



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

219 445 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 95 00790
(22) A bejelentés napja: 1993. 09. 17.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/947,006 1992. 09. 17. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 93/08802
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/06457

(51) Int. Cl.⁷

A 61 K 38/55
A 61 K 47/26
A 61 P 29/00

(40) A közzététel napja: 1996. 01. 29.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2001. 04. 28.

(72) Feltaláló:

Sabados, Benjamin, K., Broomfield,
Colorado (US)

(73) Szabadalmas:

Amgen Inc., Thousand Oaks, Kalifornia (US)

(74) Képviseelő:

Olchváry Gézáné, DANUBIA Szabadalmi
és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Interleukin-1 inhibitorokat tartalmazó, stabil gyógyszerkészítmények
és eljárás előállításukra**

KIVONAT

Interleukin-1 receptorantagonistát tartalmazó stabil gyógyszerkészítmény, amely 20–200 mg/ml mennyiségben interleukin-1 receptor antagonistát (IL-1-ra) és stabilizálószerként (100:1)–(10 000:1) tömegarányban nemionos felületaktív anyagot vagy 1–2 tömeg% mennyiségben viszkozitásnövelő szert tartalmaz a fizio-

lógias pH-t, előnyösen pH=5–8 közötti értéket biztosító pufferben.

A találmány vonatkozik továbbá a stabil gyógyszerkészítmények előállítási eljárására és a vizes gyógyszerkészítmények előállítására alkalmas kitre is.

A találmány gyógyszerkészítményekre, közelebbről interleukin-1 inhibitorokat tartalmazó stabil gyógyszerkészítményekre vonatkozik.

Az interleukin-1 inhibitorok felhasználhatók az interleukin-1 közvetített betegségek kezelésére. Az interleukin-1 inhibitorokat, fragmenseit, származékait, előállításukat, hatásukat részletesen az US 5 075 222

(U) (X) P S G R K S S K M Q A F R I W D V N Q K T F Y L R N
 N Q L V A G Y L Q G P N V N L E E K I D V V P I E P H A
 L F L G I H G G K M C L S C V K S G D E T R L Q L E A V
 N I T D L S E N R K Q D K R F A F I R S D S G P T T S F
 E S A A C P G W F L C T A M E A D Q P V S L T N M P D E
 G V M V T K F Y F Q E D E

Az interleukin-1 által közvetített betegségek közé tartoznak például a következők: reumás artritisz (RA), gyulladáscélú bélbetegségek (IBD), szepszis, szepszis szindróma, oszteoporózis, ischaemiás sérülések, implantációval kapcsolatos gazdabetegségek, reperfüziós sérülések, asztma, inzulin-diabétesz, myelogenesis és más leukémia, psoriasis, és cachexia. Ezeknél és más, egyéb gyulladáscélú betegségeknél is jellemző a citokin képződése, beleértve az interleukin-1-et is.

A citokinek extracelluláris proteinek, amelyek módosítják a sejt viselkedését, különösen a citokin szintézisének és felszabadulásának közvetlen területén lévő sejteket. Számos ilyen citokin a makrofág/monocita eredetű sejtek által képződik. Így például a reumás artritisz egy autoimmun betegség, amelyre krónikus gyulladáscélú folyamat jellemző, ez elsődlegesen vonatkozik a perifériális ízületek synovialis membránjára [Harris, N. Engl. J. Med. 322: 1277 (1990)]. Az RA betegek ízületi folyadékában jelen lévő mononukleáris sejtek túlnyomó többsége aktivált monocita/makrofág és T limfocita.

Az RA és IBD betegek klasszikus terápiájához tartozik az indometacinnal és más nem szteroidális gyulladáscélú szerrel (NSAID szerek), valamint szalicilátokkal történő kezelés. Kimutatták, hogy az interleukin-1 receptorantagonisták szintén hasznosak a reumás artritisz kezelésénél. A szepszist és szepszis sokkot például a következőkkel kezelték: vazóaktív szerek, antibiotikumok, (β -receptor-stimulánsok, beleértve az izoprenolt és dopamint, továbbá α -receptor-blokkoló szerek, így például fenoxi-benz-amin és fentol-amin. Az oszteoporózist ösztrogénekkal, D-vitaminnal és fluoriddal kezelték. Az ischaemiás sérüléseket klasszikus módszer szerint antikoagulánsokkal és vérlemezkegátló vegyületekkel kezelték. Az asztma kezeléséhez a terápiák széles skáláját alkalmazták, így például az α -vagy β -adrenergias stimulánsokat a légutak tágítására, metil-xantinokat a légúti nyálka mozgásának fokozására, glükokortikoidokat a légúti gyulladások csökkentésére, kromolin-nátriumot a hízósejtek degranulálódásának gátlására, valamint antikolinergias szereket hörgőtágítóként.

