных кислот, где активное средство диспергировано или растворено. Массовый медианный диаметр указанных микрочастиц может находиться в диапазоне 20-150 мкм.

В US2012/0004323A1 описаны способы обработки имплантатов для термически нестабильных и других биоактивных средств и имплантатов, полученных для них.
15 Способ включает смешивание композиции, содержащей биорезорбируемый полимер, и биоактивного средства с образованием смеси и обработку смеси с получением имплантата при температуре, которая не превышает 70°C. В примерах полимерные частицы сополимера лактида и гликолида измельчают в замороженном состоянии в порошок. Альбумин бычьей сыворотки (BSA) добавляли в виде порошка к порошку
20 полимера и смешивали с использованием стеклянных ступки и пестика. Смесь спрессовывали в таблеточном прессе с получением имплантата. Смешивание и прессование предпочтительно осуществляют при комнатной температуре или ниже. Имплантаты обладали минимальной твердостью (разрывное давление) 25 фунтов. При испытании на высвобождение имплантаты высвобождают BSA до 100% в течение
25 2 дней. Имплантаты, которые изначально были покрыты погружением в органических растворителях, например, в дихлорметане, высвобождали BSA значительно медленнее, например, только 50% через 7 дней.

Комплекс из фактора VIII и фактора фон Виллебранда (vWF) состоит из двух молекул из фактора VIII и фактора фон Виллебранда (vWF) с различными физиологическими
30 функциями. Если вводят с помощью инъекции фактор VIII, он связывается в кровотоке с фактором фон Виллебранда (vWF), что активирует фактор VIII. Активированный фактор VIII действует в качестве кофактора активированного фактора IX и ускоряет образование активированного фактора X (фактора Xa) из фактора X. Фактор Xa активирует протромбин до тромбина, который освобождает фибрин из фибриногена,
35 что начинает процедуру свертывания крови.

Наemoclin® представляет собой коммерчески доступный препарат на основе фактора VIII человека, производимый Biotest AG, Драйайх, Германия, полученный из сыворотки крови человека. Публичная информация доступна на веб-сайтах Института Пауля Эрлиха (Paul-Ehrlich-Institut), Германия и Министерства здравоохранения Германии
40 (см., например, <http://www.pei.de/SharedDocs/Arzneimittel/am-aus-blut/gerinnungsfaktor/16841-00-00.html>). Наemoclin® в настоящее время доступен в трех концентрациях Наemoclin® SDH 250, 500 и 1000 (со ссылкой на международные единицы (МЕ) фактора VIII). Помимо фактора VIII Наemoclin® содержит глицин, хлорид натрия, цитрат натрия, хлорид кальция и воду в качестве носителя для инъекции. Наemoclin® рекомендован
45 для лечения гемофилии А (наследственный дефицит фактора VIII). Продукт содержит фактор фон Виллебранда (vWF) в отличной от физиологической концентрации и, следовательно, не рекомендован для лечения болезни фон Виллебранда.

Цель и решение

Целью было обеспечение способа получения состава на основе белка, представляющего собой фактор свертывания крови человека, с использованием полимера на основе молочной кислоты. Порошок должен быть подходящим для суспендирования в воде для инъекции, предпочтительно для внутривенной инъекции, в организм человека. Полученный порошок должен быть подходящим для лечения связанных со свертыванием крови форм недостаточности или заболеваний. Способ должен обеспечивать порошок, который содержит один или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека, в наноструктурированной матрице и высвобождает эти белки на продолжительной основе. Сам по себе способ должен представлять собой мягкий способ, который сохраняет терапевтическую или каскадную активность в отношении свертывания крови белка, представляющего собой фактор свертывания крови, без потерь активности или с небольшими потерями.

Цель была достигнута следующим образом.

Способ получения порошка, содержащего один или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека, и полимер на основе молочной кислоты, включающий следующие стадии:

а) смешивание и диспергирование белка, представляющего собой фактор свертывания крови человека, и полимера на основе молочной кислоты с размером частиц d_{50} в диапазоне 0,1-2 мкм и одного или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека, в воде,

б) высушивание дисперсии,

с) прессование высушенной из дисперсии массы,

д) измельчение спрессованной, высушенной массы дисперсии в порошок с размером частиц d_{50} в диапазоне от более 0,5 до не более 5 мкм.

Преимущественные эффекты

Раскрытый в данном документе способ обеспечивает порошок, содержащий один или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека, и полимер на основе молочной кислоты, который может быть суспендирован в воде в виде фармацевтической композиции, подходящей для инъекции, предпочтительно внутривенной инъекции, с неожиданно повышенным периодом полужизни включенного в состав на основе белка(белков), представляющего(представляющих) собой фактор свертывания крови человека.

Подробное описание

Измерение размера частиц

Определение размера частиц, в частности, размера частиц на стадии а) и стадии d), раскрытых в данном документе, можно осуществлять в соответствии с Фармакопеей Соединенных Штатов 36 (USP) раздел <429> и Европейская фармакопеей 7.0 (EP) раздел 2.9.31. Распределение частиц по размерам определяют с использованием инструмента для измерения лазерного рассеяния (например, Fa. Sympatec GmbH, тип HELOS, оснащенный установкой для сухого диспергирования RODOS). Способ лазерной дифракции основан на явлении, при котором частицы рассеивают свет во всех направлениях с распределением интенсивности, которое зависит от размера частиц. Иллюстративный образец, диспергированный в соответствующей концентрации в подходящей жидкости или газе, пропускают через пучок источника монохромного света, как правило, исходящего из лазера. Свет, рассеянный частицами под различными углами, измеряют с помощью многоэлементного детектора, а затем числовые значения относительно распределения интенсивности рассеянного света записывают для последующего анализа. Числовые значения рассеяния затем трансформируют с

использованием соответствующей оптической модели и математической процедуры с получением доли от общего объема для дискретного числа размеров, образующего объемное распределение частиц по размерам (например, d_{50} или $d_{(0,5)}$ описывает диаметр частицы, соответствующий 50% от кумулятивного распределения по меньшему размеру; d_{90} или $d_{(0,9)}$ описывает диаметр частицы, соответствующий 90% от кумулятивного распределения по меньшему размеру). Предпочтительно, определение распределение частиц по размеру можно осуществлять с помощью Beckman Coulter® LS.

Определения

Термин «комнатная температура» в контексте настоящего изобретения может подразумевать 20-25°C, приблизительно 22°C или 22°C.

Термин «вода» предпочтительно означает деминерализированную воду или чистую воду. Применение «воды» в форме водных растворов, таких как физиологический раствор или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), может быть возможно, но является менее предпочтительным в связи с риском возможных вызванных ионами побочных эффектов.

Способ

Способ получения порошка, содержащего один или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека, и полимер на основе молочной кислоты, включает стадии а)-d). Применения органических растворителей, которые могут инактивировать или снижать биологическую активность одного или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека, избегают. Следовательно, способ предпочтительно не включает какое-либо добавление органических растворителей в концентрациях, которые могут инактивировать или снижать биологическую активность одного или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека, или совсем не включает органические растворители.

Стадия а)

На стадии а) полимер на основе молочной кислоты с размером частиц d_{50} в диапазоне 0,1-2, 0,2-1,5, 0,3-1,2, 0,6-1,0 мкм и белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, смешивают и диспергируют в воде.

