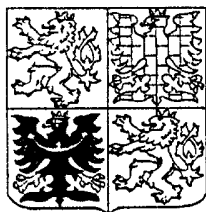


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 10.08.92
(32) 10.08.92, 15.08.91
(31) 92EP/9201822, 91/4126983
(33) WO, DE
(40) 17.08.94

(21) 287-94

(13) A3

5(51)

A 61 K 37/02

A 61 K 47/10

A 61 K 47/18

A 61 K 47/14

(71) BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, Mannheim, DE;

(72) Woog Heinrich, Laudenbach, DE;
Gruber Werner, Birkenau, DE;
Markl Hans-Jörg, Ellerstadt, DE;
Winter Gerhard, Dossenheim, DE;
Demmer Fritz, Hirschberg, DE;

(54) Způsob výroby konzervovaných léčiv,
obsahujících lidský protein, pro infúzní nebo
injekční účely

(57) Řešení se týká způsobu výroby konzervovaných injekčních
a infúzních roztoků, obsahujících lidský protein, které jsou
dobře snášeny, přičemž fermentace koncentračních činidel
v roztoku činí 0,001 až 2 % hmot.

Způsob výroby konzervovaných léčiv, obsahujících lidský protein, pro infúzní nebo injekční účely

Oblast techniky

Předmětem vynálezu je způsob výroby konzervovaných léčiv, obsahujících lidský protein, pro použití jako infúzní nebo injekční roztok ve formě, kterou pacient dobře snáší.

Dosavadní stav techniky

Lidské proteiny ve smyslu předloženého vynálezu jsou proteiny, které jsou tělu vlastní, vyskytují se jen v malých množstvích a používají se pro terapeutické účely, jako například t-PA / tissue plasminogen activator /, G-CSF / granulocyte colony stimulating factor /, streptokináza, urokináza, interferon nebo EPO / erythropoietin / popřípadě jejich deriváty vyrobené rekombinací, které mají v podstatě podobné nebo srovnatelné farmakologické vlastnosti.

V evropské patentové přihlášce EP 0,430,200 jsou popsána léčiva obsahující lidský protein pro subkutánní nebo intramuskulární aplikaci, které vzhledem k přidavku aminokyselin vykazují lepší biodisponovatelnost a lepší snášenlivost ve srovnání se známými formami podávání.

Stabilizovaná léčiva obsahující lidský protein, které obsahují mimo jiné močovinu a různé aminokyseliny, jsou známy z EP 0 306 824, přičemž jsou tam jako lidské proteiny zmíněny jako příklad zejména EPO a G-CSF.

Dále se v EP 0,456,153 popisují galenické vodné formulace EPO pro výrobu injekčních preparátů pro subkutánní nebo intramuskulární aplikaci, které vykazují hodnotu pH 6 až 8 a pro stabilizaci obsahují výlučně fosforečnan alkalického kovu nebo halogenid alkalického kovu.

Gentechnologická výroba výše uvedených lidských proteinů je například známa z následujících patentových přihlášek: v PCT přihláškách WO 85/02610 a WO 86/03520 jsou popsány způsoby gentechnologické výroby rh-EPO / recombinantes humanes erythropoietin/. Dále je výroba polypeptidů s účinkem podobným erythropoietinu popsána v EP 0 409 113 ; EP 0 357 804; WO 86/02100 a WO 91/05867- Ze stavu techniky jsou dále známy způsoby výroby jiných rekombinantních proteinů, například polypeptidů s účinkem podobným aktivátoru plasminogenu z WO 90/09437 ; EP 0,227,462 ; EP 0,400,545 nebo EP 0,440,763. Výroba polypeptidů s účinkem podobným účinku G-CSF je například známa z EP 91 107 429.2 nebo PCT/EP 91/00192.

EPO je glykoprotein, který stimuluje tvorbu hemoglobinu popřípadě erythrocytů v kostní dřeni. Tento lipoprotein se tvoří hlavně v ledvinách, nachází se ve velmi malém množství v séru a vylučuje se za fyziologických podmínek v moči.

Preparáty léků známé až dosud ze stavu techniky, které obsahují lidské proteiny , jsou formulace, které zpravidla neobsahují žádné konzervační prostředky, neboť se všeobecně používají pro

jednorázovou dávku ve formě tak zvané formulace s jednorázovou dávkou popřípadě jednodávkovou nádržku. Tak zvané multidávkové jednotky popřípadě vícedávkové nádržky jsou naproti tomu vhodné pro vícenásobnou aplikaci v libovolných dílčích množstvích účinné látky. V důsledku toho se kladou na stabilitu a trvanlivost takovýchto forem podávání obzvláštní nároky, a to zejména ve vztahu k roztokům bez zárodků. Z tohoto důvodu se do takovýchto roztoků přidávají konzervační činidla, aby se zabránilo růstu zárodků v připravených, pohotově aplikovatelných injekcích nebo infúzních roztocích.

Výroba konservovaných léčebných preparátů, obsahujících lidské proteiny, se ukázala být obtížnou. Při použití konzervačních prostředků se ukázalo, že tyto vyvolávají problémy se stabilitou při delším skladování léčiv. Při tom dochází k inaktivaci lidských proteinů a ke tvorbě aglomerátů, které mohou být příčinou pozorovaných nesnášenlivostí injekčních roztoků. Obvyklé způsoby výroby konservovaných léčiv dle receptury pro infúzní nebo injekční účely se v případě účinných látek lidských proteinů nedají použít, neboť při podmínkách sterilizace v autoklávech při 121 °C a době 20 min inaktivují účinné látky a rozrušují jejich strukturu. Je také známo, že běžná, ve farmacii používaná konzervační činidla reagují s účinnými látkami lidských proteinů a tyto při tom inaktivují. Z tohoto důvodu byly až dosud intravenózní /i.v./ nebo subkutánní /s.c./ preparáty vyráběny jako jednodávkové formulace za aseptických podmínek, aniž by se při tom používala konzervační činidla.

Byla zadána úloha ,nalézt způsob výroby konservovaných, léčiv obsahujících lidský protein, pro injekční nebo infúzní účely, pomocí něhož by se mohla vyrobit léčiva, která by nevykazovala výše uvedené nedostatky. Tato takto vyrobená léčiva by měla být reprodukovatelná, měla by se aplikovat s dobrou snášenlivostí, měla by zaručit co možná bezbolestnou aplikaci a měla by být prostá zárodků. Kromě toho by měly být dána k dispozici multi - dávkové podávací formy / nádržky s mnoha dávkami/, které by byly prosté zárodků a bylo je možné aplikovat s dobrou snášenlivostí.

Podstata vynálezu

Tato úloha je vyřešena tím, že se při výrobě léčiv obsahujících lidské proteiny, k injekčním nebo infúzním účelům ,přidávají conservační činidla v koncentraci až do 2 % / hmot. % k obj. %: hm/obj./, zejména 0,01 až 1 % popřípadě 0,1 až 0,3 % a tato se popřípadě před výrobou skladovatelných formulací léčiv opět odstraní. Výběrem takových conservačních činidel, která vykazují malý počet alergií, je dále umožněno, takováto conservační činidla ve skladované formulaci léčiv i ponechat, takže není bezpodmínečně nutné selektivní odstranění.

Takto vyrobená léčiva jsou konservována, to znamená, že obsahují conservační činidlo nebo při nejmenším byla během jejich výroby občas conservační činidla přítomna. Pro konservaci jsou vhodné všechny látky, které působí baktericidně. Po-

užitá konzervační činidla nřání růstu zárodků, které se při plnění dostanou do preparátu nebo je usmrcují.

U způsobu podle vynálezu je zejména výhodné, když se použijí taková konzervační činidla, která se mohou bez námahy odstranit při jednom z posledních kroků způsobu výroby skladovatelné formulace léčiva. To má tu výhodu, že aplikovatelná léčiva jsou potom prostá jakéhokoliv konzervačního činidla ovlivňujícího jejich snášitelnost. K těkavým konzervačním činidlům, která jsou obzvláště výhodná, patří chloreton /chlorbutanol, 1,1,1-trichlor-2-methyl-2-propanol / nebo benzylalkohol.

Po té co bylo konstatováno, že různá konzervační činidla vykazují při stejném konzervačním účinku různý počet alergií, dá se snášitelnost zlepšit správnou volbou prostředku. Konzervační činidla s malým počtem alergií jsou zejména chlorbutanol, benzylalkohol a benzalkoniumchlorid. Benzalkoniumchlorid je směs kvarterních amoniových sloučenin/QUATS/ druhu alkylbenzyl dimethylammoniumchloridů obecného vzorce $\text{[H}_5\text{C}_6\text{-CH}_2\text{-N}^+\text{CH}_3\text{]}_2\text{R/Cl}$, přičemž R je alkylový zbytek C_8H_{17} - $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$, například benzododeciniumchlorid nebo cetalkoniumchlorid / srovnej Kirk-Othmer 2: 633 f ; 19; 562 f./.

Tato konzervační činidla mají dále tu výhodu, že neinaktivují lidské proteiny obsažené v roztoku. Snášitelnost se zlepší i co nejnižší koncentrací konzervačního činidla. Zejména by obsah

jednotlivého konservačního činidla v roztoku léku neměl překročit hodnotu 10 μ g/ml. S výhodou se používá až 5 mg/ml konservačního činidla v roztoku léku.

Potřebná koncentrace se dá minimalizovat různými opatřeními, Například tím, že se co nejvíce zabrání inaktivaci lidského proteinu konservačním činidlem. To má tu další výhodu, že se zvýší stabilita injekčního roztoku. Inaktivaci lze zabránit tím, že se zvolí konservační činidlo s ohledem na malou reaktivitu. Inaktivace se dále potlačí, když kontakt mezi lidským proteinem a konservačním činidlem je co nejkratší. Potřebná koncentrace konservačního činidla v roztoku se dá snížit i tím, že se vyloučí jeho absorpce na materiálech, jako například gumě, s nimiž přichází roztok do styku.

Pro snášenlivost hraje druh použitého konservačního činidla významnou roli. Všechny konservační činidla vykazují větší nebo menší počet alergií. Aby se zaručilo, že léčivo je bez zárodků, nelze se ale vždy vyhnout jeho použití. Podle zkoušek, které jsou podkladem vynálezu je možné, použít konservační činidla při výrobě injekčních roztoků tak, aby se zaručilo, že léčivo je maximálně prosté zárodků, tak i že vedlejší účinky konservačního činidla jsou téměř úplně vyloučeny.

V mnoha případech není možné přes skutečnost, že přidaná konservační činidla více nebo méně reagují s lidskými proteiny a tyto při tom inaktivují, úplně vyhnout přísadku konservačního

činiidla, protože zárodky mohou do roztoku vniknout například při plnění, nebo protože, když se ze sterilního lyofilizátu v multidávkové nádržce připravuje injekční roztok, musí být až do úplné spotřeby konservována.

Bez problémů je přídavek conservačního činiidla při výrobě preparátu, když se conservační činiidlo vybere tak, že se při lyofilizaci odpaří nebo vysublimuje. Conservační činiidla, která vykazují odpovídající těkavost, jsou například chloreton, benzylalkohol.

Vzhledem k tomu, že bažná conservační činiidla, používaná ve farmacii, reagují s lidskými proteiny a tyto inaktivují, vyrábí se často preparáty pro intravenózní a subkutánní aplikace jako monodávkové / jednorázové/ formulace za aseptických podmínek, aniž by se při tom používala conservační činiidla. Ale ne vždy se dá zabránit tomu, aby se při plnění nedostaly do preparátu zárodky, které mohou způsobit škody, když se nezabrání přídavkem conservačního činiidla jejich růstu nebo se jím neusmrtí.

Upotřebitelné koncentrace conservačního činiidla se pohybují mezi asi 0,1 až asi 2,0, s výhodou mezi asi 0,1 až asi 0,3 %. Přesná koncentrace závisí na koncentraci účinné látky a stanoví se případ od případu způsoby, které jsou pro odborníka běžné.

Zákonodárce předepisuje, že receptury v multidávkových nádržkách pro intravenózní a subkutánní aplikaci musí být dostatečně konservovány, to zname-

ná, že i ještě poslední den uvedené doby trvanlivosti musí být v plném rozsahu přítomný konzervační účinek. Aby se tento požadavek mohl splnit, musí roztok lidského proteinu v injekční formě obsahovat konzervační činidlo. To nadhazuje problém, protože - viz výše - konzervační činidla reagují s lidskými proteiny a u pacientů vyvolávají sensibilizaci. Reakce s účinnou látkou vede jednak ke snížení aktivity účinné látky a jednak konzervačního účinku, který se ještě dále zmenší tím, že dochází k absorpci konzervačních činidel na pryžových zátkách.

Podle vynálezu se tyto potíže odstraňují tím, že se použijí konzervační činidla, která reagují málo s lidskými proteiny a působí málo sensibilizačně, že se usiluje o co nejkratší kontakt lidského proteinu s konzervačními činidly, a že se vyloučí faktory, které přispívají ke spotřebě konzervačního činidla.

K málo reaktivním a sensibilizujícím konzervačním činidlům se počítá chlorbutanol, benzylalkohol, benzalkoniumchlorid a kombinace těchto látek. Při použití jednotlivých jmenovaných konzervačních činidel se používají následující koncentrace : chlorbutanol : 2,0 až 5,0 mg/ml, s výhodou : 3,0 až 4,0 mg/ml. Benzylalkohol : 1,0 až 5,0 mg/ml, s výhodou : 2,0 až 3,0 mg/ml. Benzalkoniumchlorid : 0,01 až 0,05 mg/ml, s výhodou : 0,02 až 0,03 mg/ml.

Ukázalo se, že je zejména výhodné, když se použije kombinace jednotlivých konzervačních činidel. Tím se dosáhne lepší konzervační účinek

a eliminují se nevýhodné interakční účinky s lidskými proteiny. Při použití jediného conservačního činidla nebylo možné dosáhnout v některých případech v závislosti na použitém lidském proteinu požadovanou stabilitu preparátu. Použití benzalkoniumchloridu v množstvích optimálních pro konservaci může například vést k inaktivaci lidského proteinu. Použití chlorbutanolu při teplotě chladničky v koncentraci, která ještě nevede k agregaci lidského proteinu může za určitých okolností způsobit nedostatečnou konservaci. Použití benzylalkoholu v množství postačujícím pro konservaci může vést k fyzikální nesnášenlivosti a ke zákalům roztoku léčiva. Kombinací jednotlivých conservačních prostředků se lze těmto nedostatkům vyhnout. Výhodné kombinace jsou roztoky, které obsahují zejména benzylalkol/benzalkoniumchlorid, benzylalkohol/chlorbutanol nebo chlorbutanol/benzylalkohol/benzalkoniumchlorid. Při tom se chlorbutanol používá s výhodou až do koncentrace 10 mg/ml, benzylalkohol až do 10 mg/ml a benzalkoniumchlorid až do 0,1 mg/ml, zejména pak 0,01 až 0,05 mg/ml. Obzvláště výhodná je kombinace při níž se používá benzylalkohol a benzalkoniumchlorid, přičemž koncentrace benzylalkoholu v roztoku léčiva činí s výhodou 3 až 6 mg/ml a benzalkoniumchloridu 0,01 až 0,025 mg/ml.

Použití málo reaktivních a málo sensibilizujících conservačních prostředků a krátkodobý styk pomáhají již snížit potřebné množství conservačního činidla, protože se tím minimalizuje odbourání

konservačního činidla při inaktivaci lidského proteinu.

Co možná nejkratší styk se zabezpečí tím, když se receptura ve formě lyofilizátu nebo v koncentrované formě - popřípadě poté co se u lyofilizace /viz výše/ odstranilo conservační činidlo - sterilně uskladní a teprve při použití injekční formy se přidá conservační činidlo, přičemž by se injekční roztok měl spotřebovat během 30 dnů.

Jestliže se zvolí lyofilizát, tak může farmaceutická obalová jednotka obsahovat dodatečně rozpouštědla potřebná pro rekonstituci. Tato jsou zpravidla tak přizpůsobena odpovídajícímu lyofilizátu, že se při smíchání získají injekční roztoky s vlastnostmi podle vynálezu. Lyofilizát může obsahovat úplně nebo částečně potřebná množství conservačních činidel, takže se rekonstituce v podstatě provádí s destilovanou vodou pro injekční účely. Jinak je ale v principu možné, aby rekonstituční roztok obsahoval potřebné množství conservačních prostředků, aby se získaly injekční roztoky léčiv. V případě multidávkových preparátů je to výhodná varianta.

Úprava způsobu podle vynálezu spočívá v tom, že se lidské proteiny rozpustí ve vodě s potřebnými pomocnými látkami, které obsahují potřebná množství conservačních činidel / až maximálně 6 %/, a v případě, že je to potřebné, se zahřejí na teplotu, kterou dotyčný lidský protein s ohledem na svou stabilitu snese, aniž by se při tom inaktivoval. Conservační činidlo se nechá delší dobu působit, až je roztok v podstatě prostý zárodků, to znamená

až asi čtyři hodiny, s výhodou 10 minut až dvě hodiny. Potom se roztok účinné látky naplní do lahví a lyofilizuje. Při tom konservační činidlo zpravidla během lyofilizace odsublimuje nebo se vypaří. Takto získané lyofilizáty poskytují po rekonstituci s běžnými rozpouštědly sterilní roztok pro infúzní a injekční účely.

Dobrá snášenlivost injekčního roztoku lidského proteinu se kromě jiného ovlivní i správnou volbou hodnoty pH, kapacity pufru, titrační acidity a pufracími látkami obsaženými v roztoku.

Horní hodnota pH roztoku nesmí se pohybovat podstatně nad neutrálním bodem / hodnota pH krve se pohybuje mezi 7,2 až 7,4/, protože lidské proteiny jsou v alkalické oblasti nestálé. Pro intravenózní dávky vykazují roztoky s výhodou hodnotu pH asi 4,5 až 7,4. Pro subkutánní dávky jsou výhodné roztoky s hodnotou pH asi 6 až 7,4. Intravenózní a subkutánní aplikace se rozlišují proto, protože intravenózním vzedmutím krve a pufru obsaženého v krvi je umožněno rychlejší vyrovnaní fyziologických poměrů pH, než to které může nastat subkutánně. Vzhledem k tomu, že rychlost vyrovnaní a subkutánní a intravenózní aplikace se dá ještě zlepšit také co nejnížší kapacitou pufru a co nejnížší titrační aciditou, závisí přijatelná minimální hodnota pH roztoku také ještě na těchto parametrech. Kapacita pufru hotového aplikovatelného roztoku se při tom pohybuje v rozmezí 0 až 10 mVal/l a titrační acidita v rozmezí 0 až 20 mVal/l. Zejména by kapa-

cita pufru hotových aplikovatelných roztoků neměla činit více než 6 mValů/l a titrační acidita více než 10 mValů/l.

Pufrační kapacita se obecně definuje jako to ekvivalentní množství /val/ kyseliny nebo louhu, které je nutné, aby se hodnota pH roztoku o objemu jednoho litru změnila o jednu jednotku pH. Jestliže se pro titraci použijí monobasické kyseliny nebo báze, odpovídá údaj val/l použité kyseliny nebo báze molárnímu množství mol/l této kyseliny. Vzhledem k tomu, že v předloženém případě vykazují použité roztoky hodnotu pH v kyselé oblasti, může se alternativně kapacita pufru definovat také jako to množství například 0,1 n roztoku NaOH, které je nezbytné, aby se hodnota pH roztoku o objemu jednoho litru zvýšila o jednotku pH. Roztoky léčiv obsahující lidské proteiny obsahují při stanovení pufrační kapacity běžné farmaceutické pomocné prostředky nebo nosiče.

Stanovení pufrační kapacity léčiv obsahujících lidské proteiny se provádí vycházeje od hotových aplikovatelných injekčních a infúzních roztoků, které obsahují vedle účinné látky pomocné látky a přísady, které jsou jinak ve farmaceutické praxi obvyklé. Zpravidla mají roztoky kyslou hodnotu pH pro stabilizaci proteinů. Odpovídající množství báze se zjistí titrací bázemi, přičemž toto množství je nezbytné k tomu, aby se hodnota pH roztoku zvýšila o jednotku pH.

Výhodné meze f pufrační kapacity v infúzním

nebo injekčním roztoku jsou pro intravenózní dávku až do 2,4 ml 0,1 n louhu sodného , s výhodou až do 0,5 ml. To odpovídá množství louhu 0,24 mmolů popřípadě 0,05 mmolů Pro subkutánní dávku se s výhodou používá až do 1 ml 0,1 n roztoku NaOH, zejména pak až do 0,2 ml 0,1 n roztoku NaOH. To odpovídá množství louhu až do 0,1 mmolů, popřípadě až do 0,02 mmolů.

Dále se ukázalo, že je výhodné , když hotové aplikovatelné injekční nebo infúzní roztoky vykazují co nejmenší titrační aciditu až do 5 mVa/l.

Výhodné meze titrační acidity infúzních a injekčních roztoků jsou pro intravenózní aplikaci až do 10 ml, s výhodou až do 5 ml, 3 ml nebo 1 ml 0,1 n roztoku NaOH. To odpovídá titrační aciditě až do 1 mmolů/l popřípadě až do 0,3 mmolů/l nebo 0,1 mmolů/l. Pro subkutánní aplikaci se s výhodou používá až 5 ml, zejména pak až 2 ml nebo až 0,5 ml 0,1 n roztoku NaOH. Titrační acidita činí v tomto případě až 0,5 mmolů/l popřípadě až 0,2 mmolů/l nebo 0,05 mmolů/l.

Titrační acidita popřípadě titrační bazicita se obecně definuje jako to množství louhu nebo kyseliny, které je nutné, aby se nastavila hodnota pH roztoku s objemem jednoho litru na hodnotu pH krve / asi 7,2 až 7,4 /. V předloženém případě může titrační acidita být alternativně definována také jako množství například 0,1 n roztoku NaOH, které je nutné, aby zvýšilo hodnotu pH litru roztoku na hodnotu pH krve / asi 7,3/. Rostoky léčiv

obsahující lidský protein obsahují při stanovení pufrací kapacity běžné farmaceutické pomocné nebo přídatné látky. Způsob stanovení titrační acidity se provádí analogicky jako stanovení pufrací kapacity, tím, že se vychází od hotových aplikovatelných injekčních a infúzních roztoků a určí se to množství báze, které je nutné, aby se nastavila hodnota pH roztoku asi 7.

Potřebná oblast pH pro pokud možno bezbolestně aplikovatelný infúzní a injekční roztok se pohybuje v závislosti na právě použitém lidském proteinu v kyselé nebo neutrální oblasti. Infúzní nebo injekční roztoky mají hodnotu pH v oblasti asi 2 až 7,4. S výhodou se používají roztoky s hodnotou pH asi 3,8 až 7,4, přičemž jako dolní meze přichází v úvahu zejména hodnoty pH 4,5 až 6,0, s výhodou 5,5 až 6,0. Jako horní meze oblasti pH se používají hodnoty pH roztoků, které se pohybují v blízkosti hodnoty pH krve. Pro intravenózní aplikace se s výhodou používají roztoky s hodnotou pH 6 až 7,4, zejména pak 6,8 až 7,2. Pro subkutánní aplikace se používají s výhodou roztoky s hodnotou pH 6,5 až 7,2, zejména pak 7,0 až 7,2.