Mindezen kezelésekkal azonban különböző problémák voltak. Így például, ha a jelenleg ismert terápiákat alkalmazzák, a szepszis sokk esetében a halálozási

számú szabadalmi leírásban ismertetik. Az ilyen interleukin-1 inhibitorokról ismert az is, hogy azok interleukin-1 receptorantagonisták (IL-1ra). Az említett US 5 075 222 számú szabadalmi leírás szerint az IL-1ra egy polipeptid, amely a következő aminosavszekvenciának vagy annak IL-1 inhibíciós fragmensének felel meg:

arány 40–50%-os. Így szükség van új gyógyszerekre, így például az interleukin-1 receptorantagonistákra az ilyen tünetek kezelésére, valamint az ilyen szereket elfogadható módon bejuttató készítményekre.

Az AU 9173636 számú ausztrál szabadalmi bejelentésben, valamint a 2 039 458 számú kanadai szabadalmi bejelentésben interleukin-1 receptorantagonisták alkalmazását említik a fentiekben említett interleukin-1 által közvetített betegségek kezelésénél. Az említett hivatkozásokban alkalmazott IL-1ra készítmény egy oldat, amely 10 mmol nátrium-foszfátot (pH=7), 150 mmol NaCl-ot, 0,1 mmol EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav) tartalmaz. Ezen készítményben az anyag csupán körülbelül 2 hétig marad stabil normál hűtési körülmények között (4–8 °C). Mivel az IL-1 közvetített betegségek kezelését hosszú időn át kell végezni, és szükség van az IL-1ra szállítására és tárolására, szükség van a stabilabb készítményekre.

Ismert, hogy a Polysorbate 80, amelyet poli(etilén-oxi)-szorbitán monooleátként is ismernek, vagy a Tween 80 nemionos biológiai detergens vagy felületaktív anyag, amelyet a legkülönbözőbb célokra lehet alkalmazni, így például emulgeálószerként, stabilizáló- és diszpergálószerként.

A WO-A-92 12724, JP A 49054514 és JP A 49054513 számú szabadalmi leírásokban különböző hatóanyagokat tartalmazó gyógyszerkészítményeket ismertetnek, amelyek tartalmaznak nemionos felületaktív anyagokat, ezek alkalmazása azonban minden esetben az emulziókészítés célját szolgálja, a hatóanyag, különösen proteinek stabilizálására utalást a leírások nem tartalmaznak.

A nemionos felületaktív anyagokat, így például a Polysorbate 80-at adagolják továbbá bizonyos proteinkészítményekhez az aggregáció és denaturáció gátlása érdekében, valamint az oldhatóság növelésére. A Polysorbate 80-at a legkülönbözőbb vegyületek stabilizálására alkalmazták. Az US 4 156 777 számú szabadalmi leírásban eljárást ismertetnek glükopiranoz-nitroz-karbamid vegyületek előállítására, amelynél Polysorbate 80-at alkalmaznak stabilizálószerként. Az US 4 816 459 számú szabadalmi leírásban a Polysorbate 80 stabilizálószer alkalmazását ismertetik tetrazolil-szubsztituált pirido[1,2-a]pirimidinek előállításánál. Az US 5 032 574 számú szabadalmi leírás szerint Poly-

sorbate 80-at alkalmaznak a hatóanyag szolubilizálására vagy diszpergálására 3700 D molekulatömegű antimikrobás hatású peptideket tartalmazó gyógyszerkészítményeknél, az US 5 032 574 számú szabadalmi leírásban pedig a Polysorbate 80-at emulgeálószerként alkalmazták kollagén termékeknél. Azonban igen nehéz előre megjósolni egy adott stabilizálószer hatását egy adott protein stabilitására. Így például a stabilizálószer és a protein kölcsönhatása kiválthatja a protein degradációját ahelyett, hogy a kívánt, degradációt csökkentő szerként hatna.

Ennek megfelelően szükség van olyan készítményekre, amelyek stabilizálják az IL-1 inhibitorokat. A jelen találmány szerinti megoldás kielégíti ezt a szükségletet, és megfelelő előnyöket is biztosít.

A találmány szerinti készítmények interleukin-1 inhibitorokat, (interleukin-1 receptorantagonistákat), puffereket és nemionos felületaktív anyagokat vagy viszkozitást növelő szereket tartalmaznak, és ezek stabil gyógyszerkészítményt biztosítanak. A találmány szerinti készítmények alkalmasak intraartikuláris, intravénás, intramuszkuláris, szubkután, intradermális, intratekális, intraventrikuláris (CNS), topikális vagy orális adagolásra vagy felhasználhatók kúpként, kenőcsként vagy inhalációs aeroszolként.

A találmány szerinti készítményekben az IL-1 inhibitor hatóanyagot előnyösen tiszta formában alkalmazzuk, ami azt jelenti, hogy az lényegében mentes más, IL-1 inhibitor proteintól eltérő más proteinektől.

A találmány tehát gyógyszerkészítményekre vonatkozik, amelyek IL-1 inhibitor és nemionos felületaktív anyagot vagy viszkozitást növelő szert tartalmaznak. Kimutatták, hogy az IL-1ra igen érzékeny a rázásra. Tisztított IL-1ra-koncentrátumot tartalmazó fiolák rázás hatására kicsapódnak és ily módon ezek nem elégitik ki a megjelenésre és a szemcsézetre vonatkozó követelményeket. Annak érdekében, hogy a nemkívánatos aggregációhoz vezető kicsapódást megakadályozzuk, a készítmények módosítása volt szükséges.

Az egyik megvalósítási formánál a gyógyszerkészítmény IL-1 inhibitor, pontosabban IL-1ra anyagot és nemionos felületaktív anyagot tartalmaz. A nemionos felületaktív anyag egy olyan felületaktív anyag, amelynél a szolubilizáló hatást egy etilén-oxid-csoportokból álló lánc biztosítja. A felületaktív anyag megváltoztatja annak az oldószernek a tulajdonságait, amelyben az oldva van, és ez a hatás sokkal nagyobb mértékű, mint amelyet a koncentrációja alapján várhatnánk. A nemionos felületaktív anyagok hidrofil tulajdonságát a vízmolekulákkal kialakított hidrogénkötések biztosítják. Az oxigénatomok és hidroxilcsoportok könnyen képeznek erős hidrogénkötéseket, míg az észter- és amidcsoportok sokkal nehezebben alakítanak ki hidrogénkötéseket. A hidrogénkötések révén jön létre szolubilizálás semleges és alkálikus közegben. Erősen savas környezetben az oxigénatomok protonálódnak, és így egy kvázikationos karakterűek lesznek. Mindegyik oxigénatom hozzájárul a vízben való oldhatósághoz. Ezért több, mint egy oxigénatom szükséges a nemionos felületaktív anyagok vízben való oldásához. A nemionos fe-

lületaktív anyagok kompatibilisek ionos és amfoter felületaktív anyagokkal. Miután a poli(etilén-oxi)-csoportok könnyen bevihetők etilén-oxid és bármely, aktív hidrogénatomot tartalmazó molekula reakciója révén, az oxilálás révén a legkülönbözőbb szerkezetek szolubilizálhatók (Encyclopedia of Chemical Technology, 3. kiadás, 22, 360).

A felületaktív anyag továbbá a proteinek aggregációjának és denaturálódásának csökkentésére is szolgál. Az „aggregáció” kifejezés azt jelenti, hogy több proteinmolekula egy komplexet alkot, azaz több protein összekapcsolódik. A „denaturálás” kifejezés azt jelenti, hogy a proteinek elvesztik a szekunder és terciér szerkezetüket, ami gyakran összefüggésben van a bioaktivitás elvesztésével is. Az aggregáció csökkentésével ugyancsak csökken a felületi töltések változásából eredő fizikai aggregáció is. Úgy gondoljuk, hogy a nemionos felületaktív anyag a levegő-folyadék határfelület blokkolására is szolgál, és ez megakadályozza ezen határfelületen a protein denaturálódását. Továbbá a nemionos felületaktív anyagok alkalmazása lehetővé teszi, hogy a készítményeket nyíró felületi feszültségnek tegyük ki anélkül, hogy a protein denaturálását okoznánk. Továbbá az ilyen felületaktív anyagot tartalmazó készítmények felhasználhatók aeroszolos eszközökben is, így például tüdőbe való adagolásnál, és tű nélküli sugárfecskendő pisztolyoknál.

A találmány szerinti gyógyszerkészítményeknél alkalmazható nemionos felületaktív anyagok közé tartoznak például a következők: etilén-oxid és propilén-oxid blokk-kopolimerek, propilén-oxid és etilén-oxid blokk-kopolimerjei, szorbitán-monolaurát, szorbit-észter, poliglicerin-zsír-sav-észter, kokamid DEA lauril-szulfát, alkanolamid, poli(etilén-oxi)-propilén-glikol-sztearát, poli(etilén-oxi)-lauril-éter, poli(etilén-oxi)-cetil-éter, poliszorbát, glicerín-monosztearát, glicerín-disztearát, szorbit-monopalmitát, poli(etilén-oxi)-szorbitán-monoleát, poli(etilén-oxi)-szorbitán-monolaurát és propilén-glikol-monosztearát. Például a rázási vizsgálatokkal, amelyeknél kontrollként IL-1ra-t és 0,1% Polysorbate (Tween) 80-at tartalmazó IL-1ra-t hasonlítottunk össze, kimutattuk, hogy a 0,1% Polysorbate 80-at tartalmazó IL-1ra pufferoldatban a háttérérték hasonló volt a nem kezelt kontrolléhoz, míg a Polysorbate 80-at nem tartalmazó IL-1ra készítményben jelentős kicsapódás mutatkozott. A kicsapódás mértékét úgy mértük, hogy egy 96 lyukú lemezben minden lyukba 150 µl vizsgálandó anyagot tettünk, és mértük a zavarosságot (turbiditás) 405 nm-nél. Ezen rázási vizsgálat kimutatta a Polysorbate 80-at tartalmazó készítmények előnyét. Más felületaktív anyagot szintén vizsgáltunk a stabilizálóképességük meghatározása érdekében, ezeket a következő példákban ismertetjük majd.

