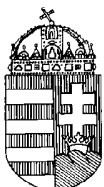


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

210 530 A9

(21) A kérelem száma: P/P 00023
(22) A bejelentés napja: 1994. 09. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
116 434 1987. 11. 03. US

Az alapul szolgáló szabadalom
száma: 0,386,106 országkódja: EP
Az eredeti oltalom kezdete: 1988. 11. 01.

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 37/66
A 61 K 47/00

(72) Feltalálók:

Hwang-Felgner, Jiin-Yu, San Diego, Kalifornia (US)
Maher, James F., Broken Arrow, Oklahoma (US)
Jones, Richard E., Palo Alto, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmas:

Genentech Inc., South San Francisco,
Kalifornia (US)

(74) Képviselő:

ADVOPATENT Szabadalmi Iroda, Budapest

(54)

Gamma-interferon készítmény

Az átmeneti oltalom az 1–14. és 16. igénypontra vonatkozik.

A találmány tárgya

A találmány stabil, biológiailag aktív gamma-interferon folyadékkészítményre vonatkozik.

A találmány háttere

Az immun- vagy gamma-interferont eredetileg fizikai alapokon II. típusú interferonként osztályozták, köszönhetően savas kezelésre és/vagy 56 °C-ra történő melegítésre mutatott érzékenységeinek. E gyakorlati osztályozás megkülönbözteti a vírus-indukálta vagy I. típusú interferonoktól (alfa és béta), amelyek általában nem sav-, illetve hőbomlékonyak. A fő interferon osztályok (alfa, béta és gamma) elleni specifikus antiszérumok széleskörű hozzáférhetősége eredményeként valamennyi típus osztályozását és megkülönböztetését rendszerint szerológiai vagy immunológiai módszerekkel végzik. Ennek ellenére, a gamma-interferon készítményeket még mindig savas kezelés hatására mutatott gyors inaktiválódásuk alapján azonosítják. Lásd: *The Interferon System*, 2. kiadás, W. E. Stewart II, Springer-Verlag, New York, 1981.

A gamma-interferont sok év óta alkalmazzák klinikai vizsgálatokban. A gamma-interferon dózisalakjai elkészítésének napjainkban rendelkezésre álló módszerei a gamma-interferon egyéb összetevőkkel – a felhasználás idején egy megfelelő diluenssel való regeneráció érdekében – végzett liofilizálását foglalják magukban. Mivel a gamma-interferon savbomlékonyként ismeretes, hagyományosa neutrális vagy enyhén lúgos pH-n kezelik. Lásd például: 4 499 014 számú amerikai egyesület államokbeli szabadalom, amelyben liofilizált savas gamma-interferon oldat 6–9 pH-ra történő reaktiválását teszik közzé. A GB 2 119 313A számú egyesült királyságbeli szabadalmi bejelentésben 7,5-es pH-n regenerált, liofilizált gamma-interferon készítményeket tesznek közzé. A nagyobb koncentrációjú, neutrális vagy enyhén lúgos gamma-interferon oldatok az azonali, látható csapadékképződés miatt injektálható készítményekként alkalmatlanok. Az ilyen csapadékok a beadás során trombózt okozhatnak vagy csökkenthetik a hatékonyságot. A 0 196 203 számú európai közrebocsátási iratban liofilizált gamma-interferon 4–6,0 pH-ra történő regenerálását teszik közzé. A 61–277 633 számú japán közrebocsátási iratban (Kokai) felületaktív anyagot tartalmazó interferon készítményt tesznek közzé, de nem javasolják a liofilizálás elhagyását. Az EP-A-80 879 számú európai szabadalmi bejelentésben liofilizált interferon készítményeket tesznek közzé.

Jelen találmány egyik tárgya, hogy injektálásokhoz használható, biológiailag aktív, stabil gamma-interferon folyadékkészítményeket biztosítson. Ezen találmány egy másik tárgya, hogy olyan készítményt biztosítson, amely nem igényli a gamma-interferon készítmény előzetes liofilizálását. A találmány egy másik tárgya, hogy megakadályozzuk a gamma-interferon liofilizálásából eredő dimer- és oligomer-képződést. A találmány további tárgya, hogy megnövelt stabilitású, biológiailag aktív gamma-interferont tartalmazó folyékony készítményt biztosítson. A találmány to-

vábbi tárgya, hogy folyadék állapotban hosszú ideig tartó tárolást lehetővé tevő, a beadás előtti tárolást és szállítást elősegítő folyékony készítményt biztosítson. A találmány további tárgya, hogy csökkentse a gamma-interferon – különösen a melegítéssel összefüggő – aggregálódását. A találmány egy másik tárgya, hogy a hőmérsékletingadozásokra rezisztens folyékony készítményt biztosítson. A találmány további tárgya töltőanyag vagy stabilizálószer – mint a humán szérumbalbumin (HSA) – eltávolítása a készítményből. A találmány további tárgya az egyéb proteinek és vérszennyezők – melyek kapcsolódhatnak a humán szérumbalbuminnal – általi esetleges szennyezések csökkentése. A találmány további tárgya, hogy olyan folyékony készítményt biztosítson, amely a liofilizálási és regenerálási lépések mellőzésével könnyen előállítható és könnyen beadható. A találmány további tárgya, hogy liofilizálatlan gamma-interferont tartalmazó gyógyszerkészítményt biztosítson, amely olcsóbban állítható elő.

A találmány összefoglalása

A találmány tárgyait biológiailag aktív, liofilizálatlan gamma-interferon hatásos mennyiségű tartalmazó folyékony gyógyszerkészítményt illetően valósítjuk meg. A folyékony gyógyszerkészítmény tartalmazhat továbbá puffert, amely képes a folyékony készítmény pH-ját 4,0 és 6,0 értékek között tartani, valamint stabilizáló ágenszt és nem ionos detergenst is. A találmány szerinti folyékony készítményt egy előnyben részesített megvalósításában a pH értéke 4,5–5,5, lehetőleg 5,0. A találmány szerinti gamma-interferon nem liofilizált, hanem éppen ellenkezőleg, mihelyt – átlagosan képzett szakember számára ismert eljárások alkalmazásával – kivonjuk a megfelelő forrásból, közvetlenül a találmány szerinti készítménybe juttatjuk. A találmány szerinti stabilizáló ágens jellemzően többértékű cukoralkohol. E találmány előtt nem voltak tisztában azzal, hogy előállítható egy olyan folyékony gamma-interferon készítmény, amely megtartja biológiai aktivitását, hosszú tárolási idővel rendelkezik, s liofilizálás és regeneráció nélkül gyógyászati l alkalmazható. Ezenfelül, a találmány előtt azzal sem voltak tisztában, hogy gamma-interferon folyadékkészítmény esetében 4–6-os pH tartományban csökkenthető az aggregálódás és a protein hőbomlása, valamint fenntartható a biológiai aktivitás. E találmány előtt azzal sem voltak tisztában, hogy egy liofilizálatlan folyadékkészítmény 5,0 pH-n meghosszabbított tárolási idővel rendelkezhet. Ennek megfelelően, a találmány gyógyászati alkalmazáshoz való, liofilizálatlan gamma-interferont tartalmazó folyékony gyógyszerkészítményre vonatkozik. A találmány szerinti folyékony gyógyszerkészítmény lehetőleg több mint két hetes tárolásra alkalmas.

Részletes leírás

A gamma-interferon és előállítási módszerei, beleértve a rekombináns sejtenyésztetben végzett szintézist, jól ismertek (EP 77 670A és 146 354A). A gamma-interferon körébe tartoznak a rekombináns vagy természetes forrásból származó gamma-interferon és gam-

ma-interferon variánsok is, mint az aminosav-szekven-
cia-variánsok, pl. Cys-Tyr-Cys, illetve desCys-Tyr-Cys
amino-terminális fajták. Szintén idetartoznak az egy
vagy több aminosav-gyököt érintő egyéb inszerciók,
szubsztitúciók vagy deléciók, a glikozilációs varián-
sok, glikozilálatlan gamma-interferonok, a gamma-in-
terferon szerves vagy szervetlen sói és kovalensen mó-
dosított származékai. A folyékony készítményben ki-
alakítani kívánt gamma-interferon hatásos mennyisé-
gét több változó alapján választjuk meg, beleértve a
kezelni kívánt betegséget és a gyógyászati módot. Ál-
talában, a gamma-interferon standard biológiai vizsgá-
latban 1×10^6 – 1×10^7 egység/ml (vagy több) protein tar-
tományban rendelkezik aktivitással.

A jelen találmányban az elegy izotonizálásának bizto-
sítása érdekében stabilizátorként alkalmazandó többér-
tékű cukoralkoholokra példák a három- (vagy több-)
értékű alkoholok, mint a glicerín, eritrit, arabit, xilit,
szorbit és mannit. E többértékű alkoholok alkalmazha-
tók egyedül vagy egymással képzett keverékként. Az
interferon stabilitását illetően a cukoralkoholt 1–25 tö-
megszázalék, lehetőleg 2–5 tömegszázalék mennyiség-
ben adjuk, figyelembe véve az egyéb összetevők
mennyiségét.

A találmányban használatos, a pH-t körülbelül 4,0–
6,0, lehetőleg 4,5–5,5 tartományban tartani képes szer-
ves sav pufferek hagyományos, szerves savakból és
azok sóiból álló pufferek lehetnek, mint a citrát puffe-
rek (pl. nátrium-citrát – binátrium-citrát elegy, citrom-
sav – trinátrium-citrát elegy, citromsav – nátrium-citrát
elegy, stb.), a szukcinát pufferek (pl. borostyánkősav
– nátriumszukcinát elegy, borostyánkősav – nátrium-
hidroxid elegy, borostyánkősav – binátrium-szukcinát
elegy, stb.), a tartarát pufferek (pl. borkősav – nátrium-
tartarát elegy, borkősav – kálium-tartarát elegy, borkő-
sav – nátrium-hidroxid elegy, stb.), a fumarát pufferek
(pl. fumársav – nátrium-fumarát elegy, fumársav – bi-
nátrium-fumarát elegy, nátrium-fumarát – binátrium-
fumarát elegy, stb.), a glükonát pufferek (pl. glükonsav
– nátrium-glükonát elegy, glükonsav – nátrium-hidro-
xid elegy, glükonsav – kálium-glükonát elegy, stb.), az
oxalát pufferek (pl. oxálsav – nátrium-oxalát elegy,
oxálsav – nátrium-hidroxid elegy, oxálsav – kálium-
oxalát elegy, stb.), a laktát pufferek (pl. tejsav – nátri-
um-laktát elegy, tejsav – nátrium-hidroxid elegy, tejsav
– kálium-laktát elegy, stb.) és az acetát pufferek (ecet-
sav – nátrium-acetát elegy, ecetsav – nátrium-hidroxid
elegy, stb.). Figyelemre méltó, hogy a szervetlen sav
pufferek, mint a foszfát pufferek, melyeket hagyomá-
nyosan használnak, a folyékony készítmény pH-ját
nem tartják a kívánt értéken.

A nem ionos detergensek példái közé tartoznak az
olyan felületaktív anyagok, mint a pluronsavak, példá-
ul poliszorbát 80 és poliszorbát 20. A nem ionos deter-
gens 0,05 mg/ml tartományban, előnyösen 0,07–
0,2 mg/ml tartományban, legelőnyösebben 0,1 mg/ml
mennyiségben van jelen.

A találmány szerinti folyékony készítmény 4–6-os
pH-n, méginkább 4,5–5,5 pH-n, s leginkább 5-ös pH-n
melegítés hatására korlátozott aggregálódást mutat.

Ahelyett, hogy a találmány szerinti folyékony készít-
mény bomlékony lenne, hosszú ideig stabil marad. A
találmány szerinti készítmény folyékony állapotban
különböző hőmérsékleteken tárolható. Az előnyben ré-
szesített tárolási hőmérséklet a -20 és $+30$ °C közötti
tartomány, melyben a legelőnyösebb tárolási hőmér-
séklet a körülbelül 2 és 8 °C közötti tartomány. A bioló-
giai aktivitás és a fizikai stabilitás fenntartását illetően
valamennyi komponens fontos. Ráadásul, a találmány
szerinti folyékony készítmény biológiai aktivitását és
fizikai stabilitását fagyasztás nélkül tartja meg. Ez ki-
küszöböli a felolvasztás hatására esetlegesen bekövet-
kező aggregálódást.

A következő példák szemléltetik a találmányt.

1. példa

Folyékony készítmény

Humán rekombináns gamma-interferont (20×10^6
egység/ml) úgy készítettünk, hogy akár $1,0$, akár
 $0,2$ mg/ml mennyiséget borostyánkősavhoz
($0,27$ mg/ml), binátrium-szukcináthoz ($0,73$ mg/ml),
mannit-hoz (40 mg/ml), poliszorbát 20 -hoz ($0,1$ mg/ml)
és megfelelő mennyiségű, injekciós vízhez
(Water For Injection, USP) adtuk. E folyékony készít-
ménnyel kapcsolatban azt találtuk, hogy körülbelül
 2 °C és 8 °C közötti tárolási hőmérsékleten, folyékony
állapotban hosszú tárolási időt mutatott. A szukcinát
puffer a folyékony készítmény pH-ját $5,0$ értéken tar-
totta. A nem ionos detergens a szállítás és kezelés
idején megakadályozta az aggregálódást. A cukor a
készítményt izotóniássá tette, anélkül, hogy só hozzá-
adására lett volna szükség – amelyről megmutatkozott,
hogy a gamma-interferon aggregálódását okozza. A
cukor továbbá láthatóan stabilizálja a találmány szerin-
ti gyógyszerkészítményt (összehasonlítva a szukci-
nát/mannitos liofilizált készítményt a HSA/foszfátos
liofilizált készítménnyel).

A találmány szerinti, $0,2$ mg/ml liofilizálatlan gam-
ma-interferon felhasználásával készített folyadékké-
szítményt két másik, liofilizált gamma-interferon ké-
szítménnyel hasonlítottuk össze. Amint az alábbi 1.
táblázatban látható, az arányossági állandókkal kifeje-
zett biológiai aktivitás csökkenés a szukcinát/mannitos
liofilizált készítmény esetében tízszer, a HSA/foszfátos
liofilizált készítmény esetében ötször volt nagyobb,
mint a találmány szerinti folyékony készítmény eseté-
ben. A bioaktivitás ezen változásait az arányossági ál-
landóval fejezzük ki, amely annak az egyenesnek a
differenciálhányadosa, mely a gamma-interferon ké-
szítmény bioaktivitás-csökkenése vs. idő természetes
alapú logaritmus görbéjének alapján adódik. A bioakti-
vitást az átlagosan képzett szakember számára ismert
vírus elleni védelem vizsgálattal mértük. A liofilizált
készítményeket liofilizált állapotban tároltuk, s külön-
böző időközönként regeneráltuk, hogy meghatározzuk
a liofilizált készítményben megmaradó bioaktivitást. A
találmány szerinti folyékony készítmény tárolhatósági
ideje jelentősen hosszabb volt, mint a liofilizált készít-
ményeké. Az 1. táblázatban feltüntetett folyékony ké-
szítmény liofilizált készítményhez viszonyított hosz-

szabbb tárolhatósági ideje azt mutatja, hogy a találmány szerinti folyékony készítmény tízszer hosszabb ideig tartja meg biológiai aktivitását, mint a liofilizált készítmények.

1. táblázat

0,2 mg/ml koncentrációjúra kialakított
gamma-interferon összehasonlított stabilitása¹

Készítmény	Vizsgálat (hónap)	Arányossági állandó $\times 10^{-3}$	Relatív tárolási idő (nap) ²
Szukcinát/mannit, liofilizált	6	2,854	1
Szukcinát/mannit, folyékony	4	0,205	10
HSA/foszfát, liofilizált ³	3	1,038	5

¹ 5 °C-on tényleges idő alapján.

² A három készítmény bioaktivitásán alapuló relatív stabilitás összehasonlítása, melynek során a szukcinát/mannit liofilizált készítmény tárolási idejét önkényesen egynek választottuk.

³ Ezt a készítményt 0,20 mg liofilizált gamma-interferon, 10 mg HSA, 5 mM nátrium-foszfát (pH = 7,0) összekeverésével készítettük, és 0,9%-os sóoldattal regeneráltuk.

A találmány szerinti, 1 mg/ml liofilizálatlan humán rekombináns gamma-interferon felhasználásával előállított folyékony készítménnyel a fentivel azonos összehasonlító vizsgálatot végeztünk. Amint a 2. táblázatban látható, a bioaktivitás csökkenése a liofilizált készítmény esetében ismételtelen nagyobb volt, mint a találmány szerinti folyékony készítmény esetében. A 2. táblázat megmutatja azt is, hogy a találmány szerinti folyékony készítmény tárolhatósági ideje háromszor hosszabb volt, mint a liofilizált készítményé.

2. táblázat

1,0 mg/ml koncentrációjúra kialakított
gamma-interferon összehasonlított stabilitása¹

Készítmény	Vizsgálat (hónap)	Arányossági állandó $\times 10^{-3}$	Relatív tárolási idő (nap) ²
Szukcinát/mannit, liofilizált	14	0,485	1
Szukcinát/mannit, folyékony	14	0,179	3

¹ 5 °C-on tényleges idő alapján.

² A két készítmény bioaktivitásán alapuló relatív stabilitás összehasonlítása, melynek során a szukcinát/mannit liofilizált készítmény tárolási idejét önkényesen egynek választottuk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Folyadék állapotban hosszán tartó tárolásra alkalmas folyékony gyógyszerkészítmény, amely humán szérum albumin kizárásával liofilizálatlan gamma-interferon hatásos mennyiségét tartalmazza, s mely eleget nem fagyasztjuk, illetve nem liofilizáljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amely tartalmaz még egy, a készítmény pH-ját 4,0 és 6,0 értékek közötti tartományban tartani képes puffert, egy stabilizáló ágenszt és egy nem ionos detergenst is.

3. A 2. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amelyben a puffer szerves sav puffer.

4. A 3. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, ahol a szerves sav puffert a citrátból, szukcináttól, tartarátból, fumarátból, glukonáttól, oxaláttól laktáttól és acetáttól álló csoportból választjuk ki.

5. A 2. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amelyben a stabilizáló ágens többértékű cukoralkohol.

6. Az 5. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, ahol a többértékű cukoralkoholt a glicerintől, eritritből, arabitból, xilitből, sorbitból és mannitből álló csoportból választjuk ki.

7. A 6. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amelyben a cukoralkoholt a készítményre vonatkoztatva körülbelül 1–25 tömegszázalék mennyiségben adjuk.

8. A 7. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amelyben a cukoralkoholt a készítményre vonatkoztatva körülbelül 2–5 tömegszázalék mennyiségben adjuk.

9. A 2. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, ahol a nem ionos detergenst a polisorbát 20-ból és polisorbát 80-ból álló csoportból választjuk ki.

10. A 2. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, ahol a folyékony készítmény pH-ja, 4,5–5,5 tartományban van.

11. A 2. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, ahol a folyékony készítmény pH-ja 5,0.

12. A 2. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amely steril.

13. A 2. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amely a vérrel izotóniás.

14. Az 1. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amely több mint két hetes tárolásra alkalmas.

15. Eljárás folyékony gyógyszerkészítmény előállítására és tárolására, *azzal jellemezve*, hogy liofilizálatlan gamma-interferon hatásos mennyiségét állítjuk elő, s e készítményt vizes állapotban, fagyasztás vagy liofilizálás nélkül, humán szérum albumin hiányában körülbelül négy hónapot meghaladó ideig tároljuk.

16. Vizes állapotban hosszán tartó tárolásra alkalmas folyékony gyógyszerkészítmény, amely lényegében liofilizálatlan gamma-interferon hatásos mennyiségéből, a folyékony készítmény pH-ját 4,0–6,0 tartományban tartani képes pufferből, stabilizáló ágensből és nemionos detergensből áll.