Предпочтительно белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, содержится в препарате на основе плазмы крови человека. Предпочтительно соотношение между препаратом на основе плазмы крови человека, который содержит белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, и полимером на основе молочной кислоты составляет от 30:70 до 1:99, от 20:80 до 2:98, 15-85 до 5:95 частей по весу. Оптимальное значение для фактора VIII, содержащегося в препарате на основе плазмы крови человека (в форме Наеmоctin®), и сополимера лактида и гликолида, при отношении лактида/гликолида 50:50, составляло приблизительно 10:90 частей по весу. При данном значении или приблизительно при данном значении была найдена оптимальная однородность для смеси на стадии b) (измеренная с помощью анализа EDX) и оптимальном значении периода полужизни порошка со стадии d) (измеренном с помощью хромогенного анализа BIOPHEN® для фактора VIII) (см. примеры).

Стадия b)

На стадии b) дисперсию со стадии а) высушивают с получением высушенной массы. Стадию высушивания можно осуществлять посредством высушивания распылением, предпочтительно при значениях температуры не более 45, не более 40, не более 30°C или от 20 до 30°C. Наиболее предпочтительно стадию высушивания можно осуществлять

посредством лиофилизации. Полученный в результате промежуточный продукт может иметь форму порошка с частицами неправильной формы. Анализ EDX на данной стадии демонстрирует преимущественное однородное распределение, если белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, и полимер на основе молочной кислоты смешивают друг с другом и диспергируют в воде, а затем высушивают посредством лиофилизации.

Стадия с)

На стадии с) высушенную массу, полученную из дисперсии со стадии b), прессуют. Прессование предпочтительно осуществляют в таблеточном прессе со сравнительно низкими значениями давления во избежание или для снижения возможной инактивации одного или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека. Прессование высушенной из дисперсии массы можно осуществлять при силе сжатия от 0,1 до 2 или от 0,2 до 1,8, от 0,3 до 1,0, от 0,4 до 0,6 кН (площадь поперечного сечения 78,54 мм²). Предполагается, что данная стадия прессования имеет важное значение для создания трехмерной структуры полимера на основе молочной кислоты с большой внутренней поверхностью, к которой белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, прикрепляется при высоком уровне загрузки. Таким образом, возможно, ключевым фактором является применение полимера на основе молочной кислоты с наноразмерными частицами, как определено на стадии а).

Предполагаемое взаимодействие белка, представляющего собой фактор свертывания крови человека, и полимера на основе молочной кислоты, вызванное стадией прессования компонентов, становится очевидным при анализе посредством инфракрасной спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (ATR-IR) в диапазоне длин волн полосы амида I, область волнового числа 1500,000-1700,000 [см⁻¹]. Отдельные компоненты, белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, и полимер на основе молочной кислоты по отдельности, по сравнению с спрессованными компонентами демонстрируют очевидно различные спектры поглощения (см. примеры).

Стадия d)

На стадии d) спрессованную, высушенную дисперсию измельчают в порошок с размером частиц d₅₀ в диапазоне от более 0,5 до не более 5, от 0,6 до 3, от 0,8 до 2, от 0,9 до 1,5 мкм. Предпочтительно частицы могут быть правильной сферической формы. Относительно небольшой размер частиц обеспечивает порошок для суспендирования в воде, когда он становится подходящим или легко доступным для парентерального введения, предпочтительно для внутривенной инъекции частиц.

Белки, представляющие собой фактор свертывания крови человека

Один или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека, можно выбрать из фактора I = фибриногена, фактора II = протромбина, фактора III = тканевого фактора, фактора V = проакцелерина, фактора VII = проконвертина, фактора VIII = антигемофильного фактора А, фактора IX = антигемофильного фактора В, фактора X = фактора Стюарта-Прауэра, фактора XI = плазменного предшественника тромбопластина, фактора XII = фактора Хагемана, фактора XIII = фибринстабилизирующего фактора, фактора фон Виллебранда, прекалликреина, антитромбина III, кофактора гепарина II, белка С, белка S, белка Z, ингибитора протеиназы, зависимого от белка Z, плазминогена, альфа-2-антиплазмина плазмы, тканевого активатора плазминогена, урокиназы, ингибитора активатора плазминогена-1 и ингибитора активатора плазминогена-2 или любых их комбинаций.

Белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, может иметь природное происхождение, то есть выделен из плазмы крови человека, или может представлять собой рекомбинантный белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, изготовленный посредством методик рекомбинантной ДНК.

5 Примером белка, представляющего собой фактор свертывания крови человека, природного происхождения, выделенного из плазмы крови человека, является коммерчески доступный продукт Haemoclin®, соответственно, Haemoclin® SDH 250, 500 и 1000 (номер соответствует международным единицам (МЕ) фактор VIII), изготовленный компанией Biotest AG, Германия. Подобные продукты от других
10 производителей также могут быть коммерчески доступны.

Примером рекомбинантного белка, представляющего собой фактор свертывания крови человека, является коммерчески доступный продукт Advate®, соответственно, Advate® 250 (распространяемый компанией Baxter Deutschland GmbH, Германия).

15 Предпочтительно белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, может содержаться в препарате на основе плазмы крови человека.

Предпочтительно белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, содержащийся в препарате на основе плазмы крови человека, может представлять собой фактор VIII (FVIII), фактор IX или фактор фон Виллебранда (vWF) или любую их комбинацию. Предпочтительно отношение vWF/FVIII в препарате на основе плазмы
20 крови человека может составлять 0,1-0,5, 0,2-0,4 международных единиц (МЕ) vWF на 1 МЕ FVIII.

Предпочтительно препарат на основе плазмы крови человека может содержать фактор фон Виллебранда в отличной от физиологической концентрации. Отличная от физиологической концентрация может представлять собой концентрацию, которая не
25 рекомендована для лечения болезни фон Виллебранда. Отличная от физиологической концентрация в международных единицах (МЕ) может быть по меньшей мере в 2, 3, 10, 20, 50 или 100 раз ниже нормальной или средней концентрации или вне диапазона нормальной или средней концентрации фактора фон Виллебранда в плазме крови здорового человека.

30 Предпочтительно препарат на основе плазмы крови человека содержит от 0,05 до 5% по весу фактора VIII человека и от 95 до 99,95% по весу других белков плазмы или других фармацевтических вспомогательных веществ или и того и другого. Такая концентрация может быть определена как физиологическая или терапевтически эффективная концентрация.

35 Подходящий препарат на основе плазмы крови человека, который содержит фактор фон Виллебранда в отличной от физиологической концентрации и фактор VIII человека в физиологической или терапевтически эффективной концентрации (0,3 ЕД vWF/1 ЕД FVIII), может представлять собой коммерчески доступный продукт Haemoclin® SDH 250, 500 и 1000 (номер означает международные единицы (МЕ) фактора VIII),
40 изготовленный компанией Biotest AG, Германия.

Предпочтительно подходящий препарат на основе плазмы крови человека может предусматривать активность белка, представляющего собой фактор VIII человека, составляющую от 25 до 1000, от 100 до 800, от 100 до 300, от 150 до 250 МЕ/мл, при концентрации 100 мг/мл воды.

45 Белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, может представлять собой рекомбинантный белок, изготовленный посредством методик рекомбинантной ДНК, например, рекомбинантный фактор VIII. Подходящий препарат на основе рекомбинантного фактора VIII может предусматривать активность белка,

представляющего собой фактор VIII человека, в диапазоне от 500 до 1000, от 600 до 900 или от 700 до 800 МЕ/мл при концентрации 100 мг/мл воды.

Полимер на основе молочной кислоты.

Термин «полимер на основе молочной кислоты» (полимолочная кислота) означает полимеры или сополимеры, содержащие полимеризованные мономерные звенья, предпочтительно по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70% по весу или до 100% звеньев полимеризованной молочной кислоты или лактида. Полимер на основе молочной кислоты может характеризоваться размером частиц d_{50} в диапазоне от 0,1 до 2, от 0,2 до 0,15, от 0,5 до 1,2, от 0,6 до 1,0 мкм.

Продукты из полимера на основе молочной кислоты с размерами частиц в необходимом диапазоне являются коммерчески доступными.

Продукты из полимера на основе молочной кислоты, которые не находятся в явной форме порошка или которые состоят из частиц порошка с большими значениями d_{50} , чем необходимо, могут быть модифицированы специалистом до подходящего размера частиц обычными способами, такими как размол или гомогенизация при высоком давлении. Гомогенизацию при высоком давлении предпочтительно осуществляют путем использования оборудования для гомогенизации при высоком давлении. Полимер на основе молочной кислоты можно растворять в небольшом объеме органического растворителя, такого как метилхлорид или этилацетат, с образованием раствора полимера. Затем можно добавлять избыток воды к раствору полимера с образованием эмульсии, которую можно гомогенизировать под давлением. Органический растворитель затем можно удалить из эмульсии с помощью вакуума с получением дисперсии тонкодисперсных полимерных частиц. Частицы полимера на основе молочной кислоты в необходимом диапазоне затем можно получить из дисперсии частиц полимера путем удаления воды на стадии высушивания.

Лактид представляет собой циклический сложный диэфир молочной кислоты. Термин лактид будет означать L-лактид, D-лактид, D,L-лактид или мезо-лактид. Подходящие сомомеры, которые можно полимеризовать с молочной кислотой или лактидом, соответственно представляют собой гликолид, эpsilon-капролактон, триметиленкарбонат или диоксонан. Полимеры или сополимеры на основе молочной кислоты могут также предусматривать АВ- или АВА-блок-сополимеры, содержащие А-блок, выбранный из полимеров или сополимеров на основе молочной кислоты, и В-блок, выбранный из полимера на основе полиэтиленгликоля.

Один или более полимеров на основе молочной кислоты можно предпочтительно выбрать из полимеров или сополимеров на основе молочной кислоты, синтезированных из мономерных компонентов или из смеси мономерных компонентов, выбранных из группы, состоящей из а)-l):

- a) D- и L-лактида,
- b) L-лактида и гликолида,
- c) D,L-лактида и гликолида,
- d) L-лактида и эpsilon-капролактона,
- e) L-лактида и диоксанона,
- f) L-лактида и триметиленкарбоната,
- g) L-лактида, D-лактида, мезо-лактида или D,L-лактида,
- h) L-лактида,
- i) DL-лактида,
- j) статистически распределенных мономерных звеньев L-лактида, D-лактида, мезо-

лактида или DL-лактида и эписилон-капролактона,

к) статистически распределенных мономерных звеньев L-лактида, D-лактида, мезо-лактида или DL-лактида и диоксонана,

5 л) статистически распределенных мономерных звеньев L-лактида, D-лактида, мезо-лактида или DL-лактида и триметиленкарбоната.

Этот вид «полимеров на основе молочной кислоты» представляет собой биоразлагаемые полимеры и хорошо известны из уровня техники, например, из EP1468035, US6706854, WO2007/009919A2, EP1907023A, EP2263707A, EP2147036, EP0427185 или US5610266.

10 Предпочтительно полимер на основе молочной кислоты представляет собой сополимер, полимеризованный из звеньев лактида и гликолида (сополимер лактида-гликолида = PLGA).

Предпочтительно биорезорбируемый сложный полиэфир представляет собой сополимер D,L-лактида и гликолида предпочтительно с характеристической вязкостью (IV) от 0,1 до 2,0, от 0,12 до 1,2, от 0,14 до 1,0, от 0,16 до 0,44, от 0,16 до 0,24 [дл/г].

Предпочтительным биорезорбируемым сложным полиэфиром является сополимер D,L-лактида и гликолида с долей полимеризованных звеньев D,L-лактида:гликолида в сополимере D,L-лактида и гликолида от 80:20 до 20:80, от 70:30 до 30:70, от 60:40 до 40:60 или от 80:20 до 60:40 частей по весу или на моль (молярное отношение), где 20 количества D,L-лактида:гликолида составляют приблизительно 100%.

Предпочтительным биорезорбируемым сложным полиэфиром является сложный полиэфир типа RESOMER[®] RG 503 или RESOMER[®] RG 503 H, которые представляют собой сополимеры D,L-лактида и гликолида с отношением D,L-лактида:гликолида от 45:55 до 55:45 (молярное отношение), предпочтительно 50:50, и с характеристической 25 вязкостью IV в диапазоне от 0,28 до 0,48 или от 0,3 до 0,46 [дл/г].

Предпочтительным биорезорбируемым сложным полиэфиром является сложный полиэфир типа RESOMER[®] RG 502 или RESOMER[®] RG 502 H, которые представляют собой сополимеры D,L-лактида и гликолида с отношением D,L-лактида:гликолида от 45:55 до 55:45 (молярное отношение), предпочтительно 50:50, и с характеристической 30 вязкостью IV в диапазоне от 0,16 до 0,44 или от 0,16 до 0,24 [дл/г].

Биорезорбируемый сложный полиэфир может характеризоваться температурой стеклования T_g от приблизительно 30 до 60, от 35 до 55°C. Температура стеклования может быть предпочтительно определена в соответствии с Фармакопеей Соединенных 35 Штатов 36 (USP) раздел <891>, Европейской фармакопеей 7.0 (EP) раздел 2.2.34 и в соответствии с DIN 53765:1994-03 (D).

Термин «биорезорбируемый» во фразе «биорезорбируемый сложный полиэфир» означает, что сложный полиэфир, который предпочтительно представляет собой полимер на основе молочной кислоты, после имплантации или инъекции в организм 40 человека или организм животного в контакте с физиологическими жидкостями разлагается на олигомеры в ходе медленной гидролитической реакции. Конечные продукты гидролиза, такие как молочная кислота или гликолевая кислота, метаболизируются до диоксида углерода и воды. Другими заменяемыми выражениями для термина «биорезорбируемый сложный полиэфир», которые зачастую применяются, являются «резорбируемый сложный полиэфир», «биоразлагаемый сложный полиэфир» 45 или «абсорбируемый сложный полиэфир».

Порошок

В настоящую заявку включен порошок, получаемый или полученный в ходе

раскрытого способа, с размером частиц d_{50} в диапазоне от более 0,5 до не более 5 мкм, от 0,6 до 3, от 0,8 до 2, от 0,9 до 1,5 мкм, содержащий белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, и полимер на основе молочной кислоты.

Фармацевтическая композиция

5 В настоящей заявке также раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая раскрытый порошок в сухой, диспергированной или растворенной форме. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать воду в качестве жидкости-носителя для диспергированной или растворенной формы и/или фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как соли, буферы или стабилизаторы. Заявка включает применение порошка для получения фармацевтической

10 композиции, подходящей для лечения заболевания или генетического нарушения, связанного с белком, представляющий собой фактор свертывания крови человека.