Minden vizsgált készítménynél kimutattuk az ellenálló képességet a rázás során bekövetkező fizikai degradációval és kicsapódással szemben. Ugyancsak azt tapasztaltuk, hogy növekvő interleukin-1 inhibitor-koncentrációknál 0,1% alatti koncentrációk esetén arányosan több felületaktív anyagot alkalmaztunk a készítmény stabilizálására. A 0,1 tömeg% nagyságrendű Po-

lysorbate 80 koncentrációk előnyösek a készítmény stabilizálására.

A találmány egy további kiviteli formájánál a találmány szerinti gyógyszerkészítmény IL-1ra inhibitor, különösen IL-1ra-t és egy viszkozitásnövelőt tartalmaz. A viszkozitásnövelő szer egy olyan anyag, amely sűrítőszerként hat, és növeli a készítmény viszkozitását. Úgy gondoljuk, hogy a viszkozitást növelő szer megakadályozza, hogy az IL-1ra-molekulák egymással vagy a levegő-folyadék határfelülettel kölcsönhatásba lépjenek, amely a fizikai degradációhoz vezetne.

A találmány szerinti megoldásnál alkalmazható viszkozitásnövelő szerek közé tartoznak például a következők: polietilén-glikol (PEG), hidroxil-propil-celulóz, valamint a karagén-gumi. A kísérleteink során a PEG alkalmazását értékeltük a kicsapódás és aggregáció gátlása szempontjából.

Úgy találtuk, hogy 2% körüli PEG-mennyiség hatásos a kicsapódás megakadályozására.

A találmány szerinti gyógyszerkészítmények tartalmaznak továbbá egy puffert a pH kívánt biológiai szinten tartása érdekében. Erre a célra bármilyen nemtoxikus puffer alkalmazható, előnyösek például a következők: foszfátpuffer, citrát-puffer és acetát-puffer.

Az elkészített gyógyszerkészítményt steril fiolákban tárolhatjuk oldat, szuszpenzió, gél, emulzió, szilárd anyag vagy dehidratált vagy liofilizált por formájában. Az ilyen készítményeket tárolhatjuk akár felhasználásra kész formában, akár olyan formában, amelyet közvetlenül az adagolás előtt hozunk adagolásra kész formára. A készítményeket előnyösen a hűtőszekrény hőmérsékletét megközelítő hőmérsékleten vagy pedig fagyaszta tároljuk. Előnyös továbbá hogy az IL-1ra-t tartalmazó készítményeket a fiziológiai pH közelében tároljuk és adagoljuk. Úgy gondoljuk, hogy a magasabb pH-jú (pH > 8) vagy az alacsonyabb pH-jú (pH < 5) készítmények ezen szempontokból nem kívánatosak.

A találmány szerinti gyógyszerkészítményeket kialakíthatjuk a szakterületen ismert kitétek formájában is. Ezek esetünkben két rekeszt tartalmaznak, ezek egyike tartalmazza a találmány szerinti gyógyszerkészítményt liofilizált formában, a másik egy oldószert tartalmaz a por felhasználáskor történő oldására.

A találmány szerinti, IL-1ra hatóanyagot tartalmazó gyógyszerkészítmények adagolását előnyösen intrartikulárisan, szubkután, intradermálisan, intratekálisan, intraventriculárisan (CNS), intramuszkulárisan, intravenásan, topikálisan vagy orálisan adagoljuk, de az adagolást végezhetjük kúpok, kenőcsök vagy inhalációs aeroszolok formájában is. Az IL-1ra kívánt szintjének szervezetben való biztosítása érdekében ismételt dóziszokat is adagolhatunk. Mindezen módszerekkel a beteg véráramában vagy más szövetben vagy folyadékban egy meghatározott koncentrációsintet kívánunk biztosítani az IL-1ra vonatkozásában. Így például úgy gondoljuk, hogy kisebb mint 0,01 ng/ml plazma-IL-1ra-koncentráció fenntartása a keringő vérplazmában egy nem hatásos készítményt jelezhet, míg 100 µg/ml vagy magasabb szint ismételt fenntartása a keringő véráramban nemkívánatos mellékhatásokat jelenthet.

Mint már fent is említettük, bizonyos IL-1ra-tartalmú készítményeket orálisan kell adagolni. Az ily módon adagolt IL-1ra készítmények előnyösen enterális vagy polimer bevonatúak. Az enterális vagy polimer bevonatú IL-1ra készítményeket formulázhatjuk a szilárd dózisok kialakításánál általánosan alkalmazott hordozóanyagokkal vagy anélkül. Ezeket az anyagokat előnyösen úgy választjuk meg, hogy a készítmény aktív része a gyomor-bél traktusban azon a ponton szabaduljon fel, amikor a biohosszáférhetőség maximális, és a preszisztémás degradáció minimális. A biohosszáférhetőség várhatóan a preszisztémás degradáció révén csökken, így az orális dózisok nagyobbak a fent említett dózisoknál. Továbbá ezek a készítmények tartalmazhatnak még más adalékokat is, amelyek elősegítik az IL-1ra abszorpcióját. A készítményekben alkalmazhatunk továbbá hígítóanyagokat, izanyagokat, alacsony olvadáspontú viaszokat, növényi olajokat, kenőanyagokat, szuszpendálószerkeket, tablettadezintegrálódást elősegítő szereket, továbbá kötőanyagokat is.

Az interleukin-1 közvetített artritisz kezelésénél az előnyös szubkután dózis a vérben 1 és 1000 µg/ml IL-1ra-koncentrációt kell, hogy biztosítson. Ennek megfelelően előnyös, hogy kezdetben olyan dózist adagoljunk, amely 10 µg/ml plazma feletti IL-1ra keringő szintet biztosít, majd ezután olyan gyakorisággal végezzük az adagolást, hogy a keringő IL-1ra szintet körülbelül 10 µg/ml plazmaszintnél vagy e felett tartsuk. Az adagolás gyakorisága függ a készítményből a szubkután IL-1ra abszorpcióját leíró farmakokinetikai paraméterektől. Az adagolás gyakorisága lehet 1-10 alkalom naponta vagy lehet ennél kisebb napi gyakoriságú is, ha nyújtott vagy időzített felszabadulású dózisformákat alkalmazunk.

Az interleukin-1 közvetített IBD kezelése esetén az előnyös dózis 0,5-50 mg/testtömeg-kg, előnyösen 1-10 alkalommal vagy ritkábban naponta. Egy még előnyösebb kiviteli formánál a dózis 1-10 mg/kg 3-5 alkalommal adagolva naponta. Az adagolás gyakorisága függ az alkalmazott készítményből az IL-1ra abszorpcióját leíró farmakokinetikai paraméterektől. Ha az interleukin-1 közvetített IBD kezelésére alkalmazzuk, az IL-1ra adagolását végezhetjük alkalmasan kialakított kenőcsök formájában is.

Az interleukin-1 közvetített szepszis sokk kezelésénél az előnyös dózis 10-120 mg/testtömeg-kg naponta 24 órán át folyamatosan adagolt intravenás infúzió formájában. Egy még előnyösebb módozatnál a dózis 1-2 mg/testtömeg-kg óránként intravenás folyamatos infúzióval.

Az interleukin-1 közvetített ischaemiás és reperfüziós sérülések kezelésénél az előnyös dózis 1-50 mg/testtömeg-kg óránként. Egy előnyös módozatnál kezdő boluszként 15-50 mg/kg IL-1ra-t adagolunk, majd ezt követően óránként 5-20 mg/kg hatóanyagot adagolunk injekció formájában. A dózis gyakorisága függ az alkalmazott készítményben lévő IL-1ra farmakokinetikai paramétereitől.

Függetlenül az adagolás módjától, az adott dózist a beteg hozzávetőleges testtömege vagy -felülete alap-

ján számítjuk. A számítás egy további finomítása szükséges a megfelelő dózis meghatározásához bármelyik fenti készítmény alkalmazása esetén, és ezt a szakterületen jártas szakember rutinszerűen el tudja végezni, és rutinszerű feladatként kezeli szükségtelen kísérletek elvégzése nélkül. Ezek a dózisok megállapíthatók ismert módszerek alkalmazásával, amelyeket a megfelelő dóziszválaszatokkal és farmakokinetikai adatokkal együttesen alkalmaznak a dózisok meghatározásához.

Megjegyezzük, hogy a találmány szerinti IL-1ra készítményeket állatgyógyászati és embergyógyászati területen egyaránt alkalmazhatjuk és a „beteg” kifejezés semmiképpen sem korlátozó jelentésű. Állatgyógyászati felhasználás esetén a dózisintervallumok azonosak a fentiekben megadottakkal.

A következő példákkal bemutatjuk a találmány szerinti készítmények hatását, amelyek során azt tapasztaltuk, hogy ezek kielégítik az előzőekben a találmány célkitűzésénél meghatározott feladatokat.

A következő kísérletek során az ellenőrzést 450 nm-nél mért optikai sűrűség-meghatározással végeztük, ezeket különböző rekombináns humán IL-1ra (rhIL-1ra) koncentrációknál mértük különböző rázási időtartamok után. A kapott eredményeket a következő 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat
Ellenőrzés

Idő órában	IL-1ra-koncentráció (mg/ml)			
	200	150	100	50
0	0,062	0,060	0,070	0,051
1,75	0,0171	0,099	0,089	0,066
8	0,692	0,694	0,498	0,371
12	0,967	0,765	0,560	0,258

1. példa

A készítmény előállítása

10 mmol EDTA készítése: 0,93 g EDTA-t bemérünk egy 250 ml térfogatú tározott edénybe, hozzáadunk 200 g steril, injekció céljára alkalmas vizet, majd a lombik tartalmát keverjük, és a pH-értékét $6,5 \pm 0,02$ ér-

tékre beállítjuk NaOH adagolásával, és a mennyiséget 250 g-ra beállítjuk.

