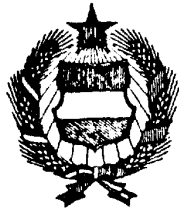


(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11)

196 560

B
Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO,

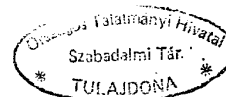
A 61 K 45/02

A bejelentés napja: (22) 1987. II. 4. (21) 385/87

A bejelentés elsőbbsége: (33) DE
(32) 1986. II. 5.
(31) P 36 03 444.4

A közzététel napja: (41) (42) 1987. XI. 30.

Megjelent: (45) 1989. 05. 09.



Feltaláló(k): (72)

dr. Karl Thomae GmbH, Biberach an der Riss, DE

Szabadalmas: (71)

dr. Franz Helmut, Biberach, DE

(54)

Eljárás interferon-alfát tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására

(57)KIVONAT

A találmány stabilizált interferon-alfát tartalmazó, helyileg alkalmazható gyógyszerkészítmény előállítására vonatkozik, oly módon, hogy a készítmény tömegére vonatkoztatva 0,1–10% zselatint, 0,05–0,3% antiadhéziós szert, továbbá 0,1–2,0% cellulóz-származékot vagy poliakrilsav-polimerizátumot vagy 0,1–1,5% poli(vinil-alkohol)-t vagy poli(vinil-pirrolidon)-t, valamint a készítmény 100 g-jára vonatkoztatva $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^{10}$ NE interferon-alfát összekevernek.

A találmány tárgya eljárás interferon-alfát tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására.

Biológiai és kémiai tulajdonságaiktól és szintézisük helyétől függően az emberi interferonokat és az interferonokat általában három csoportra osztjuk, amelyeket interferon-alfának (IFN-alfa), interferon-bétának (IFN-béta) és interferon-gammának (IFN-gamma) nevezünk. Az IFN-alfa, amelyre a találmány vonatkozik, a leukocitákban termelődik, amelyek stimulálás vagy megfelelő induktorokkal (például vírusok vagy poli-I poli-C) végzett indukálás után IFN-alfát termelnek és bocsátanak ki. Megfelelő DNS-szekvenciákkal transzformált baktériumok olyan IFN-alfát tudnak termelni, amelynek biológiai aktivitása analóg az eredeti emberi IFN-alfával, ennek előnye az, hogy igen tisztá és lényegében minden szennyezőtől mentes proteint lehet nyerni viszonylag nagy mennyiségben, amely klinikai alkalmazásra, például különböző vírusfertőzések és rosszindulatú daganatok ellen felhasználható.

Mindenyik ismert interferonnak vírusellenes, sejtburjánzást gátló és – mindegyiknek különböző erősségű – immunmodulátor hatása van. Kezdetben vírusellenes szerként voltak ismertek, mára felismerték, hogy terápiás alkalmazásuk daganatellenes szerként is lehetséges.

A hatás minősége és a mellékhatások erőssége szempontjából különösen jelentős a beadás módja. A hátrányok éppen az interferonok szisztémás adagolásakor szembetűnőek, mivel ekkor nemcsak a célszövetet, hanem az egészséges, nem fertőzött vagy transzformált sejteket vagy szerveket is eléri és hatásukat ott is kifejti, és így olyan mellékhatásokat okoznak, amelyek az intravénás vagy intramuszkuláris adagolás ellen szólhatnak. Emellett a szisztémás alkalmazás nem mindig biztosította a kívánt hatékonyságot. Bár egyes esetekben lehetséges injekció közvetlen beadása, az interferont, illetve az IFN-alfát (amelyre találmányunk vonatkozik) inkább topikálisan alkalmazható készítmények formájában használják vírusokkal vagy tumorokkal összefüggő rosszindulatú vagy más, interferonnal gyógyítható megbetegedések esetében, amelyek külsőleg vagy helyileg (például bőrön, szemben, orrban) kezelhetők. Korábban ismertették az IFN-alfával szinonim humán leukocita interferon különböző topikális alkalmazásait, amelyeknek során különféle rosszindulatú megbetegedéseknél meglepően nagyarányú eredményességet lehetett megállapítani (például Ilic és munkatársai: Lancet, 1022-24, I. kötet, (1981), Ilic és munkatársai: Lancet, 125-27, I. kötet (1981)). Előre látható, hogy az interferon-alfa topikális alkalmazása a jövőben növekvő jelentőséget kap a gyógyászatban különböző vírusokkal vagy tumorokkal összefüggő megbetegedések kezelésében.

Az interferon-alfa és általában az interferonok topikális alkalmazása különböző nehézségeket okoz. A gyógyszerkészítmények formulálásánál szükséges, hogy a biológiailag aktív IFN-alfa stabilitása elég nagy legyen ahhoz, hogy megfelelően hosszú ideig hasson szobahőmérsékleten és a test hőmérsékletén is, illetve egy megfelelő – néhány óra – időszakon keresztül in situ hatásos maradjon. Ismeretes, hogy az IFN-alfa egy hőhatásra igen instabil protein. Igen jelentős, 80%-ig terjedő aktivitásvesztést figyeltek meg 4 °C-on néhány hét alatt olyan humán leukocita interferont tartalmazó gélnél, amelynek gélkomponense

karboxi-metil-cellulóz volt (Moller, B.R. és munkatársai: Obstetrics and Gynecology, 62, 625-629, 1983) és karcinóma topikális kezelésére használták in situ a cervixben.

Az ehhez szükséges stabilizáló komponenseket úgy kell megválasztani, hogy az alkalmazás helyén ne lépjen fel intolerancia és biológiailag aktív idegen anyagok hatása következtében, emellett sem az IFN-alfa behatolását nem befolyásolhatják, sem a diffúziót nem gátolhatják.

Az utóbbi időben különböző komponenseket használtak az interferon stabilizálására, Estis, Ewans és Testa interferontartalmú gélek és kenőcsök előállítására hordozóanyagként hidroxietil-cellulózt alkalmaztak, de az IFN-alfa, IFN-béta vagy IFN-gamma nagymértékű aktivitásvesztését a felhasználás során valószínűen fellépő körülmények között csak proteáz-inhibitor adagolásával tudták gátolni (O 152 345 számú európai szabadalmi leírás).

Szakemberek számára ismert, hogy a hidroxietil-cellulóz a legjobb olyan vegyület, amely ilyen vagy más típusú gélek előállítására – például hőstabilitása alapján – alkalmas és kereskedelmi forgalomban van.

Egy IFN-alfát tartalmazó mátrix előállításánál a hidroxietil-cellulóz előnye más hordozóanyagokkal szemben az, hogy a víz forráspontján nem koagulál vagy gélesedik, vízben jól oldható, és az ilyen oldat viszkozitása a hőmérséklet csökkenésével nő.

Fiziológiai hőmérsékleten az interferont, illetve az IFN-alfát kizárólag hidroxietil-cellulóz alkalmazásával nem lehet stabilizálni. Szakember számára az is ismeretes, hogy azokat a proteinkészítményeket, amelyek nem nagy tisztaságúak és ezért szennyezőket tartalmaznak – mint például az interferonok – a megfelelő hidroliziskörülmények között a proteázok bontják. Akagi, Miure és Hishino más kísérleteket végeztek interferontartalmú gyógyszerkészítmények megfelelő stabilitásának kialakítására (O 150 067 számú európai szabadalmi leírás), a hidroxietil-cellulóztól eltérő kémiai szerkezetű polisaccharidokat – így dextránt és hidroxietil-keményítőt – alkalmaztak humán szérumalbumin, mono- és disaccharidok vagy aminosavak adagolásával, és elsősorban parenterális, szisztémás úton adagolható, intravénás vagy intramuszkuláris injekcióban beadható készítményeket ismertettek.

Ezenkívül Terano olyan, szintén injekcióban beadható interferontartalmú gyógyszerkészítményt ír le, amelyben a vizes oldatban az interferont az interferoninjekciók stabilizálására ismert humán szérumalbumin stabilizálószer helyett csak egy kémiai módosított zselatinnal helyettesíti (O 162 332 számú európai szabadalmi leírás). A szakemberek régóta tudják, hogy a zselatin önmagában is stabilizáló hatást fejt ki az interferonra (Sedmak, J.J., Grossberg, S.E.: Tex. Rep. Biol. Med., 41, 274-279, (1982)), és hogy a zselatin és egyes kémiai módosított származékai egyes egyéb biológiai proteinekre bizonyos stabilizáló hatást fejtenek ki (például 1 118 732 számú NSZK-beli szabadalmi leírás, 156 242 számú európai szabadalmi leírás).

Az interferon stabilizálására topikális alkalmazásra szolgáló gélekben, kenőcsökben, szuppozitóriumban, spraykben és más hasonló készítményekben különböző cukoralkoholok, úgymint glicerin, eritrit, arabit, xilit, szorbít vagy mannit, valamint különböző cukorsavak, úgymint iduronsav, galakturonsav vagy

más uronsavak, aszkorbinsav és sói, továbbá különböző szerves pufferrendszerek, úgy citrát-puffer, szukcinát-puffer, tartarát-puffer, fumarát-puffer, glikonát-puffer, oxalát-puffer, laktát-puffer vagy acetát-puffer alkalmazását ismertetik, különböző gyógyszerészeti hordozóanyagokkal, úgymint viaszokkal, nátrium-karboxi-metil-cellulózzal, karboxi-vinil-származékokkal vagy vízzel együtt (O 080 879 számú európai szabadalmi leírás).

Mind az utóbb említett, mind a korábban felsorolt interferon-stabilizáló szerek, valamint elsősorban a gyógyászati készítmények összetétele és azok alkalmazási módja (például a O 162 332 számú európai szabadalmi leírás) alapján eltérnek a találmányunk szerinti megoldástól és azzal nem hasonlíthatók össze.

Találmányunk célkitűzése az volt, hogy nagytisztaságú, különösen rekombináns úton előállított IFN-alfához alkalmazható olyan hordozómátrixot találjunk, amely legalább a fent felsorolt követelményeknek megfelel, másrészt szerkezete úgy előállítás-technológiai, mind gazdaságossági szempontból a lehető legkedvezőbb – azaz egyszerű szerkezetű –, és nem befolyásolja hátrányosan a hordozómátrixban levő biológiailag aktív, topikális alkalmazásra szánt IFN-alfa hatóanyag kívánt optimális hatékonyságát. Találmányunk értelmében ezt a feladathalmazt úgy oldjuk meg, hogy hidroxil-etil-cellulózt és zselatint meghatározott keverési arányban összekeverünk és így egy olyan, IFN-alfához alkalmazható hordozó- és stabilizálóanyagot kapunk, amely nemcsak megfelel a fent leírt követelményeknek, hanem meglepő módon különösen stabil biológiai hatást is kölcsönöz az IFN-alfának és így a leginkább megfelelő nagytisztaságú, különösen rekombináns DNS-technológiával előállított IFN-alfa topikális alkalmazásához.

A találmányunk szerinti megoldás egy további előnye, hogy az új hordozó/stabilizátor komplex mentes az emberi szérumbalbumintól, amely – különösen topikális alkalmazásnál és éppen hosszabb idő alatt – közismerten a helyi immunreakciótól egészen az allergosis-ig terjedő tünetekhez vezethet. Találmányunk ezért egy javított gyógyszerkészítményre vonatkozik IFN-alfa topikális alkalmazásához. Emellett azt is megállapítottuk, hogy a hordozóanyagként és stabilizálószerként funkcionáló két egyedi összetevő – azaz a hidroxil-etil-cellulóz és a zselatin – együtt alkalmazva a várható meghaladó mértékű aktivitásmegőrző hatást fejt ki az IFN-alfára, itt azt is figyelembe kell venni, hogy az IFN-alfáról és az interferonokról általában ismeretes, hogy – például fizikai hatásokkal szemben – instabil proteinek, akár meztelen formában, akár más gélmátrixokba beépítve (vö. például B. R. Moller és munkatársai fent említett publikációjával), így a találmányunk szerinti készítményformáknak meglepő és előre nem látható módon az IFN-alfa stabilitásnövekedését illetően szinergikus hatásuk van. Ezáltal a találmányunk szerinti megoldásban a zselatin nem csupán stabilizálószerként szolgál, hanem – csakis a hidroxil-etil-cellulózzal együtt alkotott komplexben – a találmányunkban megállapított és meglepő szinergikus, IFN-alfát stabilizáló hatást is kifejti.

A találmányunk szerinti, topikálisan alkalmazandó IFN-alfa gyógyszerkészítményformákat előnyösen víruszstatikumokként alkalmazzuk, így gyógyászati felhasználásuk történhet a bőrön, az orrban, a szemben

és a hüvelyben, olyan fertőzéseknel, mint például a herpes labialis, herpes genitalis – beleértve a papillomafertőzéseket is –, szemölcsök és herpes zoster. Az alkalmazási terület felöleli a parakarcinózisok és karcinózisok topikális kezelését is.

A találmány tehát olyan topikálisan alkalmazandó gyógyszerkészítményekre vonatkozik, amelyek az emberi interferon-alfa (IFN-alfa) hatóanyagot stabilizáltan tartalmazzák, és amelyek a következő alkotórészekből állnak: 1. egy a hatóanyagot hordozó és stabilizáló anyag komplex formájában, 2. egy antiadhéziós anyag, 3. adott esetben szokásos segédanyagok, úgymint puffer, só, nedvességmegkötőszer, tartósítószer, behatolást segítő adalék, oldószer.

Az IFN-alfát hordozó és stabilizáló anyagként alkalmazhatjuk ismert anyagok, úgymint cellulózszármazékok (karboxi-metil-cellulóz, metil-cellulóz, hidroxil-propil-metil-cellulóz), valamint poli(vinil-alkohol)ok, poli(vinil-pirrolidon), poliakril-sav polimer (Carbapol) keverékeit savasav vagy lúgosan feltárt zselatinnal. Az előnyös hordozó- és stabilizálóanyag IFN-alfához az 1-nél nagyobb, előnyösen a 2,5-szubsztitúciós fokú hidroxil-etil-cellulóz a készítmény tömegére számítva 0,1–2 tömeg%-ban és zselatin a készítmény tömegére számított 0,1–10 tömeg%-ban. Amennyiben poli(vinil-alkohol)-t vagy poli(vinil-pirrolidon)-t használunk, ebből 0,1-től 15 tömeg%-ig terjedő mennyiséget alkalmazunk. Így kifejezetten az IFN-alfának kölcsönözhetünk különleges stabilitást, amit a stabilitási viszonyokat vizsgáló kísérletek példának és az 1–3. ábrákon bemutatott görbék szemléltetnek, amelyek példaképpen a 14 hetes, -10, +4 és +12 °C-on végzett tárolás eredményeit mutatják.

A gél jobb szétterülése érdekében antiadhéziós szerként és antiadhéziós szűrési segédanyagként is alkalmazhatunk anionaktív, kationaktív, valamint semleges felületaktív anyagokat, előnyösen polietoxilézett szorbitánésztereket, mint a Polysorbát 20, 60, 80. Az antiadhéziós szer mennyisége általában 0,05–0,3 tömeg%. Szervetlen és szerves pufferoldatként az IFN-alfa készítményekhez optimális 6,5–7,4 pH-tartományban megfelelőnek bizonyult a nátrium-foszfát puffer, kálium-hidrogén-foszfát – nátrium-dihidrogén-foszfát puffer, valamint a citromsav – foszfát puffer, a kálium-nátrium-glutamat-foszfát puffer és a szukcinát puffer.

A találmány szerinti, IFN-alfát tartalmazó készítményformákhoz nedvességmegkötőszerként alkalmazható például glicerin, 1,2-propilén-glikol, szorbit, butilén-glikol, valamint poliolkok (például polietilén-glikol 400).

Megfelelő, a bőrt nem irritáló tartósítószerként például egy p-hidroxil-benzo-savészter (Nipa-észter), előnyösen p-hidroxil-benzo-sav-metilszter, további benzo-savak, szorbinsav, klór-hexidin-diglukonát, benzalkónium-klorid vagy hexadecil-trimetil-ammónium-bromid (Cetrimoniumbromid).

Egy megfelelő, az IFN-alfa 2-vel kompatibilis behatolást segítő adalék a dimetil-szulfoxid 50 tömeg%-ig terjedő mennyiségben.

Nem-alkoholos hidrogéleknél a legmegfelelőbb oldószer a víz.

A bőrön, a szemben, az orrban vagy más testüregekben topikális alkalmazásra alkalmas gyógyszerforma például a hidrogél. Ez általában 0,1–2,0 tömeg% zselatint és ugyanennyi cellulózszármazékot és/vagy

poli(vinil-alkohol)-t, poli(vinil-pirrolidon)-t vagy poli-akrilsav polimert tartalmaz, az arányokat mindig a kívánt viszkozitás szerint kell egymáshoz igazítani. Ha poli(vinil-alkohol)-t vagy poli(vinil-pirrolidon)-t alkalmazunk, ebből 15 tömeg%-ig terjedő mennyiség is kellhet. Hüvelygolyók előállításánál a zselatin részarányát 10 tömeg%-ig is szükséges lehet megnövelni, ugyanúgy a kívánt viszkozitástól függően.

A következő példákban részletesen ismertetjük a topikálisan alkalmazandó, a bennük levő IFN-alfa stabilizálására alkalmas gyógyszerkészítmények előállítását, amelyek találmányunk értelmében főképpen cellulózszármazékból és zselatinból, antiadhéziós szerből, valamint az ezekben jelenlevő IFN-alfa hatóanyagból és különböző adalékanyagokból állnak.

Az interferon-alfa-2 előállítását a 83 112 812.9 és 86 105 722.2 számú nyilvánosságára hozott európai szabadalmi bejelentésben ismertetik.

A következő, nem-korlátozó példákban a rövidítések jelentése az alábbi:

Nipagin M = p-hidroxi-benzoészav-metilészter

Polysorbat 20 = polioxi-etilén(20)-szorbitán-mono-laurát (Tween^R 20)

Polysorbat 60 = polioxi-etilén(20)-szorbitán-mono-sztearát (Tween^R 60)

Polysorbat 80 = polioxi-etilén(20)-szorbitán-mono-leát (Tween^R 80)

benzalkónium-klorid = 8–18 szénatomos alkilcsoportot tartalmazó alkil-dimetil-benzil-ammónium-kloridok keveréke

A Bloom a gélziládságot adja meg (Paul Heinz List, Arzneiformenlehre, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart /1976/, 266. oldal) cetrimónium-bromid = hexadecil-trimetil-ammónium-bromid $3,2 \cdot 10^8$ NE interferon-alfa-2-arg megfelel a hatóanyag 1 mg-nyi mennyiségének (Bender + Co. GmbH, Bécs, Ausztria készítménye).

1. példa – Hidrogél

100 g gél összetétele:

IFN-alfa-2	1 · 10 ⁸ NE
Nipagin M	0,2000 g
Zselatin, Bloom 160–200	0,5000 g
NaCl	0,4800 g
KVI	0,0120 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0,0593 g
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,407 g
nátrium-glutamát · H ₂ O	0,0636 g
Polysorbat 20	0,1000 g
hidroxi-etil-cellulóz (például Natrosol ^R 250 HX)	1,7500 g
ionmentesített víz 100 g-ig	96,7944 g

Az IFN-alfa-2-t tartalmazó hidrogélt úgy állítjuk elő, hogy a Nipagin M-et 80 °C-os forró vízben oldjuk, ezután az oldatot szobahőmérsékletre hűtjük, és a lehűtési fázis során az oldathoz hozzáadjuk a zselatint. A zselatin teljes feloldódása után az oldathoz szobahőmérsékleten egymás után hozzáadjuk a nátrium-kloridot, a kálium-kloridot, a nátrium-dihidrogén-foszfát-víz (1/2)-t, a dikálium-hidrogén-foszfát-víz(1/3)-at, a nátrium-glutamát-víz (1/1)-et és a Polysorbat 20-at. Ezt követően steril szűrőnek vetjük alá, beleszórjuk a mikrobiológiailag tiszta hidroxi-etil-cellulózt és az oldatot keverés közben újra 80 °C-ra melegítjük. Ezután szobahőmérsékletre hűtjük, és óvatos keverés közben hozzáadjuk és homogénen elkeverjük a sósavas, 1% Polysorbat-ot tartalmazó IFN-alfa-2

oldatot, amely 0,01 n sósavoldatban feloldott IFN-alfa-2 liofilizátumból áll. A keveréket lamináris légáramlási feltételek alkalmazásával steril alumíniumtubusokba töltjük.

2. példa – Hidrogél

100 g gél összetétele:

– IFN-alfa-2	1 · 10 ¹⁰ NE
– hidroxi-etil-cellulóz (például Natrosol ^R 250 HX)	2,00 g
– zselatin, Bloom 160–200	0,100 g
– NaCl	0,35 g
– Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,16 g
– KH ₂ PO ₄	0,09 g
– 1,2-propilenglikol	10,00 g
– Polysorbat 80	0,10 g
– benzalkónium-klorid 90%-os	0,02 g
– ionmentesített víz	100 g-ig.

Az IFN-2-t tartalmazó hidrogélt úgy állítjuk elő, hogy a vízben 30 °C-on feloldjuk a benzalkónium-kloridot, ezután szobahőmérsékleten az oldathoz hozzáadjuk a propilén-glikolt és a zselatint. A zselatin teljes feloldódása után szobahőmérsékleten egymás után hozzáadjuk a nátrium-kloridot, a nátrium-hidrogén-foszfát-víz (1/2)-t, a kálium-dihidrogén-foszfátot, valamint a Polysorbat 80-at. Ezt követően steril szűrőnek vetjük alá, beleszórjuk a mikrobiológiailag tiszta hidroxi-etil-cellulózt és az oldatot keverés közben 20 percig 80 °C-ra melegítjük. Ezután szobahőmérsékletre hűtjük, óvatos keverés közben hozzáadjuk és homogénen elkeverjük a sósavas, polysorbat-tartalmú IFN-alfa-2 oldatot, amely 0,01 n sósavoldatban és 0,1%-os Polysorbat 80-ban oldott IFN-alfa-2 liofilizátumból áll. A keveréket lamináris légáramlási feltételek alkalmazásával steril alumíniumtubusokba töltjük.

3. példa – Hidrogél

100 g gél összetétele:

– IFN-alfa-2	1 · 10 ⁸ NE
– hidroxi-etil-cellulóz (például Natrosol ^R 250 HX)	1,00 g
– Zselatin, Bloom 160–200	1,00 g
– Polysorbat 20	0,10 g
– glicerin	5,00 g
– borostyánkősav	0,24 g
– klór-hexidin-diglukonát	0,05 g
– 1 n nátrium-hidroxid oldat (pH=6,0-ig)	
– ionmentesített víz	100,00 g-ig.

Az IFN-alfa-2-t tartalmazó hidrogélt úgy állítjuk elő, hogy a klór-hexidin-diglukonátot, a glicerint és a zselatint körülbelül 30 °C-on oldatba visszük. Ezután az oldathoz borostyánkősavat adunk, pH-hát 1 n nátrium-hidroxid oldattal 6,0-ra állítjuk be és Polysorbat 20-at adunk hozzá.

Ezután az oldatba beleszórjuk a mikrobiológiailag tiszta hidroxi-etil-cellulózt és keverés közben 20 percig 80 °C-ra melegítjük. Ezt követően szobahőmérsékletre hűtjük és óvatos keverés közben hozzáadjuk és homogénen elkeverjük a sósavas és polysorbat-tartalmú IFN-alfa-2 oldatot. A keverék töltését az 1. és 2. példában leírt módon végezzük.

4. példa – Orrban alkalmazható hidrogél

100 g gél összetétele:

– IFN-alfa-2	1 · 10 ⁸ NE
– hidroxi-propil-metil-cellulóz (például Methocel ^R Premium)	0,100 g
– Polysorbat 60	0,100 g
– zselatin, Bloom 160–200	0,500 g

196.560

- szorbitoldat 70%-os 2,000 g
- citromsav - víz (1/l) 0,130 g
- Na₂HPO₄ · 2H₂O 0,300 g
- NaCl 0,500 g
- benzalkónium-klorid 90%-os 0,020 g
- ionmentesített víz 100 g-ig.

Az IFN-alfa-2-t tartalmazó hidrogélt úgy állítjuk elő, hogy a hidroxil-propil-cellulózt meleg vízben 40 °C-on keverés közben feloldjuk. Ezután az oldatot szobahőmérsékletre hűtjük, és a hűtési fázis alatt hozzáadjuk a zselatint. Miután ez feloldódott, egymás után az oldathoz adjuk a benzalkónium-kloridot, a szorbitoldatot, a citromsavat, a nátrium-hidrogén-foszfátot, a nátrium-kloridot és a Polysorbat 60-at. A kész gélhez szobahőmérsékleten óvatos keverés közben hozzáadjuk és homogéneen elkeverjük a sósavas, 1% Polysorbat-ot tartalmazó IFN-alfa-2 oldatot. A keveréket lamináris légáramlás alkalmazásával steril alumíniumtubusokba töltjük.

5. példa - Szemre alkalmazható hidrogél

100 g gél összetétele:

- IFN-alfa-2 1 · 10⁸ NE
- poliakrilsav (molekulatömege körülbelül 3 millió) (B.F. Goodrich Corp.,⁸ Cleveland/Ohio, USA, Carbopol⁸) 0,10 g
- zselatin, Bloom 160-200 0,30 g
- Polysorbat 20 0,10 g
- szorbitoldat 70%-os 2,00 g
- glicerin 1,00 g
- NaCl 0,100 g
- cetrimónium-bromid 0,01 g
- In nátrium-hidroxid oldat (pH=7,4-ig)
- ionmentesített víz 100 g-ig.

Az IFN-alfa-2-t tartalmazó hidrogélt úgy állítjuk elő, hogy a poliakrilsavat és a zselatint vízben szobahőmérsékleten feloldjuk keverés közben, majd egymás után hozzáadjuk a szorbitoldatot, a glicerint, a nátrium-kloridot, a Cetrimónium-bromidot és a Polysorbat-ot. Teljes oldódás után az oldatot sterilen szűrjük és keverés közben szobahőmérsékleten pH-ját nátrium-hidroxid-oldattal körülbelül 7,6-ra állítjuk be, eközben gélesedik. Ehhez a gélhez azután szobahőmérsékleten óvatos keverés közben hozzáadjuk és homogéneen elkeverjük a sósavat (0,001 n) és az 1% Polysorbat-ot tartalmazó IFN-alfa-2 oldatot. A töltés a korábbi példákhoz hasonló módon, lamináris légáramlás alkalmazásával steril alumíniumcsövekbe végezzük.

6. példa - Hüvelytabletta

100 g hüvelytabletta-massza összetétele:

- IFN-alfa-2 1 · 10⁸ NE
- hidroxil-etil-cellulóz 0,10 g
- zselatin, Bloom 160-200 10,00 g
- Na₂HPO₄ · 2H₂O 0,16 g

- KH₂PO₄ 0,09 g
- Polysorbat 20 0,10 g
- glicerin 57,00 g
- ionmentesített víz 100 g-ig.

Az IFN-alfa-2-t tartalmazó hüvelytablettákat úgy állítjuk elő, hogy a hidroxil-etil-cellulózt a zselatinnal együtt 40-50 °C-on feloldjuk a glicerin és a víz keverékében, amely már tartalmazza a nátrium-hidrogén-foszfát-víz (1/2)-t, a kálium-dihidrogén-foszfátot, valamint a Polysorbatot. Még viszkózus állapotban (körülbelül 37-40 °C-on) óvatosan hozzákeverjük az 1% Polysorbatot tartalmazó sósavas (0,001 n) IFN-alfa-2-oldatot és a kapott oldatot megfelelő hűtött formákba öntve azonnal megdermesztjük.

7. példa - Stabilitásvizsgálat zselatin nélküli és zselatint tartalmazó hidrogél összehasonlításával

100 g gél összetétele:

- | | | |
|---|------------------------|------------------------|
| | 1 · 10 ⁸ NE | 1 · 10 ⁸ NE |
| - IFN-alfa-2 | | |
| - Nipagin M | 0,200 g | 0,200 g |
| - zselatin, Bloom 160-200 | - | 0,500 g |
| - NaCl | 0,480 g | 0,480 g |
| - KCl | 0,012 g | 0,012 g |
| - Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O | 0,086 g | 0,086 g |
| - KH ₂ PO ₄ · 3H ₂ O | 0,012 g | 0,012 g |
| - Polysorbat 20 | 0,100 g | 0,100 g |
| - hidroxil-etil-cellulóz (például Natrosol ^K 250 HX) | 2,000 g | 2,000 g |
| - ionmentesített víz | | 100 g-ig. |

A pontozott görbék az 1-3. ábrán egy fenti összetételű, zselatint nem tartalmazó IFN-alfa-2 hidrogél stabilitásának alakulását, a kihúzott görbék a zselatin-adalékot is tartalmazó, alumíniumtubusokba töltött gél stabilitását mutatják. Mindegyik pont 6 meghatározás átlagértéke, a meghatározásokat ELISA (enzym-linked immunosorbent assay) vizsgálattal végeztük.

Az 1. ábra -10 °C-on végzett tárolásnál, a 2. ábra +4 °C-on végzett tárolásnál és a 3. ábra +21 °C-on végzett tárolásnál mutatja a stabilitás alakulását, mindig összehasonlító vizsgálattal.

A stabilitás alakulását 14 héten (3 és fél hónap) keresztül kísértük figyelemmel. Ennek során meglepő és teljesen váratlan módon megállapíthattuk, hogy a tárolási hőmérséklet növekedésével a stabilitási különbségek világosabbá válnak. A teljes 14 hetes időszak biológiai stabilitási eredményeinek összegezése és az értékek (n=11) számtani középértékének (x) képzése a következő táblázatban bemutatott eredményeket adja, a táblázatban a 10,0 értéket 100%-os, 10⁸ NE IFN-alfa-2/100 g-nak megfelelő aktivitásnak vettük.

tárolási hőmérséklet	hidrogél		hidrogél		különbség
	zselatin	nélkül	zselatin-adalékkal		
-10 °C	x (11) = 8,49	(= -15%)	x (11) = 9,72	(= -3%)	12%
+4 °C	x (11) = 7,52	(= -25%)	x (11) = 9,97	(= -10%)	25%
+21 °C	x (11) = 5,67	(= -43%)	x (11) = 8,87	(= -11%)	32%

Ebből a táblázatból világosan látható a hidroxietil-cellulóz és a zselatin kombinációjának stabilizáló hatása. Hűtőszekrényben (+4 °C-on) tárolva 3 és fél hónap után megállapításunk szerint a zselatinadalékok tartalmazó készítmény aktivitása gyakorlatilag nem csökkent, míg a zselatin nélküli készítmény aktivitása körülbelül 25%-kal csökkent. Így a hűtőszekrény hőmérséklete a gyakorlatban megfelelő a kereskedelmi készítmény tárolására. 21 °C-on tárolva azt állapíthattuk meg, hogy a zselatinadalék nélküli készítmény aktivitása az eredeti értéknek majdnem a felére csökken 3 és fél hónap tárolási idő alatt, míg a találmány szerinti, hidroxietil-cellulózt és zselatint tartalmazó készítmény ez alatt az idő alatt csak 11% aktivitáscsökkenést mutatott, ami az IFN-alfa-2 több mint 30%-os stabilizátnövekedésének felel meg.

Egy további tárolási kísérlet során 44 hét (10 hónap) alatt az 1. példa szerinti, belső lakkbevonatos alumíniumtubusba töltött készítmény kezdeti aktivitása 4 °C és 21 °C tárolási hőmérsékleten az ELISA-vizsgálat szerint egyáltalán nem csökkent.

tárolási hőmérséklet	1. példa szerinti hidrogél kiindulási érték	10 hónap utáni érték
+4 °C	x (6) 9,6	x (6) 11,0
+21 °C	x (6) 9,6	x (6) 9,6

8. példa – hidrogél

A 2. példában megnevezett alkotórészekből az ott leírt módon állítunk elő hidrogélt azzal az eltéréssel, hogy a Polysorbat 80 mennyisége 0,05 g 100 g gélben.

9. példa – Hidrogél

A 3. példában megnevezett alkotórészekből az ott leírt módon állítunk elő hidrogélt azzal az eltéréssel, hogy a Polysorbat 20 mennyisége 0,3 g 100 g gélben.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás helyileg alkalmazható, stabilizált interferon-alfát tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a készítmény tömegére vonatkoztatva 0,1–10% zselatint, 0,05–3% antiadhéziós szert, továbbá 0,1–2,0% cellulóz-szármarékot vagy poliakrilsavat vagy 0,1–15% poli(vinil-alkohol)-t vagy poli(vinil-pirrolidon)-t vagy keveréküket legfeljebb 80 °C-on vízben oldunk és adott esetben szokásos segédanyagok jelenlétében összekeverjük a készítmény 100 g-jára vonatkoztatva $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^{10}$ NE interferon alfával, majd helyileg alkalmazható gyógyszerformává kiszerezzük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy savasan vagy lúgosan feltárt zselatint alkalmazunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a gyógyszerkészítmény tömegére számítva 0,1–2,0% hidroxietil-cellulózt és ugyanennyi zselatint alkalmazunk.

4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy hidroxietil-cellulózt és a kész gyógyszerkészítmény tömegére számítva 0,1–10% zselatint alkalmazunk.

5. A 3. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy olyan zselatint alkalmazunk, amelynek Bloom-értéke 160–200, és olyan hidroxietil-cellulózt használunk, amelynek szubsztitúciós foka 2,5.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy antiadhéziós szerként antionaktív, kationaktív vagy semleges felületaktív anyagot alkalmazunk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy antiadhéziós szerként polioxi-etilén-(20)-szorbitán-monolaurátot, polioxi-etilén-(20)-szorbitán-monosztearátot, polioxi-etilén-(20)-szorbitán-monoleátot vagy keveréküket alkalmazzuk.

8. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy emberi interferon-alfát kódoló DNS-szekvenciával transzformált sejtenyészetből nyert interferon-alfát alkalmazunk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy E.coli transzformált sejtjeiből nyert interferon-alfát alkalmazunk.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy olyan interferon-alfát alkalmazunk, amelynek specifikus aktivitása a kész gyógyszerkészítmény 100 g-jára számítva $1 \cdot 10^8$ NE.

11. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy további adalékanyagként pufferrendszert, nedvességmegkötőszert, a bőrt nem izgató tartósítószert, az interferon-alfával kompatibilis, behatolást elősegítő adalékokat, és oldószert alkalmazunk.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy olyan pufferoldatot alkalmazunk, amelynek pH-ja 6,0–7,4.

13. A 11. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy nedvességmegkötőszereket glicerint, 1,2-propilén-glikolt vagy szorbitot alkalmazunk.

14. A 11. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a bőrt nem izgató tartósítószereket p-hidroxil-benzoészteret, szorbinsavat, benzoészteret, klór-hexidin-diglukonátot, benzalkónium-kloridot, hexadecil-trimetil-ammónium-bromidot vagy ezek keverékét alkalmazzuk.

15. A 11. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy oldószerként vizet alkalmazunk.

16. Az 1. igénypont szerinti eljárás hidrogél gyógyszerkészítmény előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a kész gyógyszerkészítmény tömegére számított 0,1–2,0% zselatint legfeljebb 80 °C-os vízben feloldunk, és az oldathoz 0,05–0,3% antiadhéziós szert, adott esetben tartósítószert, nedvességmegkötőszert, sókat, pufferrendszert és behatolást segítő adalékokat, legfeljebb 80 °C-on hidroxietil-cellulózt vagy karboxil-metil-cellulózt, metil-cellulózt, hidroxil-propil-metil-cellulózt, poli(vinil-alkohol)-t, poli(vinil-pirrolidon)-t, poliakrilsavat vagy ezek keverékét adjuk a kész gyógyszerkészítmény tömegére számítva 0,1–2,0%, poli(vinil-alkohol) vagy poli(vinil-pirrolidon) esetében 0,1–15% mennyiségben és hozzáadunk a kész gyógyszerkészítmény 100 g-jára számítva $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^{10}$ NE interferon-alfát, homogénen elkeverjük és az elegyet sterilien letöltjük.

17. Az 1. igénypont szerinti eljárás intravaginálisan alkalmazható gyógyszerkészítmény előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy 0,1–2,0% hidroxietil-

196.560

-etil-cellulózt és 0,1–10% zselatint 60 °C-ig terjedő hőmérsékleten feloldunk víz és glicerin keverékében, polietoxilezett szorbitánészter-tartalmú $1 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^{10}$

5

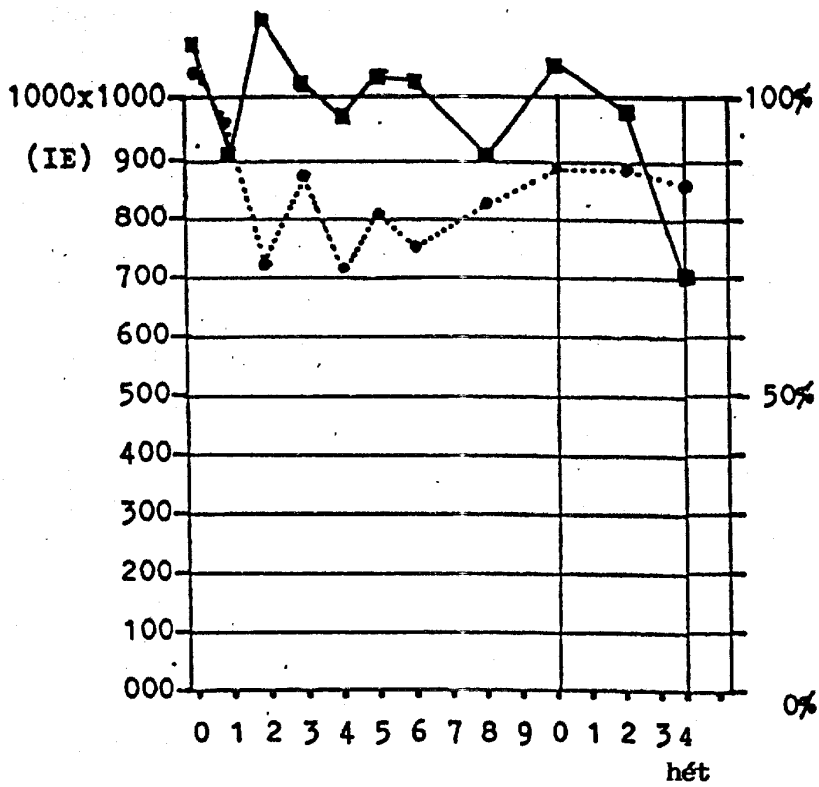
NE IFN-alfa oldatot keverünk hozzá óvatosan 40-50 °C hőmérsékleten, és a kapott elegyet azonnal megfelelő formákba öntjük.

3 db rajz

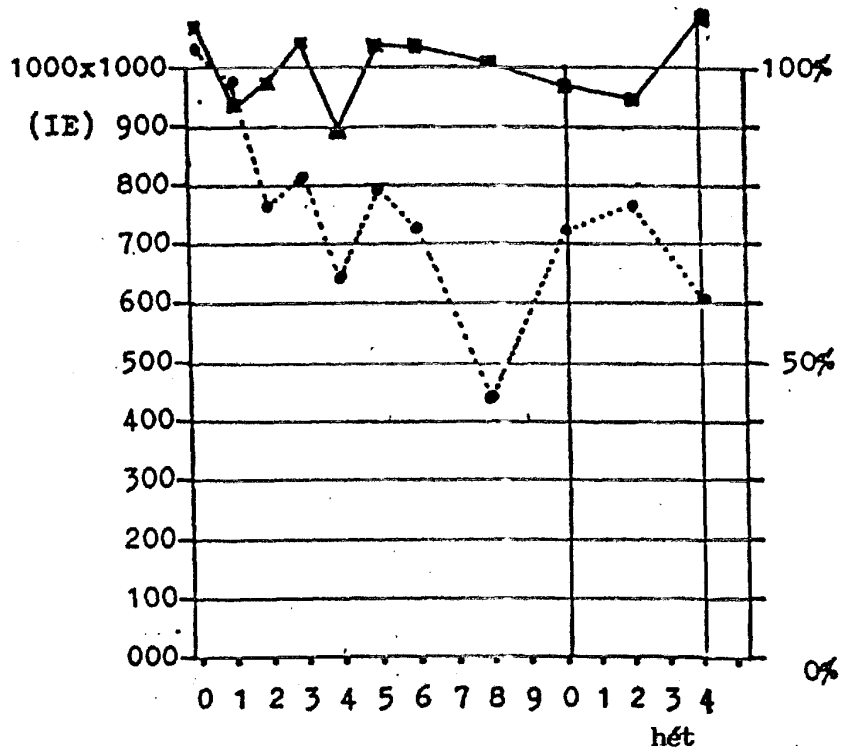
Kiadja: Országos Találmányi Hivatal
Felelős kiadó: Himer Zoltán o.v.

KÓDEX

1. ÁBRA



2. ÁBRA



3. ÁBRA