Примеры

Вещества

15 Таблица 1. Химические соединения, применяемые для получения двухкомпонентных смесей

Вещество	Поставщик
20 PLGA (RESOMER [®] RG 503 Н)	Evonik Industries AG (Дармштадт, Германия)
Намоctin [®] SDH 250/500/1000	Biotest AG (Драйайх, Германия)
TRIS 99%, Ph. Eur.	Carl Roth GmbH & Co. KG (Карлсруэ, Германия)
Хлорид натрия, р. А.	Merck KGaA (Дармштадт, Германия)
25 Хлористоводородная кислота, 1 н. (Titrisol)	Merck KGaA (Дармштадт, Германия)
Этилацетат	Avantor Performance Materials Deutschland (Грисхайм, Германия)
30 Вода для клеточной культуры	Merck Millipore (Дармштадт, Германия)
Advate [®] 250	Baxter Deutschland GmbH (Унтершлайсхайм, Германия)

Таблица 2. Химические соединения для получения измельченных образцов

Вещество	Поставщик
35 Препарат на основе частиц PLGA LSB 5050 DLG 2A (LAKESHORE BIOMATERIALS [™]), размер частиц составлял $d_{50} = 741$ нм	Evonik Degussa Corporation (Бирмингем, США)
40 Намоctin [®] SDH 1000	Biotest AG (Драйайх, Германия)
FIX= фактор IX (1000 ME)	Biotest AG (Драйайх, Германия)
45 vWF=фактор фон Виллебранда (1000 ME)	Biotest AG (Драйайх, Германия)
Вода для клеточной культуры	Merck Millipore (Дармштадт, Германия)

Таблица 3. Химические соединения для определения характеристик образца

Вещество	Поставщик
HYDRANAL [®] Titrant 2 с растворителем HYDRANAL [®]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Тауфкирхен, Германия)
Формаид	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Тауфкирхен, Германия)
Вода для клеточной культуры	Merck Millipore (Дармштадт, Германия)
Хромогенный анализ фактора VIII:C; BIOPHEN [®]	CoaChrom Diagnostica GmbH (Мария Энзерсдорф, Австрия)
Не содержащая фактор VIII плазма, CryoCheck [®]	CoaChrom Diagnostica GmbH (Мария Энзерсдорф, Австрия)
Концентрат фактора VIII свертывания человека BRP	EDQM Совет Европы (Страсбург, Франция)
Уксусная кислота	Merck KGaA (Дармштадт, Германия)
Раствор Бредфорда для определения белка	AppliChem GmbH (Дармштадт, Германия)

Таблица 4. Устройства, применяемые в способе получения

Устройство	Поставщик
Эксцентриковый однопуансонный таблеточный пресс ERWEKA EP-1, инструмент настроен для 10 мм круглых двояковыпуклых таблеток	Erweka GmbH (Хойзенштамм, Германия)
Ламинарный шкаф HERA Safe 2020	Thermo Fisher Scientific GmbH (Драйайх, Германия)
Варио-планетарная мельница PULVERISETTE 4	Fritsch GmbH (Идар-Оберштайн, Германия)
Лабораторные весы Sartorius ME215S-OCE	Sartorius AG (Гёттинген, Германия)
Лиофилизатор EPSILON 2-6 D	Martin Christ GmbH (Остероде-ам-Гарц, Германия)
Ручной пресс Qwik Handi-Press с комплектом 7 мм штампов	Thermo Spectra-Tech Inc. (Шелтон, США)

Таблица 5. Устройства, применяемые для аналитического определения характеристик (биологической/физико-химических)

Устройство	Поставщик
Лазерный дифракционный анализатор размера частиц, Beckman Coulter LS	Beckman Coulter GmbH (Крефельд, Германия)
Компактный титратор Карла Фишера	Mettler-Toledo GmbH (Гисен, Германия)
Сканирующий электронный микроскоп JEOL JSM-840A-Point с установкой для EDX INCA 200	Point Electronic GmbH (Галле, Германия)
Устройство для напыления Polaron	Bio-Rad Laboratories GmbH (Мюнхен, Германия)
Ротационный микротом	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Вецлар, Германия)
Мультипланшетное считывающее устройство TECAN Infinite 200 Pro	Tecan Group Ltd. (Меннедорф, Швейцария)
Микропипетка 2-20 мкл, 20-100 мкл, 100-1000 мкл	Eppendorf AG (Гамбург, Германия)
Нагревательный термошейкер HTMR 133	DITABIS Digital Biomedical Imaging Systems AG (Пфорцхайм, Германия)
96-луночные микропланшеты для клеточной культуры из полистирола, прозрачные	Greiner Bio-One GmbH (Фриккенхаузен, Германия)
Универсальная печь UNB 200	Memmert GmbH + Co. KG (Швабах, Германия)
ИК-Фурье спектрометр Nicolet с дополнительной установкой ATR (Smart Orbit)	Thermo Electron Corporation (Лангенсельболд, Германия)

Способы

Двухкомпонентные смеси для определения активности и кинетических характеристик

Как правило, исходные растворы или дисперсии различных составляющих составов получали и смешивали при достаточных количествах (в смеси 1:1 об./об.) с получением стандартного раствора (Наемостин[®] например, с активностью 100 МЕ), плацебо

(надосадочная жидкость дисперсии PLGA (RESOMER[®] 503 H) 10 мг/1,5 мл), этилацетата (водорастворимая фракция) и различных рабочих смесей (например, смесей двух компонентов, называемых двухкомпонентными смесями) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) с pH 7,4 [монография «4.01.03 Buffer solutions» PhEur], с уровнями активности в диапазоне определения теста активности. Как правило, активность приблизительно 1 МЕ/мл (МЕ = международные единицы) представляла собой предполагаемую цель, поскольку согласно определению это представляет собой необходимый уровень активности FVIII у здоровых людей. Все получения образцов проводили в асептических условиях во избежание загрязнения.

Двухкомпонентные смеси для анализа активности

Определение активности фактора VIII свертывания крови осуществляли с помощью коммерчески доступного набора для хромогенного анализа BIOPHEN[®] фактора VIII:C

от CoaChrom Diagnostica (краткий принцип анализа: при активации тромбином фактор VIII:C образует ферментный комплекс с фактором IXa, фосфолипидами и кальцием, который активирует фактор X до фактора Xa. Фактор Xa отщепляет субстрат и высвобождает pNA/пара-нитроанилин. Количество образованного pNA прямо

пропорционально активности фактора Xa.). Двухкомпонентные смеси Haemostin® с компонентами возможных способов получения составов, а также возможными растворителями для применения в способах получения составов тестировали в качестве образцов для анализов активности. Все образцы получали с конечной ожидаемой концентрацией белка приблизительно 1 мг/мл и ожидаемой активностью приблизительно 100 МЕ/мл.

В качестве стадии подготовки к анализу активности каждый из реагентов R1-3 в наборе повторно растворяли в 2,5 мл воды для клеточной культуры, затем смешивали посредством интенсивного перемешивания и инкубировали в течение 30 мин. при комнатной температуре (18-25°C). Затем реагенты необходимо было предварительно инкубировать при 37°C для теста.

На следующей стадии получали плазму для калибровки для прямой стандартной активности. Следовательно, лиофилизированную плазму повторно растворяли в 1 мл воды для клеточной культуры, затем смешивали посредством интенсивного перемешивания, а также инкубировали в течение 30 мин. при комнатной температуре. Плазма для калибровки в данный момент характеризовалась активностью приблизительно 70%. Данную плазму для калибровки необходимо применять для калибровочной прямой, начиная от 200% активности и включая внутреннее разведение в анализе 1:40. Таким образом, плазму разводили 1:14 (100 мкл плазмы для калибровки, добавленные к 1300 мкл буфера Tris-BSA (R4+); исходя из уравнения 200 x концентрации плазмы/100), тогда как все образцы разводили 1:40. Таким образом, начиная от 200% активности получали следующую калибровочную прямую.