Puffer készítése: 900 g steril, injekció céljára alkalmas vizet adunk egy 1 l-es tározott lombikba, hozzáadunk 8,20 g NaCl-ot (Sigma, St. Louis, MO), 2,86 g nátrium-citrát-dihidrátot (Sigma, St. Louis, MO) és 0,058 g citromsav-monohidrátot (Sigma, St. Louis, MO), majd a kapott keverékhez 50 g 10 mmólos fentiek szerinti EDTA-t adagolunk. A kapott keveréket addig keverjük, amíg az összes szilárd anyag feloldódik, majd a pH-értékét $6,5 \pm 0,02$ értékre beállítjuk NaOH adagolásával, majd a mennyiséget 1000 g-ra kiegszítjük.

A készítmény előállítása: a tisztított rhIL-1ra-koncentrátumot a -70 °C hőmérsékletéről eltávolítjuk, majd szobahőmérsékleten hagyjuk felengedni. A tisztított rhIL-1ra-koncentrátumot a WO 91/08285 számú közzétett szabadalmi bejelentésben leírtak szerint állítjuk elő. Ezt az anyagot körülbelül 190–250 mg/ml közötti koncentrációra betöményítjük, az anyag 10 mmol nátrium-citrátot, 150 mmol nátrium-kloridot és 0,5 mmol EDTA-t tartalmaz, pH=6,5.

A fentiek szerint előállított puffert alkalmazzuk a koncentráció beállítására. Különböző koncentrációkat vizsgálunk, ezek a következők: 200 mg/ml, 100 mg/ml, 80 mg/ml, 70 mg/ml, 50 mg/ml és 20 mg/ml. Tween 80-at (Spectrum, Lot D 1014) adagolunk úgy, hogy az össz-koncentrációérték Tween 80-ra 0,01 tömeg% legyen. Az oltalmi körbe tartoznak a 0,01%–1% közötti Tween 80 koncentrációértékek.

A készítmény stabilitása

A készítmény rázással szembeni stabilitását vizsgáltuk úgy, hogy a különböző koncentrációjú anyagokat különböző ideig rázattuk forgó rázással. A kívánt ideig tartó rázás után mértük az oldat optikai sűrűségét 450 nm-nél kinetikus mikrolemezes leolvasó (Molecular Devices) alkalmazásával. A készítményt stabilnak tekintettük, ha az optikai sűrűség értéke 450 nm-nél kevesebb mint körülbelül 0,15 volt. Ha az optikai sűrűség 450 nm-nél 0,15 vagy ennél nagyobb érték, zavarosodás figyelhető meg a kiváló szilárd részecskék jelenlétének következtében, és ezt a készítményt instabilnak tekintjük. A kísérletnél kapott eredményeket a következő 2. táblázatban foglaljuk össze. Az adatokból látható, hogy 0,1% mennyiségű Tween 80 stabilitást biztosít rázással szemben az IL-1ra készítményeknek, amelyeknek koncentrációja 20–200 mg/ml érték között van.

2. táblázat

0,1 tömeg% Tween 80
20–200 mg/ml IL-1ra

Idő órában	IL-1ra-koncentráció (mg/ml)					
	200	100	80	70	50	20
0	0,057	0,048	0,051	0,046	0,046	0,043
8	0,057	0,054	0,051	0,048	0,046	0,044
16	0,057	0,051	0,052	0,048	0,046	0,043
24		0,054	0,053	0,048	0,045	0,044

Klinikai vizsgálatok: az IL-1ra-t tartalmazó A készítményekkel véletlen eloszlású, kettős vakpróba, placebo-ellenőrzött fázis(II) vizsgálatot végeztünk 8 különböző ország 63 centrumában. A vizsgálatot 901 betegen végeztük, amelyek mindegyike szepszis szindrómában szenvedett, ugyanakkor hipotenzio és/vagy végszervdiszfunkció is bizonyított volt. A betegeket véletlenszerűen a következő 3 csoport valamelyikébe osztottuk: placebo, IL-1ra (100 mg terhelődózis 72 órán át történő 1 mg/kg/óra intravénás infúziót követően) vagy IL-1ra (100 mg terhelődózis 72 órás 2 mg/kg/óra intravénás infúziót követően).

A 901 beteg közül 298-nak 1 mg/kg/óra mennyiségben IL-1ra-t, 293-nak 2 mg/kg/óra mennyiségben IL-1ra-t és 302-nek placebot adagoltunk. Az eredmények retrospektív analízise kimutatta, hogy az IL-1ra növeli a túlélést szepszis szindrómában szenvedő betegeknél a halálozás növekvő, várható rizikójának függvényében.

A halálozási rizikót rizikójóslási modell alkalmazásával határoztuk meg, amelyet a fázisIII vizsgálatról függetlenül adatbázisból fejlesztettünk ki. A modellt értékeltük és azt találtuk, hogy alkalmas a placebo halálozási arány jóslására a fázisIII vizsgálatnál. 893 beteg közül 892 esetén szereztünk adatot a halálozás várható rizikójára. Az eredmények azt mutatták, hogy az IL-1ra statisztikusan szignifikáns módon növeli a túlélést a betegeknél, ahol a halálozás várható rizikója >24% ($p=0,032$). Ezen betegeknél az IL-1ra 22%-kal csökkenti a halálozást a placebohoz viszonyítva.

2. példa

B készítmény

EDTA- és pufferoldatokat állítunk elő az 1. példában leírtak szerint.

A készítményt szintén az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő, kivéve, hogy csak egyetlen koncentrációt alkalmazunk (100 mg/ml). Nemionos felületaktív anyagként Tween 20 (Spectrum) anyagot alkalmazunk. A kísérlet eredményeit a következő 3. táblázatban foglaljuk össze. A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a Tween 20 0,01 és 1 tömeg% érték között biztosít stabilitást rázás esetén az IL-1ra készítmények számára.

3. táblázat

Tween 20 0,001–1 tömeg%
IL-1ra 100 mg/ml

Idő órában	Tween 20 tömeg%				
	0,001	0,01	0,1	0,5	1,0
0	0,061	0,056	0,058	0,059	0,063
1,75	0,113	0,052	0,051	0,061	0,071
8	0,667	0,075	0,063	–	–
12	0,580	0,075	0,064	–	–

3. példa

C készítmény előállítása

Az EDTA- és pufferoldatokat az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő.

A készítményt szintén az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő, kivéve, hogy csak egyetlen koncentrációt alkalmazunk (100 mg/ml). Nemionos felületaktív anyagként Pluronic 108 (BASF) terméket alkalmazunk. A kísérlet eredményeit a 4. táblázatban foglaljuk össze. A kísérlettel kimutatjuk, hogy a Pluronic 108 0,01 és 1 tömeg% közötti koncentrációértékekben stabilitást biztosít rázás esetén az IL-1ra készítmények számára.

4. táblázat

Pluronic 108 0,001–1 tömeg%
IL-1ra 100 mg/ml

Idő órában	Pluronic 108 tömeg%				
	0,001	0,01	0,1	0,5	1,0
0	0,059	0,057	0,057	0,061	0,065
1,75	0,056	0,084	0,052	0,065	0,066
8	0,134	0,071	0,069	–	–
12	0,048	0,069	0,068	–	–

4. példa

D készítmény előállítása

Az EDTA- és pufferoldatokat az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő.

A készítményt szintén az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő, kivéve, hogy csak egyetlen koncentrációt alkalmazunk (100 mg/ml). Nemionos felületaktív anyagként Pluronic F68 (BASF) terméket alkalmazunk. A kapott eredményeket a következő 5. táblázatban foglaljuk össze. Az eredményekből látható, hogy a Pluronic F68 0,01 és 1 tömeg% koncentrációban biztosít stabilitást rázás esetén az IL-1ra készítmények számára.

5. táblázat

Pluronic F68 0,001–1 tömeg%
IL-1ra 100 mg/ml

Idő órában	Pluronic F68 tömeg%				
	0,001	0,01	0,1	0,5	1,0
0	0,066	0,064	0,070	0,063	0,063
1,75	0,083	0,059	0,066	0,063	0,063
8	0,096	0,073	0,066	–	–

5. példa

E készítmény előállítása

Az EDTA- és pufferoldatokat az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő.

A készítményt szintén az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő, kivéve, hogy csak egyetlen koncentrációt

alkalmazunk (100 mg/ml). Nemionos felületaktív anyagként Pluronic F127 (BASF) terméket alkalmaztunk. A kapott eredményeket a következő 6. táblázatban foglaljuk össze. Az eredményekből látható, hogy a Pluronic F127 0,01 és 1 tömeg% koncentrációban biztosít stabilitást rázás esetén az IL-1ra készítmények számára.

6. táblázat
Pluronic F127 0,001–1 tömeg%
IL-1ra 100 mg/ml

Idő órában	Pluronic F127 tömeg%				
	0,001	0,01	0,1	0,5	1,0
0	0,065	0,057	0,056	0,060	0,063
1,75	0,059	0,049	0,049	0,066	0,064
8	0,215	0,071	0,059	–	–
12	0,170	0,072	0,059	–	–

6. példa

F készítmény előállítás

Az EDTA- és pufferoldatokat az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő.

A készítményt szintén az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő, kivéve, hogy csak egyetlen koncentrációt alkalmazunk (100 mg/ml). Nemionos felületaktív anyagként PEG 8000 (Spectrum) terméket alkalmaztunk. A kapott eredményeket a következő 7. táblázatban foglaljuk össze. Az eredményekből látható, hogy a PEG 8000 1 tömeg% körüli koncentrációnál biztosít stabilitást rázás esetén az IL-1ra készítmények számára.

7. táblázat
PEG 8000 1 és 2 tömeg%
IL-1ra 100 mg/ml

Idő órában	PEG 8000 tömeg%	
	1,0	2,0
0	0,068	0,135
4	0,117	0,483
6	0,131	0,569
10	0,140	0,709

(U) (X) P S G R K S S K M Q A F R I W D V N Q K T F Y L R N
N Q L V A G Y L Q G P N V N L E E K I D V V P I E P H A
L F L G I H G G K M C L S C V K S G D E T R L Q L E A V
N I T D L S E N R K Q D K R F A F I R S D S G P T T S F
E S A A C P G W F L C T A M E A D Q P V S L T N M P D E
G V M V T K F Y F Q E D E

– ahol U hiányzik vagy jelentése M, és X jelentése R vagy P –

7. példa

G készítmény előállítás

Az EDTA- és pufferoldatokat az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő.

A készítményt szintén az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő, kivéve, hogy csak egyetlen koncentrációt alkalmazunk (100 mg/ml). Nemionos felületaktív anyagként PEG 300 (Spektrum) terméket alkalmaztunk. A kapott eredményeket a következő 8. táblázatban foglaljuk össze. Az eredményekből látható, hogy a PEG 300 1 tömeg% körüli koncentrációban biztosít stabilitást rázás esetén az IL-1ra készítmények számára.

8. táblázat
PEG 300 1 és 2 tömeg%
IL-1ra 100 mg/ml

Idő órában	PEG 300 tömeg%	
	1,0	2,0
0	0,068	0,064
4	0,107	0,107
6	0,127	0,120
10	0,140	0,133

Bár a találmányt közelebbről a fenti, adott megvalósítási módokkal ismertettük, ezek semmiképpen sem korlátozzák azt. Különböző, a szakember számára nyilvánvaló módosítások szintén a találmány oltalmi körébe esnek.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Interleukin-1 receptorantagonistát tartalmazó stabil gyógyszerkészítmény, amely 20–200 mg/ml mennyiségben interleukin-1 receptorantagonistát (IL-1ra) és (100:1)–(10 000:1) tömegarányban nemionos felületaktív anyagot tartalmaz a fiziológias pH-t, előnyösen pH=5–8 közötti értéket biztosító pufferben.

2. Az 1. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben az IL-1ra a következő aminosavszekvenciának vagy annak IL-1 inhibíciós fragmensének felel meg

vagy egy olyan polipeptid, amely ezzel legalább 70%-ban homológ.

3. A 2. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben az aminosavszekvenciában U jelentése M.
4. Az 1. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amely nemionos felületaktív anyagként poliszorbátot tartalmaz.
5. A 4. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amely poliszorbátként Polysorbate 80 anyagot tartalmaz.
6. Az 5. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben a Polysorbate 80 mennyisége 0,1 tömeg%. 10
7. Az 1. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amely nemionos felületaktív anyagként pluronicot tartalmaz.
8. Az 1. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amely valamely következő puffert tartalmaz: foszfát-puffer, citrát-puffer vagy acetát-puffer. 15
9. Interleukin-1 receptorantagonistát tartalmazó stabil gyógyszerkészítmény, amely 20–200 mg/ml mennyiségben interleukin-1 receptorantagonistát és stabilizátorként 1–2 tömeg% mennyiségben egy viszkozitást növelő szert tartalmaz a fiziológiás pH-értéket, előnyösen pH=5–8 közötti pH-értéket biztosító pufferben. 20
10. A 9. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amely viszkozitást növelő szerként polietilén-glikolt (PEG) tartalmaz. 25
11. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amely oldat, szuszpenzió, gél, emulzió, szilárd vagy dehidratált vagy liofilizált por. 30
12. Az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amely rekombináns úton előállított IL-1ra-t tartalmaz.
13. Az 1–12. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amely tiszta formában előállított IL-1ra-t tartalmaz. 35
14. A 12–13. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amely rekombináns humán IL-1ra-t tartalmaz.
15. A 12–14. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amelyben az IL-1ra metionint tartalmaz az N-terminálison.
16. A 14. vagy 15. igénypontok szerinti gyógyszerkészítmény, amely a következőket tartalmazza: 4,9 tömeg% rekombináns humán IL-1ra, 0,006 tömeg% citromsav, 0,29 tömeg% nátrium-citrát, 0,82 tömeg% nátrium-klorid, 0,19 tömeg% EDTA és 0,001–1,0 tömeg% nemionos felületaktív anyag.
17. A 14. vagy 15. igénypontok szerinti gyógyszerkészítmény, amely 19 tömeg% humán rekombináns IL-1ra-t, 0,006 tömeg% citromsavat, 0,29 tömeg% nátrium-citrátot, 0,82 tömeg% nátrium-kloridot, 0,019 tömeg% EDTA-t és 0,001–1,0 tömeg% nemionos felületaktív anyagot tartalmaz.
18. Kit vizes gyógyszerkészítmények előállítására, amely a következőket tartalmazza: 8. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény liofilizált por formájában és egy fiziológiásan elfogadható oldószer.
19. Az 1–18. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, amely intraartikuláris, szubkután, intradermális, intratekális, intraventrikuláris, intramuszkuláris, intravénás, topikális vagy orális adagolásra alkalmas készítmény vagy kúp, beöntésre vagy inhalálásra alkalmas készítmény.
20. Eljárás IL-1 receptorantagonistát tartalmazó stabil gyógyszerkészítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 20–200 mg/ml mennyiségben interleukin-1 receptorantagonistát (100:1)–(10 000:1) tömegarányban megfelelő, nemionos felületaktív anyag jelenlétében a fiziológiás pH-t, előnyösen pH=5–8 értéket biztosító pufferral elkeverjük, és a kapott keveréket adagolásra alkalmas készítménnyé alakítjuk.