

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

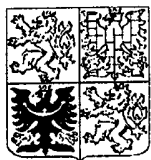
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3429-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25. 04. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.04.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9508785**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18. 03. 98**
(Věstník č. 3/98)

(86) PCT číslo: **PCT/EP96/01733**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/34626**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁶:

A 61 K 39/35

A 61 K 39/36

A 61 K 31/195

(71) Přihlášovatel:

SMITHKLINE BEECHAM P. L. C., Brentford,
GB;

(72) Původce:

Wheeler Alan Worland, Harlow, GB;
Taylor Iain, Harlow, GB;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Farmaceutický prostředek

(57) Anotace:

Farmaceutický prostředek obsahující tyrozin a polymerizovaný alergen, který se připravuje /a/ polymerizací alergenu, /b/ mísením vodného roztoku alergenu s roztokem tyrozinu ve vodném roztoku silné kyseliny, /c/ neutralizací směsi roztoků a tím koprecipitací tyrozinu a polymerizovaného alergenu, a /d/ popřípadě mísením produktu s fyziologicky přijatelným nosičem.

CZ 3429-97 A3

12.01.93

Farmaceutický prostředek

Oblast techniky

Vynález se týká nových prostředků pro použití při desenzitizační terapii pacientů trpících alergií.

5

Dosavadní stav techniky

GB-A-1 492 973 popisuje způsob výroby koprecipitátů tyrozinu, které v sobě mají dispergovány modifikovaný alergen. Alergen byl modifikován působením prostředku, jako je glutaraldehyd, který způsobuje intramolekulární zesíťování a snižuje vzhledem k nemodifikovanému alergenu alergenicitu produktu.

EP-A-0 367 306 a Nakada a další (*Allergy*, 54, [1985] str. 437 a dále) popisují způsoby výroby polymerizovaných alergenů pomocí prodlouženého působení zesíťujícího činidla pro dosažení intermolekulárního zesíťování, následovaného filtrací nebo dialýzou pro odstranění nepolymerizovaného produktu. Polymerizované alergeny se popisují jako alergeny se sníženou alergenitou.

15

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje farmaceutický prostředek obsahující tyrosin a polymerizovaný alergen. Typicky je alergen potažen a/nebo adsorbován na tyrosin, například působením koprecipitace.

20

Alergen může být odvozen z jakékoliv alergizující látky, jako je pyl (např. ambrózie nebo břízy), potraviny, hmyzí jed, plíseň, zvířecí srst nebo roztoči z domácího prachu (*D. farinae* nebo *D.*

25

pteronysinus). Ve zvláštním hledisku se alergen odvozuje z *D. pteronyssinus*. Zde používaný termín „alergen“ zahrnuje směs alergenů, které mohou pocházet z jediného zdroje nebo více zdrojů.

Další hledisko vynálezu poskytuje způsob výroby farmaceutického prostředku podle vynálezu, který zahrnuje (a) polymerizaci alergenu, (b) smísení vodného roztoku alergenu s roztokem tyrozinu ve vodném roztoku silné kyseliny, (c) neutralizaci směsi roztoků a tím koprecipitaci tyrozinu a polymerizovaného alergenu, a (d) popřípadě mísení produktu s fyziologicky přijatelným nosičem. Vhodné fyziologicky přijatelné nosiče zahrnují roztok fenolu ve fyziologickém roztoku a sterilní vodu.

Alergen se polymerizuje působením dialdehydu, jako je glutaraldehyd, ve vodném roztoku při pH 3 až 10, typicky 7 ± 1 , a při teplotě mezi 0 a 100 °C, typicky mezi 4 a 37 °C, po dobu 10 hodin, například přibližně 2 hodiny při pokojové teplotě. Hmotnostní poměr alergenu ke glutaraldehydu je typicky v rozmezí 1 : 25 až 1 : 2, například přibližně 1 : 4, ačkoliv při delší době reakce mohou být použity vyšší poměry alergenu (viz například EP-A-0 367 306, kde se používá poměrů přibližně 3 : 1 a reakční doby přibližně 7 hodin).

Produkt s nízkou molekulovou hmotností se potom odstraní gelovou filtrací nebo dialýzou, například dialýzou s tangenciálním tokem, a produkt se lyofilizuje nebo přímo použije v dalším kroku. Hranice molekulové hmotnosti je přibližně alespoň 100 kD, například alespoň 250 kD, výhodněji 300 kD.

Roztok polymerního alergenu při pH 7 ± 1 , získaný buď jako reakční směs z polymerizačního postupu nebo rozpuštěním pevné látky, se potom mísí s roztokem tyrozinu ve vodném roztoku silné kyseliny. Silnou kyselinou je obvykle anorganická kyselina, s výhodou kyselina chlorovodíková. V tomto kroku používaný roztok polymerizovaného alergenu typicky obsahuje mezi 0,1 µg/ml a

100 µg/ml proteinu alergenu. Hmotnostní poměr alergen : tyrosin ve směsi je typicky v rozmezí $1 : 4 \times 10^5$ až $1 : 4 \times 10^2$.