Таблица 6. Стадии разведения для калибровочной прямой VIOPHEN® активности фактора VIII свертывания крови

% FVIII:C	200% раствора VIII:C плазмы для калибровки [мкл]	Буфер Tris-BSA (R4+) [мкл]
200	500	0
100	250	250
50	125	375
25	62,5	437,5
1,25	62,5	875
6,25	62,5	1750
0	0	500

По отношению к 96-луночному планшету применяли 50 мкл/лунку каждой концентрации в трех повторностях; в качестве образцов для вычитания фона применяли дополнительные три лунки с 50 мкл буфера Tris-BSA R4+.

Относительно получения тестовых образцов, их всех разбавляли до концентрации 0,2-2 МЕ/мл перед осуществлением анализа. Таким образом, образцы Haemostin® сначала разбавляли 1:100 (ожидаемая активность 1 МЕ/мл) в буфере Tris-BSA. Кроме того, каждый образец дополнительно разбавляли 1:40 в связи с внутренним разведением

в анализе (см. калибровочную прямую с плазмой в качестве калибровки). Снова в 96-луночные планшеты добавляли три повторности по 50 мкл на лунку.

После применения всех образцов, контролей и построения калибровочной прямой по отношению к 96-луночному планшету осуществляли следующие стадии анализа:

- 5 • добавление 50 мкл R1 (реагент 1 из набора, фактор X человека и ингибитор полимеризации фибрина, предварительно инкубированный при 37°C);
- добавление 50 мкл R2 (реагент 2 из набора, фактор IXa, с тромбином, фосфолипидами и кальцием, предварительно инкубированный при 37°C), инкубация в течение 5 мин. при 37°C;
- 10 • добавление 50 мкл R3 (реагент 3 из набора, специфический хромогенный субстрат фактора Xa, предварительно инкубированный при 37°C), инкубация в течение точно 5 мин. при 37°C, добавление 50 мкл уксусной кислоты, 20%.

Измерение значений поглощения необходимо осуществлять в течение 2 ч. при 405 нм посредством мультипланшетного считывающего устройства.

- 15 Для анализа данных поглощение буфера Tris-BSA (R4+) вычитали из всех образцов, в том числе из серии для калибровки, и рассчитывали средние значения. После получения калибровочной прямой значения активности образцов с FVIII:C можно рассчитать с использованием уравнения калибровочной прямой.

Для получения конечных результатов стадии разведения перед анализом (1:100 и 1:20 40) должны учитываться путем использования следующего расчета:

$$\text{Активность [\%]} * 100/40$$

Полученные в результате значения демонстрируют активность образцов.

Лиофилизация состава на основе фактора свертывания крови/PLGA и контроля с

Haemostin[®]

- 25 В стеклянный стакан, который необходимо было очистить 2-пропанолом, переносили ~ 450 мг предварительно измельченного продукта на основе фактора свертывания крови (например, Haemostin[®]) перед добавлением ~ 4,09 г PLGA (LSB 5050 DLG 2A, d50 = 741 нм). После добавления ~ 70 мл воды в клеточную культуру и аккуратного
- 30 ручного вращения полученную суспензию необходимо было количественно загружать (макс. 5 мл, макс. высота столба жидкости для обеспечения надлежащего процесса лиофилизации) в 30 мл колбы из гранулированного стекла с последующим осуществлением процесса лиофилизации.

- 35 В качестве контроля, один флакон Haemostin[®] SDH 1000 растворяли в 5 мл воды для клеточной культуры и лиофилизировали посредством той же процедуры, что и состав на основе Haemostin[®]/PLGA (LSB 5050 DLG 2A, d50 = 741 нм).

Таблица 7. Настройки устройства для процесса лиофилизации

40

45

Фаза способа	Время (чч:мм)	Температура (°С)	Вакуум (мбар)
Загрузка	00:00	+20	---
Замораживание	02:00	-30	---
Замораживание	02:00	-30	---
Замораживание	01:00	-20	---
Замораживание	00:30	-20	---
Первичное высушивание	00:01	-20	0,85
Первичное высушивание	01:59	-20	0,85
Первичное высушивание	01:00	-10	0,85
Первичное высушивание	01:00	-10	0,85
Первичное высушивание	01:00	0	0,85
Первичное высушивание	10:00	+10	0,85
Вторичное высушивание	00:01	+10	0,001
Вторичное высушивание	00:59	+10	0,001

Конечное хранение полученного лиофилизированного состава должно происходить в тех же 30 мл стеклянных колбах, закрытых крышками из бутилкаучука и алюминиевым уплотнением крышки при температуре от +2°С до +8°С.

Анализ с помощью энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDX) (состав на основе Naemostin®)

Измерение EDX осуществляли с использованием сканирующего электронного микроскопа, включающего особую установку EDX.

Таблетки, полученные из Handi-Press непосредственно фиксировали на алюминиевой пластине для образцов, содержащей самоклеющуюся графитовую накладку, и обрабатывали паром в течение определенного времени с тонким слоем углерода. Затем измеряли поверхность, в то время как для срезанной поверхности таблетку разрезали с использованием микротомы во избежание искажений или теневого эффекта в ходе анализа EDX.

Таблетирование лиофилизированного состава на основе продукта из фактора свертывания крови/PLGA

Перед таблетированием все части устройства однопуансонного таблеточного пресса, которые контактируют с ингредиентами, необходимо было очистить 2-пропанолом во избежание микробиологического загрязнения конечных таблеток. Затем ~ 200 мг 90% состава в виде лиофилизата необходимо вручную загружать (с использованием шпателя) в нижний пуансон в положении загрузки (самое нижнее положение в цикле) и спрессовывать с получением таблеток.

Настройки глубины хода/сжатия верхнего пуансона регулировали до приблизительно 1,25 с получением слабо спрессованных таблеток; настройки верхнего пуансона регулировали до приблизительно 2,00 с получением сильно спрессованных таблеток. Приложенные давления для прессования таблеток находились в диапазоне 0,4-0,6 кН.

Измельчение улучшенного лиофилизированного 90% состава

Размольные чаши и размольные шары тщательно очищали и стерилизовали в

автоклаве перед процессом измельчения во избежание микробиологического загрязнения конечного измельченного продукта; стадию заполнения чаши тестовым материалом, а также отбор образцов (конечный измельченный продукт/аналитический образец) также необходимо осуществлять в асептических условиях.

5 Как минимум примерно 2 г полученных таблеток на основе факторасвертывания крови/PLGA (LSB 5050 DLG 2A, $d_{50} = 741$ нм) загружали в стерильные размольные чаши и упаковывали в PE пакеты в целях безопасности. После закрытия размольные чаши можно переносить из стерильной рабочей среды. После установки готовых к применению размольных чаш в устройство можно осуществлять процесс измельчения, как описано в таблице 8.

10 Таблица 8. Технологические параметры способов измельчения (сильного и мягкого)

15 Параметр	Настройки для условия измельчения 1 (сильного)	Настройки для условия измельчения 2 (мягкий)
Размольная чаша	Объем 45 мл	Объем 45 мл
Размольные шары	190 штук на чашу; 5 мм, оксид циркония	190 штук на чашу; 5 мм, оксид циркония
20 Цикл	1 x 1 мин.	1 x 1 мин.
Относительное соотношение поддерживающих дисков	1:-2	1:-1

25 В заключение, содержание воды в полученном измельченном составе должно составлять меньше или равно 3%, как определено посредством титрования Карла-Фишера.

Определение распределения частиц по размерам

30 Определение распределения частиц по размерам осуществляли с помощью Beckman Coulter[®] LS. В таблице 9 представлен обзор настроек устройства, которые применяли для измерения образцов.

Таблица 9. Установки устройства Beckman Coulter LS 13 320

35 Параметр	Настройки
Диапазон анализа размера частиц	от 0,4 мкм до 2000 мкм
Модуль для образцов	Модуль для микрообъемов жидкостей (MLM)
40 Источник освещения для дифракции	Твердое состояние (780 нм)
Влажность	от 0% до 90%, без конденсации
Температурный диапазон	от 10°C до 40°C
45 Обычное время анализа	от 15 с до 90 с

Буфер TRIS с pH 7,9, воду для клеточной культуры и/или Tween[®] 20 (10% вес/вес)

применяли в ходе проекта в качестве образцов для вычитания фона и суспензионной среды. Образец (конец в виде шпателя) необходимо суспендировать в предпочтительной суспензионной среде перед измерением. При необходимости осуществляли частично короткую ультразвуковую обработку образцов, помимо покачивания и вращения.

5 Анализ активности относительно кинетических характеристик таблеток и измельченных образцов

Определение активности фактора свертывания крови VIII в виде таблетки или измельченного образца осуществляли с помощью коммерчески доступного набора ВЮРНЕН® для хромогенного анализа фактора VIII:С от CoaChrom Diagnostica.

10 Неизмельченные таблетки получали из Наемостин® с различными количествами полимера, а также рекомбинантного FVIII (Advate®) и с vWF или без него, тогда как измельченные образцы содержали только полимер и Наемостин®. Каждую таблетку или измельченный образец получали в тройных повторностях и применяли в качестве

15 образцов для анализов активности.
Для осуществления анализа таблетки нарезали на куски с использованием очищенного резака для таблеток и взвешивали до конечной ожидаемой активности белка 1 МЕ/мл, соответственно. Каждый кусок таблетки заполняли 1 мл или 2 мл дефицитной плазмы и инкубировали не более 7 дней (7 дней) в нагревательном термошейкере при 37°C со

20 скоростью 600 об/мин.
Все рабочие стадии осуществляли в асептических условиях во избежание загрязнения плазмы в ходе инкубации. Дефицитную плазму перед применением фильтровали (размер пор 0,2 мкм).

25 Для осуществления каждого анализа применяли новый флакон Наемостин®.

Для калибровочной кривой применяли стандартный концентрат фактора VIII свертывания крови человека BRP от EDQM. Следовательно, лиофилизированный концентрат BRP повторно растворяли в 1 мл воды для клеточной культуры с получением концентрации 10,4 МЕ/мл.

30 Таблица 10. Стадии разведения для калибровочной прямой EDQM для активности фактора VIII свертывания крови

Активность [МЕ/мл]	Концентрат BRP	Дефицитная плазма [мкл]
1	15 мкл соответствует 10,4 МЕ/мл	141
0,5	50 мкл соответствует 1 МЕ/мл	50
0,25	50 мкл соответствует 0,5 МЕ/мл	50
0,125	50 мкл соответствует 0,25 МЕ/мл	50
0,0625	50 мкл соответствует 0,125 МЕ/мл	50
0,03125	50 мкл соответствует 0,0625 МЕ/мл	50

В связи с исходной активностью кинетических характеристик анализа активности, внутреннее разведение в анализе тестовых образцов и контролей были необязательными

для соответствия диапазону определения набора BIOPHEN[®] для хромогенного анализа фактор VIII:С.

Для включения внутреннего разведения в анализе 1:40 каждый тестовый образец, контроль и образец из калибровочной прямой разбавляли дополнительно, что означает 5 мкл образца добавляли к 195 мкл буфера Tris-BSA (R4+); таким образом, 5 мкл дефицитной плазмы в 195 мкл буфера Tris-BSA (R4+) выступали в качестве стандарта.

Анализ активности осуществляли как описано в пункте «Двухкомпонентные смеси для анализа активности».

ATR-IR спектроскопия (инфракрасная спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения)

Небольшое количество сухого образца прессовали на кристалл носителя (алмаз) с определенным активным сопротивлением (200 Ω), с последующим измерением полного спектра при 4000-400 см^{-1} с использованием спектрометра Nicolet FT-IR с дополнительной установкой ATR. Затем для объяснения взаимодействий между применяемыми веществами и/или стадиями способа подробно рассматривали конкретной полосу амида I (1700-1500 см^{-1}), это означало, что шесть интервальных областей с диапазоном длин волн 33,333 см^{-1} фиксировали в качестве точек анализа.

Только PLGA (LSB 5050 DLG 2A, d50 = 741 нм) демонстрирует почти полное отсутствие сигнала в конкретной полосе амида I (1700-1500 см^{-1}). Тем не менее, фоновый шум вычитали из спектра состава 90.

Только Наемостин[®], только фактор IX (FIX) и только фактор фон Виллебранда (vWF) демонстрируют значительный сигнал в конкретной полосе амида I (1700-1500 см^{-1}), который применяли в качестве спектра сравнения для сравнения со спектром из соответствующих составов (все составы 90/10).

Состав 90 (PLGA (LSB 5050 DLG 2A, d50 = 741 нм)+Наемостин[®], 90/10), состав на основе фактора IX (FIX) и состав на основе фактора фон Виллебранда (vWF)

демонстрируют значительный сигнал в конкретной полосе амида I (1700-1500 см^{-1}), что отличается от Наемостин[®] в отдельности.

Полученные в результате значения для образцов в таблицах 16-18 демонстрируют процентную долю каждой области интервалов от общей (100%) измеренной площади пика амида I.

Результаты

Анализ активности и кинетические характеристики

Для анализа совместимости Наемостин[®] с возможными компонентами в возможных способах получения составов, двухкомпонентные смеси Наемостин[®], RESOMER[®] (водную фазу суспензии), этилацетат (водную фазу эмульсии) тестировали в анализах активности.

В таблице 11 показано, что изменения в процедуре анализа приводили к активности нормальной плазмы в диапазоне 80% активности, как ожидалось, что подтверждает отсутствие явных ошибок в процедуре анализа. В целом, результаты

продемонстрировали, что ни один из тестируемых компонентов состава (например,

водная надосадочная жидкость RESOMER[®] 503 Н) не вызывал какого-либо

значительного фонового сигнала в анализе активности. Кроме того, результаты смеси

Наемостин[®] с данными компонентами указывают на склонность к более высоким

значения активности по сравнению с только Наемостин[®] (например, RESOMER[®] 503 Н

+ Haemostin®). Кроме того, присутствие этилацетата приводило к значительному снижению активности практически до нуля.

Таблица 11. Активность двухкомпонентных смесей (1:1) с возможными компонентами состава и отдельными компонентами в качестве контролей.

Образцы (n=3)	Активность (%)
Только Haemostin®	156,9
Нормальная плазма	84,2
Haemostin® + этилацетат (водная фаза)	3,4
Haemostin® + этилацетат (выпаренный)	2,6
RESOMER® 503 Н (водная надосадочная жидкость)	0,2
RESOMER® 503 Н (водная надосадочная жидкость) + Haemostin®	195,8

После первых испытаний на совместимость применяли различные отношения Haemostin®/полимер для получения таблеток. Данные таблетки тестировали в отношении их активности FVIII с целью нахождения оптимального отношения Haemostin®, смешанного и составленного с полимером. Оптимальное отношение должно обеспечивать длительный период полужизни активности FVIII при замедленном высвобождении Haemostin®, одновременно обеспечивая высвобождение, которое было достаточно быстрым для воздействия на активность в течение периода времени 7 дней.

В Table 12 показано, что полимерные отношения 70-98% полимера влияют на активность Haemostin®, как требуется, с оптимальным содержанием полимера 90%.

Таблица 12. Кинетические характеристики активности таблеток с различными отношениями Haemostin®/полимер.

5	10	15	Описание состава (n=3)	Отношение Наемостин® (%)	Отношение PLGA (%)	Таблетирование (вручную с помощью Handi-Press)	Процентная доля оставшегося		
							~1 ч.	2 дня	7 дней
			Наемостин® (раствор)	100			100	83	56
20			Состав 30/Наемостин®	70	30	X	100	81	30
			Состав 50/Наемостин®	50	50	X	100	80	34
			Состав 70/Наемостин®	30	70	X	100	123	73
			Состав 90/Наемостин®	10	90	X	100	206	129
25			Состав 94/Наемостин®	6	94	X	100	168	116
			Состав 98/Наемостин®	2	98	X	100	154	115

Для дополнительной оптимизации состава и для получения состава частиц, подходящих для внутривенного введения (диаметр частицы меньше или равен 1 мкм) 90% состав применяли для осуществления следующих стадий способа и дополнительно упоминается как «состав 90».

Стадия а): в воде получали суспензию смеси 90/10 полимера и Наемостин® с целью получения гомогенной смеси, что обеспечивает сниженные отклонения между различными партиями состава.

Стадия (b): суспензию дополнительно лиофилизировали снова с удалением воды, которая может препятствовать активности FVIII.

Стадия с): лиофилизированный порошок прессовали с обеспечением адгезии компонентов Наемостин® с полимером.

Стадия (d): в качестве конечной стадии способа таблетки измельчали до размера частиц приблизительно 1 мкм для соответствия внутривенному ведению и для обеспечения дополнительной адгезии Наемостин® с полимером.

Однородность, упомянутая на стадии 1 способа, анализировали посредством EDX (анализ энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии). В результате анализа EDX следующие ионы и их распределение в образцах представлены конкретным цветом.

- Красный: кислород
- Черный/серый: углерод
- Зеленый: натрий

- Синий: хлорид

Помимо низкого процентного содержания белка FVIII, присутствующего в Haemostin[®] в целом, остальные ингредиенты в Haemostin[®] представляют собой смесь аминокислот, солей и стабилизаторов. Следовательно, основное внимание было уделено определению натрия (зеленый) и хлорида (синий), которые могут наблюдаться в результатах EDX для Haemostin[®] и не доступны для чистого PLGA (LSB 5050 DLG 2A, d50 = 741 нм).

В некоторых подходах для достижения однородности смеси состава наилучшая однородность полученного состава на основе PLGA (LSB 5050 DLG 2A, d50 = 741 нм) (90%)/Haemostin[®] (10%) была определена после процесса лиофилизации суспензии состава в воде. Haemostin[®] (зеленый и синий) однородно распределен в тестовом образце для EDX.

Получить хорошую однородность на основе способа получения состава посредством смешивания PLGA с просеянным Haemostin[®] не представлялось возможным. Более яркие пятна Haemostin[®] наблюдали на фоне красного сигнала PLGA (LSB 5050 DLG 2A, d50 = 741 нм).

Кроме того, осуществляли измерение размера и распределения частиц; что демонстрировало наилучшее распределение частиц по размеру (d₅₀ составляет приблизительно 1 мкм) для измельченных смесей улучшенного состава таблеток (PLGA (LSB 5050 DLG 2A, d50 = 741 нм) (90%)/Haemostin[®] (10%)) (слабо спрессованные, условие измельчения 2).

Распределение частиц по размерам измельченного состава (PLGA (LSB 5050 DLG 2A, d50 = 741 нм) (90%)/Haemostin[®] (10%)), слабо спрессованные таблетки, условие измельчения 2) после ультразвуковой обработки (1 мин.) в 10% Tween[®] 20 представляло собой d₁₀: 0,574 мкм/d₅₀: 1,252 мкм/d₉₀: 11,89 мкм.

В таблице 13 показано влияние примененных стадий способа на активность Haemostin[®]. Значения AUC демонстрируют снижение активности FVIII в связи с различными условиями осуществления способа, указывая на мягкие условия измельчения как на предпочтительные. Данное частичное снижение активности фактора VIII будет приравнено к регулированию дозы, показанному в таблице 15.

Кроме того, в таблице 13 показано поведение активности в кинетическом периоде 7 дней, явно указывая на улучшенный период полужизни активности FVIII в день 2 (77%) и день 7 (55%) для состава 90/10 (PLGA (LSB 5050 DLG 2A, d50 = 741 нм) (90%)/Haemostin[®] (10%) = «состав 90»), спрессованного при низком давлении и измельченного в мягких условиях. Тем не менее, все стадии процесса имеют положительное влияние на активность, оставшуюся в день 7, по сравнению с контролем Haemostin[®].

Таблица 13. Кинетические характеристики активности образцов состава 90 при различных стадиях способа.

5

10

15

20

25

Стадия получения состава (n=3) Наемостин®	Отношение Наемостин® (%)	Отношение PLGA (%)	Лиофилизация	Таблетирование с помощью однопуансонного таблеточного пресса (слабое прессование)	Таблетирование с помощью однопуансонного таблеточного пресса (сильное прессование)	Мягкое измельчение (1:-1)	Сильное измельчение (1:-2)	Процентная доля оставшегося			AUC относительно контроля Наемостин® (in vitro) 4 дня
								~1 ч.	2 дня	4 дня	
Наемостин®	100							100	70	23	100%
Состав 90	10	90	X					100	63	55	76%
Состав 90	10	90	X	X				100	67	49	85%
Состав 90	10	90	X		X			100	66	59	94%
Состав 90	10	90	X	X			X	100	55	42	25%
Состав 90	10	90	X		X		X	100	68	53	25%
Состав 90	10	90	X	X		X		100	77	55	51%
Состав 90	10	90	X		X	X		100	66	58	51%

30

В таблице 14 показано, что сухое прессование FVIII с PLGA (LSB 5050 DLG 2A, d50 = 741 нм) даже обеспечивало улучшенную активность FVIII рекомбинантного фактора VIII (Advate®) в день 2 кинетики по сравнению с только Advate®. Повышение активности выше 100% для состава 90/Наемостин® в день 2 может объясняться замедленным высвобождением Наемостин® или скорее FVIII из таблетки.

35

Таблица 14. Кинетические характеристики активности только Наемостин® или Advate®, а также их соответствующей таблетки, полученной из смеси полимера с Наемостин® или Advate®.

40

45

Описание состава	Отношение Advate® (%)	Отношение Наемостин® (%)	Отношение PLGA (%)	Таблетирование (вручную с помощью Handi-Press)	Процентная доля оставшегося		
					~1 ч.	2 дня	7 дней
Наемостин® (раствор)		100			100	84	49
Состав 90/Наемостин®		10	90	X	100	206	129
Advate® / Наемостин®	100				100	50	24
Состав 90/Advate® /	10		90	X	100	65	22

Как указано в таблице 13, способ лиофилизации вместе с таблетированием при низком давлении и мягких условиях измельчения в качестве предпочтительного способа получения составов, данный способ дополнительно подтверждался дополнительными повторениями способа и кинетическими характеристиками активности.

На этот раз анализ кинетических характеристик проводился с регулировкой дозы до 1 МЕ/мл в качестве исходной активности, учитывая снижение активности, вызванное применяемыми условиями способа; результаты показаны в таблице 15.

Эта регулировка дозы не изменяла эффект состава на активность FVIII в течение 7-дневного периода.

Таблица 15. Кинетические характеристики активности только Наемостин®, лиофилизованного и измельченного образца смеси состава 90, включая образец с регулировкой дозы.

Описание состава (n=3) с Haemostin®	Отношение Haemostin® (%)	Отношение PLGA (%)	Лиофилизация	Таблетирование с помощью эксцентрикового пресса (слабое прессование)	Измельчение (1:-2)	Измельчение (1:-1)	Процентная доля оставшегося			AUC относительно контроля Haemostin (in vitro) 4 дня	AUC относительно контроля с Haemostin (in vitro) 4 дня
							~1 ч.	2 дня	7 дней		
Haemostin® (раствор)	100						100	70	23	н.д.	н.д.
Состав 90	10	90	X	X		X	100	89	57	н.д.	н.д.
Состав 90 (доведенный до 1 ME)	10	90	X	X		X	100	88	60	81%	153%
Лиофилизированный Haemostin® (in vivo контроль)	100		X				100	73	38	100%	100%

Снова образцы состава 90 демонстрировали более высокие значения активности FVIII в день 2 и 7 кинетики.

Перспективные результаты in vitro для состава 90 также могли подтверждаться 48 ч. исследованием in vivo на мышах, что отображается значительно увеличенной площадью под кривой (значение AUC) в таблице 15.

ATR-IR спектроскопия

Небольшое количество сухого образца прессовали на кристалл носителя (алмаз) с определенным активным сопротивлением (200 Ω), с последующим измерением полного спектра при 4000-400 cm^{-1} с использованием спектрометра Nicolet FT-IR с дополнительной установкой ATR. Затем для объяснения взаимодействий между применяемыми веществами и/или стадиями способа подробно рассматривали конкретной полосу амида I (1700-1500 cm^{-1}), это означало, что шесть интервальных областей с диапазоном длин волн 33,333 cm^{-1} фиксировали в качестве точек анализа. Полученные в результате значения для образцов демонстрируют процентную долю каждой области интервалов от общей измеренной площади пика амида I.

Таблица 16. Интервальные области полосы амида I для состава на основе фактора VIII (FVIII, Haemostin®)/PLGA (LSB 5050 DLG 2A, d50 = 741 нм) (*результат вычитания:

состав - PLGA)

Область волновых чисел (см ⁻¹)	FVIII (%)	Лиофилизированный состав* (%)	Таблетированный состав*(%)	Измельченный состав*(%)
1700,000-1666,667	3,40	5,92	4,64	7,33
1667,667-1633,334	13,91	21,75	19,54	11,84
1633,334-1600,000	22,13	27,53	28,39	27,63
1600,000-1566,667	22,68	20,87	23,09	29,77
1566,667-1533,334	19,89	12,88	13,25	12,35
1533,334-1500,000	17,98	11,05	11,09	11,07

Таблица 17. Интервальные области полосы амида I для состава на основе фактора IX (FIX)/PLGA (LSB 5050 DLG 2A, d50 = 741 нм) (*результат вычитания: состав - PLGA)

Область волновых чисел (см ⁻¹)	FIX (%)	Измельченный состав*(%)
1700,000-1666,667	6,91	12,45
1667,667-1633,334	12,85	19,49
1633,334-1600,000	19,44	24,61
1600,000-1566,667	25,19	22,71
1566,667-1533,334	21,90	13,05
1533,334-1500,000	13,71	7,68

Таблица 18. Интервальные области полосы амида I для состава на основе фактора фон Виллебранда (vWF)/PLGA (*результат вычитания: спектр состава, вычтенного из спектра PLGA в качестве фонового сигнала (практически ноль) для оценки сигналов, относительно образца фактора свертывания крови)

Область волновых чисел (см^{-1})	vWF (%)	Измельченный состав*(%)
1700,000-1666,667	2,89	3,95
1667,667-1633,334	8,54	13,25
1633,334-1600,000	20,28	29,25
1600,000-1566,667	24,90	20,30
1566,667-1533,334	13,90	12,29
1533,334-1500,000	29,50	20,96

В таблицах 16-18 показано зависимость от состава (состав 90%) структура/агрегация - изменения всех трех факторов свертывания крови (FVIII, FIX и vWF). Данные изменения обеспечивают в результате значительный сдвиг интервальных областей в наиболее чувствительной части области высоких энергий полосы амида I приблизительно 1600 см^{-1} , а также более высокие вклады в данную область амида I. В отличие от этого, только PLGA (LSB 5050 DLG 2A, $d_{50} = 741 \text{ нм}$) не демонстрирует сигнал в данной области.

(57) Формула изобретения

1. Способ получения порошка, содержащего один или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека, и полимер на основе молочной кислоты, включающий следующие стадии:

- а) смешивание и диспергирование в воде полимера на основе молочной кислоты с размером частиц d_{50} в диапазоне 0,1-2 мкм и одного или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека,
- б) высушивание дисперсии при температуре не более 45°C ,
- с) прессование высушенной из дисперсии массы,
- д) измельчение спрессованной, высушенной из дисперсии массы в порошок с размером частиц d_{50} в диапазоне от более 0,5 до не более 5 мкм,

при этом полимер на основе молочной кислоты представляет собой сополимер, полимеризованный из звеньев лактида и гликолида,

при этом один или более белков, представляющих собой фактор свертывания крови человека, выбраны из группы, включающей фактор VIII = антигемофильный фактор А, фактор IX = антигемофильный фактор В, фактор фон Виллебранда или любые их комбинации,

при этом на стадии с) прессование высушенной дисперсии осуществляют с силой сжатия от 0,2 до 2 кН.

2. Способ по п. 1, где белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, содержится в препарате на основе плазмы крови человека.

3. Способ по п. 2, где препарат на основе плазмы крови человека содержит фактор фон Виллебранда в отличной от физиологической концентрации.

4. Способ по любому из пп. 2 или 3, где препарат на основе плазмы крови человека содержит 0,05-5% по весу фактора VIII человека и 95-99,95% по весу других белков

плазмы или дополнительных фармацевтических вспомогательных веществ или и того и другого.

5. Способ по любому из пп. 2 или 4, где препарат на основе плазмы крови человека предусматривает 25-1000 МЕ/мл активности белка, представляющего собой фактор VIII человека, при концентрации 100 мг/мл воды.

6. Способ по любому из пп. 2-5, где на стадии а) соотношение между препаратом на основе плазмы крови человека, который содержит белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, и полимером на основе молочной кислоты составляет от 30:70 до 5:95 частей по весу.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, представляет собой рекомбинантный фактор VIII.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где на стадии а) применяют 5-50-кратный избыток воды по весу со смешиванием и диспергированием препарата на основе плазмы крови, содержащего фактор VIII человека, и полимера на основе молочной кислоты.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где на стадии б) высушивание дисперсии осуществляют путем лиофилизации или путем высушивания распылением.

10. Порошок для лечения связанных со свертыванием крови форм недостаточности или заболеваний, получаемый с помощью способа по любому из пп. 1-9, с размером частиц d_{50} в диапазоне от 0,5 до 5 мкм, содержащий белок, представляющий собой фактор свертывания крови человека, и полимер на основе молочной кислоты.

11. Фармацевтическая композиция для лечения связанных со свертыванием крови форм недостаточности или заболеваний, содержащая порошок по п. 10 в сухой, диспергированной или растворенной форме.

12. Применение порошка по п. 10 для получения фармацевтической композиции, подходящей для лечения заболевания или генетического нарушения, ассоциированного с белком, представляющим собой фактор свертывания крови человека.

30

35

40

45