Kromě přirozeně se vyskytující formy lidských proteinů se mohou používat také vhodné muteiny. Pod pojmem "muteiny" se zpravidla rozumí takové lidské proteiny, jejichž sequence aminokyseliny se liší od přirozené sequence minimálně jednou aminokyselinou. Tyto rozdíly mohou spočívat v tom, že se jedna nebo více, s výhodou 1 až 10 aminokyselin v přirozené sequenci vymění za jiné aminokyseliny,

nebo, že se jedna nebo více aminokyselin připojí k N-terminálnímu nebo C-terminálnímu konci popřípadě také oddělí. Potom se mluví o N-terminálních nebo C-terminálních prodlouženích popřípadě N-terminálních nebo C-terminálních deletacích. Dříve uvedené možnosti se dají spolu popřípadě také kombinovat, to znamená N-terminální konec přirozené sequence se může například prodloužit za současného zkrácení C-terminálního konce, přičemž se popřípadě také může vyměnit jedna nebo více aminokyselin za jiné aminokyseliny. S ohledem na okamžitý směr indikace by měly takto získané fragmenty vykazovat v podstatě stejné základní terapeutické vlastnosti a účinky jako přirozené lidské proteiny.

Všeobecně se pojem " rekombinantní " týká takových lidských proteinů, které se vyrábí pomocí rekombinantní DNA-technologie. Tyto způsoby zahrnují klonování genu, který koduje stávající lidský protein, inserci odpovídající cDNA nebo genomické DNA ve vhodném vektoru, jako například v bakteriálním plasmidu, a transformaci těchto rekombinantních plasmidů ve vhodných hostitelských buňkách. Klonovaný gen se potom v hostitelské buňce exprimuje a odpovídající lidský protein se izoluje o sobě známým způsobem.

Kapalná nebo lyofilizovaná léčiva obsahují popřípadě běžné farmaceutické pomocné látky jako například stabilizační prostředky nebo organické hydrofilní polymery. Jako stabilizační prostředky se hodí například oligosacharidy, jako například cukroza, tetraloza, laktoza, dextrany s molekulární

hmotností asi 10.000 až 2.000.000 . Organické hydrofilní polymery jsou makromolekuly se základní uhlovodíkovou kostrou, která je vystavěna z hydrofilních monomerních jednotek , které popřípadě mají polární boční skupiny, jako například polyethylenglykol nebo polyvinylpyrrolidon. Přípravky léčiv obsahují dále pufrы běžné ve farmacii, jako například fosforečnany alkalických kovů / fosforečnan sodný nebo fosforečnan draselný popřípadě jejich hydrogensole nebo dihydrogensole /, sole organických nebo anorganických kyselin nebo aminokyselin. Složení různých pufracních látek v receptuře je zvoleno tak, aby rezultovala co nejmenší pufracní kapacita hotových aplikovatelných injekčních nebo infúzních roztoků . To se může dosáhnout i tak, že se použije co nejmenší množství pufracní látky, přičemž by zejména nemělo celkové množství pufru překročit koncentraci v roztoku léčiva 100 mmolů/l. S výhodou se pufracní látky používají v koncentraci 10 až 100 mmolů/l, zejména pak 10 až 60 mmolů/l. V obměně k tomu je také možné, zvolit jednotlivé pufracní látky tak, aby se navzájem kompenzovaly ve svém účinku pohybujícím se v podstatě v kyselé nebo zásadité oblasti pufru. V tomto případě může celkové množství pufracních látek v hotové aplikovatelné formě léku činit až 200 mmolů/l.

Lyofilizovaná léčiva obsahují s výhodou dále prostředek napomáhající vytvářet kostru, který při zmrazení vodného roztoku vytváří krystalickou matici, která zůstává stabilní i během následující

lyofilizace a při delším skladování lyofilizátu za různých vnějších podmínek co se týká její struktury. V tomto smyslu přichází v úvahu jako vhodné prostředky napomáhající vytvářet kostru manitol nebo glycin.

Takto vyrobená léčiva se dostávají do obchodu s výhodou ve formě lyofilizátů. Mohou se používat jako jednodávkové preparáty, přičemž v injekční lahvičce, ampulce nebo podobně je přítomno určité množství lidského proteinu a lyofilizát se rozpustí přidáním odpovídajícího množství rekonstitučního roztoku. Rekonstituční roztok může již obsahovat určité množství louhu, které je nezbytné, aby se nastavila požadovaná hodnota pH injekčního roztoku. Vedle toho mohou být použity běžné isotonické přísady. Lyofilizát může jinak již zcela nebo částečně množství bazických činidel potřebných pro nastavení výhodné oblasti pH, takže se rekonstituce provádí v podstatě destilovanou vodou pro injekční účely. Dále může jak lyofilizát tak i rekonstituční prostředek obsahovat prostředky, které zaručují výrobu isotonického roztoku.

Rekonstituovaný roztok se potom natáhne do injekční stříkačky a může se přímo aplikovat pacientům. Tak zvané preparáty s jednou dávkou obsahují například rh-EPO v množství 500 až 20.000, s výhodou 1.000, 2.000, 5.000, 10.000 nebo 15.000 U. V případě odpovídajícího většího použití lidského proteinu se mohou vyrábět i multidávkové preparáty. V tomto případě se použije větší objem / asi 5 až 10 ml / rekonstitučního roztoku, přičemž tento roztok je potom použitelný pro více aplikací. Množství lidského proteinu, které se má aplikovat může být

v tomto případě stanovenou lékařem individuálně, popřípadě může být použito pro více aplikací u různých pacientů.

Specifická aktivita EPO použitého EPO pro výrobu injekčních nebo infúzních roztoků činí s výhodou asi 160.000 IU na absorpční jednotku při 280 nm / srovn. EP O 209.539.

Injekční roztoky obsahující lidský protein obsahují kromě účinné látky ve vodě rozpuštěné pomocné látky, ke kterým vedle již zmíněných stabilizátorů, pufrů, patří komplexotvorná činidla a smáče - dla. Pufrы se používají v koncentracích asi 1 až asi 100 mmolů/l. Upotřebitelné hodnoty pH roztoků se pohybují asi mezi 4,5 až asi 7,4 u intravenózní aplikace popřípadě mezi asi 6,0 až asi 7,4 při subkutánní aplikaci. Horní mez se pohybuje v oblasti hodnoty pH krve / 7,2 až 7,4 . Vyšším hodnotám pH je radno se vyhnout, protože lidské proteiny nejsou v alkalické oblasti zpravidla stálé.

Příklady provedení vynálezu

Dále je vynález podrobně popsán pomocí příkladů. Jako účinná látka se jako zástupce třídy lidských proteinů nyní používá rh-EPO a G-CSF. Stejně tak ale mohou být používány i jiné lidské proteiny.

Pro výrobu injekčních roztoků, použitelných u vynálezu, se ve sterilním, míchadlem opatřeném V2A - dvoupplášťovém kotli rozpustí ve vodě pomocné látky. Hlavní pomocné látky jsou pufrы, komple-

xotvorná činidla, stabilizátory a smáčeďla. Pro nastavení fyziologicky optimální oblasti pro intravenózní a subkutánní použití se jako puřry hoďí zejména glykokol, natriumcitrát, primární fosforečnan draselný, sekundární fosforečnan sodný, karbonát a sole aminokyseliny, kromě toho sodné a draselné sole kyseliny jablečné, kyseliny maleinové, kyseliny fumarové, kyseliny vinné a kyseliny asparagové a kombinace těchto látek. Puřry se používají v koncentraci asi 1 až asi 100 mmolů/l roztoku. Účinná látka se přidává k roztoku a doplní se na konečný objem a promíchá. Roztok várky se sterilně zfiltruje přes membránový filtr s velikostí pórů 0,2 m. Roztok, který se při tom získá se naplní po 0,5 ml za aseptických podmínek do injekčních lahviček a potom se suší v lyofilizačním zařízení.

Výše popsané receptury jsou stálé i jako hotové injekční roztoky. Při jejich výrobě se získaný roztok nelyofilizuje, nýbrž se po sterilizaci přímo naplní do ampulky nebo injekční lahvičky s objemem asi 1 ml na nádobku.

Pro výrobu farmaceutických podávacích forem, které obsahují lidské proteiny, se používají běžné farmaceutické pomocné prostředky a přísady. Dále se mohou přidávat stabilizátory nebo solubilizační prostředky, jako například bazické aminokyseliny arginin, lysin nebo ornithin. Jako aminokyseliny se přidávají zejména glycin, leucin, isoleucin, threonin, glutamin, kyselina glutaminová, kyselina aminooctová, fenylalanin, jakož i další aminokyseliny uvedené v patentových přihláškách EP 0 430

200 nebo EP 0 306 824, které slouží ke stabilizaci nebo solubilizaci proteinu a kromě toho se mohou používat i jako pufrální látky. Dávkovací forma se může prodávat jako lyofilizát nebo i jako pohotovostní injekční nebo infúzní roztok.

Při výrobě farmaceutické zabalené jednotky se podávací formy opatřují zpravidla přibaleným lístkem, na kterém je mimo jiné obsažen odkaz na to, že infúzní nebo injekční roztoky umožňují dobře snesitelnou, bezbolestnou aplikaci.

Pomocí následujících příkladů se mají roztoky lidského proteinu pro multidávkové nádobky a jejich výroba ještě přesněji popsat. U roztoků se jedná o takové roztoky, které jako lidský protein obsahují EPO nebo G-CSF. Stejně tak se mohou používat ale i jiné lidské proteiny. Vyrobené receptury jsou předloženy jako lyofilizáty nebo jako kapalně přípravky, které při skladování v chladničce asi při $+4^{\circ}\text{C}$ až asi $+8^{\circ}$ vydrží více let stále.

Příklad 1 : EPO 2.000 jednotek suché injekční látky / použití pro 35.000 lahviček/

Ve sterilním, míchadlem opatřeném V2A -dvouplášťovém kotli o obsahu 100 l se rozpustí následující pomocné látky:

močovina	700,0 g	70,0 g	0 g
natriumchlorid	70,0 g	70,0 g	70,0 g
Tween 20	7,0 g	7,0 g	7,0 g
chloreton	70,0 g	70,0 g	70,0 g
natriumdihydrogenfosfát x H_2O	38,4 g	38,4 g	38,4 g
dinatriumhydrogenfosfát x $2\text{H}_2\text{O}$	350,0 g	350,0 g	350,0 g
kalciumpchlorid x $2\text{H}_2\text{O}$	6,4 g	0,42 g	-
glycin	105,0 g	105,0 g	105,0 g

L-leucin	140,0 g	140,0 g	140,0 g
L-isoleucin	140,0 g	140,0 g	140,0 g
L-threonin	35,0 g	35,0 g	35,0 g
L-glutaminové kyseliny	35,0 g	35,0 g	35,0 g
L-fenylalanin	70,0 g	70,0 g	70,0 g
voda pro injekční účely ad	70,0 l	70,0 l	70,0 l

Ke 30 l tohoto pomocného roztoku se přidá 214,3 ml šarže suroviny erythropoietinu a doplní se na konečný objem 35 l a promíchá. Zbylým pomocným roztokem se vypláchne filtrační systém. Roztok várky se sterilně zfiltruje přes membránový filtr s velikostí pórů 0,2 μ m. Sterilně zfiltrovaný roztok se naplní 100 ml . . . injekčních lahviček za aseptických podmínek a nechá se zmrznout v zařízení pro lyofilizaci.

Receptury popsané v příkladu jsou stabilní při skladování jak ve formě lyofilizátu tak i jako hotové injekční roztoky.

Příklad 2 : EPO-lyofilizát 5.000 U a 10.000 U složky:

erythropoietin	5.000 U	10.000 U
kalciumpchlorid x 2H ₂ O	0,151 mg	0,302 mg
natriumpchlorid	2,500 mg	5,000 mg
polysorbát 20	0,250 mg	2,500 mg
natriumdihydrogenfosfát x 1H ₂ O	1,190 mg	2,380 mg
dinatriumhydrogenfosfát x 2H ₂ O	9,965 mg	19,930 mg
kyselina aminooctová	37,500 mg	75,000 mg
L-leucin	5.000 mg	10.000 mg

L-isoleucin	5,000 mg	10,000 mg
L-threonin	1,250 mg	2,500 mg
L-glutaminová kyselina	1,250 mg	2,500 mg
L-fenylalanin	2,500 mg	2,500 mg
voda pro injekční účely ad	2,14 -	4,18
	5,35 ml	10,70 ml

Výroba lyofilizátu se provádí v souladu s předpisem uvedeným v příkladu 1 s tím jediným rozdílem, že se před lyofilizací naplní do 11 ml lahviček, ale do 0,5 ml lahviček.

Tyto lyofilizáty se před použitím rozpustí dobře snášenými rekonstitučními roztoky obsahujícími konzervační látky : chlorbutanol 5,0 mg, voda pro injekční účely ad 1,0 ml. Alternativně se mohou používat i roztoky benzylalkoholu / asi 4 až 5 mg/ml/ za přísady benzaikoniumchloridu / asi 0,01 až 0,05 mg/ml/.

Příklad 3 : hotové injekční roztoky s EPO

složky:	1.000 U/ ampulka	2.000 U / ampulka	5.000 U/ ampulka	10.000 U/ ampulka
EPO	1.000 U	2.000 U	5.000 U	10.000 U
močovina	5,00 mg	5,00 mg	5,00 mg	5,00 mg
polysorbát 20	0,10 mg	0,10 mg	0,10 mg	0,10 mg
NaCl	0,50 mg	0,60 mg	0,60 mg	0,60 mg
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,31 mg	0,62 mg	0,62 mg	0,62 mg
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	5,03 mg	10,06 mg	10,06 mg	10,06 mg
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,04 mg	0,08 mg	0,08 mg	0,08 mg
kyselina amino- octová	7,50 mg	15,00 mg	15,00 mg	15,0 mg
kyselina L-glutaminová	0,25 mg	0,50 mg	0,50 mg	0,50 mg
L-leucin	1,00 mg	2,00 mg	2,00 mg	2,00 mg

pokr. p ³ .				
L-isoleucin	1,00 mg	2,00 mg	2,00 mg	2,00 mg
L-fenylalanin	0,50 mg	1,00 mg	1,00 mg	1,00 mg
L-threonin	0,25 mg	0,50 mg	0,50 mg	0,50 mg
voda pro injekční účely ad	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Způsob výroby se liší od způsobu, který byl použit v příkladu 2 jen tím, že se získaný roztok nelyofilizuje, nýbrž se přímo naplní do ampulky nebo injekční lahvičky po 0,5 ml na nádobku.

Tyto injekční roztoky se před použitím zředí 0,5 ml nebo 1,0 ml konservačního, dobře snášeného roztoku s následujícím složením: benzylalkohol 5,0 mg, voda pro injekční účely ad 1,0 ml. Alternativně se mohou použít i roztoky benzylalkoholu / asi 4 až 5 mg/ml/ za přísady benalkoniumchloridu / asi 0,01 až 0,05 mg/l.

Příklad 4 : roztoky rhG-CSF s pH 2,5

rhG-CSF	0,175 mg
natriumchlorid	1,500 mg
polysorbát 80	0,050 mg
kyselina aminooctová p.a.	5,750 mg
L-leucin	0,500 mg
L-isoleucin	0,500 mg
L-threonin	0,125 mg
kyselina L-glutaminová	0,125 mg
L-fenylalanin	0,250 mg
HCl 0,1 molární	0,000 mg
voda pro injekční účely	+493,025 mg

hodnota pH roztoku pro injekční účely rekonstituo-
veného v ²0,5 ¹ml ¹vody : 2,5.

Tyto injekční roztoky se před použitím zředí 0,5 ml nebo 1,0 ml konservačního, dobře snášeného roztoku s následujícím složením : benzylalkohol 5,0 mg, voda pro injekční účely ad 1,0 ml. Alternativně se mohou použít i roztoky benzylalkoholu / asi 4 až 5 mg/ml/ za přísady benzalkoniumchloridu / asi 0,01 až 0,05 mg/l /.

Příklad 5

Receptury G-CSF s hodnotou pH 4,5

rhG-CSF	0,175 mg
natriumchlorid	1,500 mg
polysorbát 80	0,050 mg
kyselina aminooctová	
p.a.	6,550 mg
L-leucin	0,500 mg
L-isoleucin	0,500 mg
L-threonin	0,125 mg
kyselina L-glutaminová	0,125 mg
L-fenylalanin	0,250 mg
NaOH 0,1 molární	
ad pH 4,5	0,000 mg
voda pro injekční účely	+492,225 mg

Hodnota pH roztoku rekonstituovaného v 0,5 ml vody pro injekční účely : 4,5. Tyto injekční roztoky se před použitím zředí 0,5 ml nebo 1,0 ml konservačního, dobře snášeného roztoku následujícího složení: benzylalkohol 5,0 mg, voda pro injekční účely ad 1,0 ml. Alternativně se mohou použít i, roztoky benzylalkoholu / asi 4 až 5 mg/ml / ze přísady benzalkoniumchloridu / asi 0,01 až 0,05 mg/ml.

Pufrační kapacita : 3,0 mmolu/l NaOH / 30 ml
0,1 n NaOH/
Titrační acidita: 5,0 mmolů /l NaOH / 50 ml
0,1 n NaOH/

Příklad 6

receptura pro G-CSF s hodnotou pH 3,8 až 4,0

rhG-CSF	0,175 mg
natriumchlorid	1,500 mg
polysorbát 80	0,050 mg
kyselina aminooctová p-a-	5,750 mg
L-leucin	0,500 mg
L-isoleucin	0,500 mg
L-threonin	0,125 mg
kyselina L-glutaminová	0,125 mg
L-fenylalanin	0,250 mg
HCl 0,1 molární ad pH 3,8 až 4,0	0,000 mg
vođa pro injekční účely	+493,025 mg

Hodnota pH roztoku rekonstituovaného ve vodě pro injekční účely / v 0,5 ml / : 3,9 . Tyto injekční roztoky se před použitím zředí konservačním, dobře snášeným roztokem s následujícím složením: benzylalkohol 5,0 mg, voda pro injekční účely ad 1,0 ml. Alternativně se mohou použít také roztoky benzylalkoholu / asi 4 až 5 mg/ml/ za přísady benzalkoniumchloridu / asi 0,01 až 0,05 mg/ml/.

Pufrační kapacita: 5,8 mmolů/l NaOH / 58 ml
0,1 n NaOH/
Titrační acidita : 10 mmolů/l NaOH / 100 ml 0,1 n NaOH/.

Příklad 7

Receptury G-CSF s pH 4

rhG-CSF	0,175 mg	0,175 mg	0,175 mg
močovina	2,500 mg	2,500 mg	0,000 mg
natriumchlorid	1,500 mg	1,500 mg	1,500 mg
polysorbát 80	0,050 mg	0,050 mg	0,050 mg
kyselina aminoocetová p.a.	3,750 mg	5,550 mg	5,750 mg
L-leucin	0,500 mg	0,500 mg	0,500 mg
L-isoleucin	0,500 mg	0,500 mg	0,500 mg
L-threonin	0,125 mg	0,125 mg	0,125 mg
kyselina L-glutaminová	0,125 mg	0,125 mg	0,125 mg
L-fenylalanin	0,250 mg	0,250 mg	0,250 mg
voda pro injekční účely	+492,525 mg	+492,975 mg	+493,025 mg

Honota pH formy
lyofilizátu, rozpuště-
név 0,5 ml vody pro
injekční účely

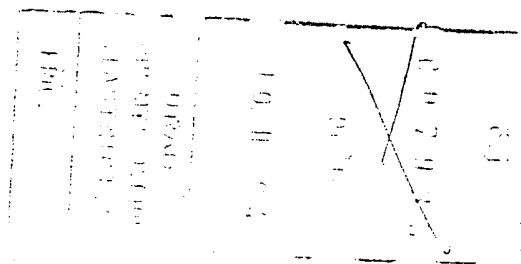
4,0 4,0 4,0

Pufrační kapacita: 5,8 mmolů/l NaOH / 58 ml 0,1 n NaOH/

Titrační acidita : 10 mmolů/l NaOH / 100 ml 0,1 n NaOH/

Receptury popsané v příkladech 1 až 7 jsou sta-
bilní při skladování jak jako lyofilizáty tak i jako
hotové injekční roztoky.

h



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby konservovaných léčiv ,obsahujících lidský protein,pro použití jako injekční nebo infúzní roztok ve formě multidávkových preparátů, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že se při výrobě léčiv přidá nejméně jedno conservační činidlo vybrané ze skupiny chlorbutanolu, benzylalkoholu,benzalkoniumchloridu nebo kombinace těchto látek a koncentrace ~~k~~onservačních činidel v roztoku činí 0,001 až 2 % / hmot. % ku % obj./.

2. Způsob podle nároku 1 , v y z n a ě u j í c í s e t í m , že koncentrace conservačního činidla v injekčním nebo infúzním roztoku činí 0,01 až 1 % .

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2 , v y z n a ě u j í c í s e t í m , že se conservační činidlo používá ve formě kombinace nejméně dvou conservačních činidel.

4. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 3 , v y z n a ě u j í c í s e t í m , že koncentrace chlorbutanolu v injekčním nebo infúzním roztoku činí 2 až 5 mg/ml.

5. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 3 , v y z n a ě u j í c í s e t í m , že koncetrace benzylalkoholu v injekčním nebo infúzním roztoku činí 1 až 5 ml.

6. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 3 , v y -

z n a č u j í c í s e t í m , že koncentrace benzalkoniumchloridu v injekčním nebo infúzním roztoku činí 0,01 až 0,05 mg/ml.

7. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 6 , v y - z n a č u j í c í s e t í m , že se jako lidské proteiny používají EFC,G-CSF nebo proteiny s účinkem podobným účinku aktivátoru plasminogenu.

8. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 7, v y - z n a č u j í c í s e t í m , že pufrální kapacita formulací léčiv se nastaví na hodnotu až do 10 mVal/l.

9. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 8 , v y - z n a č u j í c í s e t í m , že titrační acidita hotových aplikovatelných léčiv je nastavena na hodnotu až do 15 mVal/l.

10. Způsob podle nároku 8 nebo 9, v y z n a - č u j í c í s e t í m , že se pro nastavení pufrální kapacity nebo titrační acidity přidá dobře snášená pufrální látka ze skupiny glykokolu, natriumcitrátu, fosforečnanů alkalických kovů, karbonátů alkalických kovů, solí aminokyselin , soli alkalických kovů kyseliny jablečné, kyseliny malei- nové, kyseliny fumarové, kyseliny vinné, kyseliny asparaginové nebo kombinace těchto látek.