Výsledná směs roztoků alergenu a tyrozinu se neutralizuje. Pod neutralizací se rozumí nastavení pH na hodnotu v rozmezí 4,0 až 7,5. Je důležité, že nikdy, nebo alespoň ne delší dobu v průběhu neutralizace, nepřekročí pH roztoku výrazně hodnotu 7,5. Tato podmínka může být splněna důkladným mícháním roztoku a použitím pouze požadovaného množství báze v případě potřeby. Pro napomáhání při řízení pH v průběhu kroků mísení a neutralizace mohou být vhodně použity různé pufrovací prostředky. Zvláště vhodným způsobem provádění neutralizace je přivádění oddělených proudů roztoku tyrozinu a kyseliny a neutralizující báze do roztoku alergenu. Rychlosti průtoku přidávaných roztoků se řídí pH-statem, tj. zařízením, které řídí průtok jednoho nebo obou roztoků tak, že pH reakční směsi zůstává v podstatě konstantní a má předem stanovenou hodnotu. Autory vynálezu bylo zjištěno, že optimálních výsledků se obvykle dosahuje při řízení pH v rozmezí 6,5 až 7,5, ačkoliv přesná hodnota pH se může lišit v závislosti na povaze alergenu.

Výsledkem neutralizace je okamžité vysrážení tyrozinu, přičemž roztok alergenu je uzavřen a/nebo adsorbován uvnitř a/nebo na jeho povrch. Po vysrážení směsi se směs buď ihned promyje nebo se před promýváním ponechá stát po dobu několika hodin až jeden nebo dva dny. Je žádoucí dosáhnout pokud možno jemné sraženiny, čehož se dosahuje rychlou neutralizací roztoku ve spojení se silným mícháním při provádění neutralizace.

Výsledná sraženina může být z roztoku odstraněna centrifugací nebo filtrací a před resuspendováním ve fyziologicky přijatelném nosiči, jako je fenol - fyziologický roztok nebo sterilní voda, může být promyta například směsí fenol - fyziologický roztok. Vytvořený injikovatelný prostředek je vhodný pro použití při desenzitizační terapii.

Příklady provedení vynálezu

Předkládaný vynález ilustruje následující příklad:

Neutrální roztok proteinu extrahovaného z *D. pteronyssinus* o koncentraci přibližně 2,5 mg/ml, který byl částečně vyčištěn dialýzou
5 nebo frakcionací, se polymerizuje přidavkem stejného objemu
jednoprocentního (hmotnost/objem) glutaraldehydu a směs se při
pokojové teplotě míchá přibližně 2 hodiny. Reakce se ukončí
přidavkem stejného objemu glycinu o koncentraci 2 % hmotnost/objem
a směs se míchá při pokojové teplotě další 1 hodinu. Nízkomolekulární
10 materiál se odstraní diafiltrací přes membránu s dělením molekulové
hmotnosti při 300 kD. Směs se potom sterilně filtruje a lyofilizuje.

Roztok polymerizovaného alergenu byl připraven buď přímo ze
sterilního filtrovaného roztoku nebo rekonstitucí lyofilizované pevné
látky. Tento roztok obsahoval 10 µg/ml ve fosfátovém pufru s pH 7
15 ± 1. Roztok alergenu byl koprecipitován s tyrozinem současným
přidáváním jednoho objemu L-tyrozinu v HCl (připraveného
rozpuštěním 24 g L-tyrozinu v 3,4 M HCl na objem 100 ml) a jednoho
objemu 3,2 M NaOH ke čtyřem objemům roztoku alergenu za
důkladného míchání. Takto vytvořená suspenze byla zcentrifugována,
20 opakovaně promyta pufrovaným fyziologickým roztokem pro
odstranění kontaminujících látek a resuspendována v původním
objemu pufrovaného fyziologického roztoku při pH 6 ± 1.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický prostředek vyznačující se tím,
5 že obsahuje tyrozin a polymerizovaný alergen.
2. Prostředek podle nároku 1, vyznačující se tím,
že alergen je potažen tyrozinem a/nebo adsorbován na
tyrosin.
10
3. Prostředek podle některého z nároků 1 nebo 2,
vyznačující se tím, že alergen je odvozen
z *D. pteronyssinus*.
- 15 4. Způsob výroby farmaceutického prostředku podle některého
z nároků 1 až 3, vyznačující se tím,
že zahrnuje (a) polymerizaci alergenu, (b) mísení vodného
roztoku alergenu s roztokem tyrozinu ve vodném roztoku silné
kyseliny, (c) neutralizaci směsi roztoků a tím koprecipitaci
20 tyrozinu a polymerizovaného alergenu, a (d) popřípadě mísení
produktu s fyziologicky přijatelným nosičem.
5. Prostředek podle některého z nároků 1 až 3 pro použití
v lékařství.
25
6. Prostředek podle některého z nároků 1 až 3 pro použití při
desenzitizační terapii pacientů trpících alergií.

12.01.98

7. Použití prostředku podle některého z nároků 1 až 3 při výrobě farmaceutického prostředku pro použití při desenzitizační terapii pacientů trpících alergií.

5

Zastupuje: