



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

- | | |
|--|--|
| (21) Nr. cerere: 95-00540 | (61) Perfecționare la brevet:
Nr. |
| (22) Data de depozit: 17.09.1993 | (62) Divizată din cererea:
Nr. |
| (30) Prioritate: 17.09.1992 US 07/947.006; | (86) Cerere internațională PCT:
Nr. US 93 / 08802 17.09.1993 |
| (41) Data publicării cererii:
BOPI nr. | (87) Publicare internațională:
Nr. WO 94/06457 31.03.1994 |
| (42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
28.08.1998 BOPI nr. 8/1998 | (56) Documente din stadiul tehnicii:
CBI AU 9173636 |
| (45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr. | |

- | |
|---|
| (71) Solicitant: SYNERGEN INC., BOULDER, COLORADO, US; |
| (73) Titular: AMGEN BOULDER INC., BOULDER, COLORADO, US; |
| (72) Inventatori: SABADOS BENJAMIN K., BROOMFIELD, US; |
| (74) Mandatar: ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER
TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI |

(54) **COMPOZIȚIE FARMACEUTICĂ PENTRU INHIBAREA
INTERLEUKINEI-1**

(57) **Rezumat:** Compoziția farmaceutică pentru inhibarea interleukinei-1, în conformitate cu prezenta invenție, este constituită dintr-un receptor antagonist de interleukină-1 și un agent tensioactiv neionic, în raport de greutate de circa 100 la 10.000:1, sau un

intensificator de vâscozitate și, opțional, un tampon pentru menținerea pH-ului la un nivel biologic dorit. Receptorul antagonist de interleukină-1 este, de preferință, IL-1ra.

Revendicări: 8





(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: 95-00540	(61) Perfecționare la brevet: Nr.
(22) Data de depozit: 17.09.1993	(62) Divizată din cererea: Nr.
(30) Prioritate: 17.09.1992 US 07/947.006;	(86) Cerere internațională PCT: Nr. US 93 / 08802 17.09.1993
(41) Data publicării cererii: BOPI nr.	(87) Publicare internațională: Nr. WO 94/06457 31.03.1994
(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 28.08.1998 BOPI nr. 8/1998	(56) Documente din stadiul tehnicii: CBI AU 9173636
(45) Data eliberării și publicării brevetului: BOPI nr.	

(71) Solicitant: SYNERGEN INC., BOULDER, US;
(73) Titular: AMGEN BOULDER INC., COLORADO, US;
(72) Inventatori: SABADOS BENJAMIN K., BROOMFIELD, US;
(74) Mandatar: ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI

(54) **COMPOZIȚIE FARMACEUTICĂ PENTRU INHIBAREA
INTERLEUKINEI-1**

(57) **Rezumat:** Compoziția farmaceutică pentru inhibarea interleukinei-1, în conformitate cu prezenta invenție, este constituită dintr-un receptor antagonist de interleukină-1 și un agent tensioactiv neionic, în raport de greutate de circa 100 la 10.000:1, sau un

intensificator de vâscozitate și, opțional, un tampon pentru menținerea pH-ului la un nivel biologic dorit. Receptorul antagonist de interleukină-1 este, de preferință, IL-1ra.

Revendicări: 8

RO 113528 B1



Prezenta invenție se referă la o compoziție pentru inhibarea interleukinei-1. Inhibitorii de interleukina-1 sunt utili în tratamentul bolilor mediate de interleukina-1, astfel de inhibitori de interleukina-1 (IL-1ra). Interleukina-1 mediază boli care includ artrita reumatoidă (RA), tulburări inflamatorii intestinale (IBD), septicemie, osteoporoză, leziuni icthemice, tulburări legate de acceptarea grefelor, leziuni de reperfuzare, astm, diabet insulenic, leucemii mielogenice și de alte tipuri, psoriazis și cașexie. Acestea și alte boli inflamatorii sunt caracterizate prin producerea de citokine inclusiv interleukină-1.

Citokinele sunt proteine extracelulare care codifică compartimentul celulelor, în special al aceluia din zona învecinată sintezei și eliberării de citokină. Multe dintre aceste citokine sunt produse de către celulele macrofage/ monocite. De exemplu, artrita reumatoidă este o boală autoimună, caracterizată printr-un proces inflamator cronic, care cuprinde inițial membrana sinovială a articulațiilor periferice. Marea majoritate a celulelor mononucleare prezente în fluidul articular al pacienților ce suferă de artrită reumatoidă, sunt monocite/ macrofage și limfocite T activate.

Terapiile clasice pentru tratamentul artritei reumatoide și a tulburărilor inflamatorii intestinale includ indometacin, medicamente antiinflamatoare nesteroidice și salicilați. S-a mai demonstrat că receptorul antagonist de interleukina-1 ar fi util din punct de vedere terapeutic în tratamentul artritei reumatoide. Septicemia și șocul septicemic s-au tratat cu substanțe terapeutice, cum ar fi medicamentele vasoactive, antibiotice, stimulenți de *beta*-receptori care includ izoprenolol și dopamina, agenți blocanți de *alfa*-receptori, cum ar fi de exemplu fenoxibenzamină și fentolamină. Osteoporoza s-a tratat cu estrogen, vitamina D și fluorură. Leziunea s-a tratat, în mod clasic, cu anticoagulante și compuși antiplachetari. Astmul s-a tratat cu o gamă largă de substanțe terapeutice, incluzând stimulente *alfa* sau *beta* adrenergice

pentru dilatarea căilor aeriene, metilxantine pentru ameliorarea deplasării mucusului pe căile aeriene, glucocorticoizi pentru reducerea inflamației căilor aeriene, cromolinul de sodiu pentru inhibarea degranulării celulelor mastoide și anticolinergice pentru bronhodilatare.

Toate tratamentele pentru aceste boli prezintă diferite probleme. De exemplu, chiar în situația că se folosesc substanțe terapeutice cunoscute în mod curent, rata mortalității în cazuri de șoc septicemic este de circa 40 ... 50 %. Astfel, există nevoia de noi produse terapeutice, cum ar fi receptori antagoniști de interleukină-1 pentru tratarea în asemenea condiții, și de formulări farmaceutice care să prezinte o eliberare în mod acceptabil.

Sunt cunoscute compoziții farmaceutice ce conțin, de exemplu, fosfat de sodiu 10 mM (pH=7,0), clorură de sodiu 150 mM, etilendiaminotetraacetic acid 0,1 mM, utilizate ca receptor antagonist de interleukină-1 în bolile mediate de interleukină-1 și enumerate mai sus. În aceste formulări farmaceutice, produsul rămâne stabil doar circa două săptămâni în condiții normale de refrigerare (4 ... 8°C).

Datorită necesității de a transporta și depozita IL-1ra, în vederea tratării bolilor mediate de IL-1, pe o perioadă de timp mărită, există necesitatea existenței unei formulări farmaceutice care să fie mai stabile.

Compoziția farmaceutică pentru inhibarea interleukinei-1, în conformitate cu prezenta invenție, este constituită dintr-un receptor antagonist de interleukină-1 și un agent tensioactiv neionic, în raport în greutate de circa 100 la 10.000:1 sau un intensificator de viscozitate, și opțional, un tampon pentru menținerea pH-ului la un nivel biologic dorit. Receptorul antagonist de interleukină-1 este de preferință IL-1ra. Agentul tensioactiv neionic este ales dintr-un grup care constă din bloccopolimeri ai oxidului de etilenă și ai oxidului de propilenă, bloccopolimeri ai oxidului de pro-

pilenă și ai oxidului de etilenă, alcanolamină, polioxietilen propilenglicol stearat, sorbitan monolaurat, sorbitol ester, ester poliglicerol acid gras, cocamidă DEA lauril sulfat, eter polioxietilenlauril, eter polioxietilencetil, polisorbitat, gliceromonostearat, gliceroldistearat, sorbitolmonopalmitat, polioxietilensorbitanmonoleat, polioxietilensorbitanmonolaurat și propilenglicolmonostearat, de preferință este un polisorbitat și anume polisorbitat 80 care este în concentrație de 0,1 %, sau este un pluronic.

Tamponul care se adaugă suplimentar este ales dintre un grup cuprinzând un tampon fosfat, un tampon citrat și un tampon acetat. Intensificatorul de viscozitate, de preferință, este polietilenglicol în concentrație de până la 25 %. O formulare farmaceutică conține 4,9 părți inhibitor interleukină-1, 0,006 părți acid citric, 0,29 părți citrat de sodiu, 0,82 părți clorură de sodiu, 0,019 părți EDTA și 0,001 ... 0,1 părți agent tensioactiv neionic, părțile fiind exprimate în greutate. O altă formulare farmaceutică conține, de exemplu, 19,0 părți inhibitor interleukina-1, 0,006 părți acid citric, 0,29 părți citrat de sodiu, 0,82 părți clorură de sodiu, 0,019 părți EDTA și 0,001 ... 0,1 părți agent tensioactiv neionic, părțile fiind exprimate în greutate.

Avantajul acestor compoziții farmaceutice este faptul că acestea prezintă o bună stabilitate în timp, în condițiile de depozitare, precum și în situația când sunt agitate.

Aceste compoziții farmaceutice care cuprind inhibitori de interleukina-1, tampoane, agenți tensioactivi neionici sau intensificatori de viscozitate sunt corespunzătoare din punct de vedere al stabilității. Aceste compoziții sunt adecvate pentru administrare intraarticulară, intravenoasă, intramusculară, subcutanată, intradermică, intratecală, intraventricular (CNS), topic sau oral sau pentru utilizare ca supozitoare, clisme sau aerosoli pentru inhalare.

Prezenta invenție se referă, deci, la compoziții farmaceutice care conțin un inhibitor IL-1 și un agent de suprafață

sau un intensificator de viscozitate și care prezintă o mică sensibilitate la agitare.

Fiolele obișnuite, care conțin concentrate purificate voluminoase de IL-1ra, atunci când sunt agitate formează precipitate, și deci nu îndeplinesc standardele dorite în ceea ce privește aspectul și granulația. Așadar, a fost necesară prevenirea precipitării, care duce la agregarea nedorită și s-a urmărit o modificare a formulării farmaceutice.

Polisorbatul 80, cunoscut de asemenea ca sorbitan polioxietilenmonoleat sau Tween 80, este un detergent sau agent tensioactiv biologic neionic, care poate fi folosit pentru o multitudine de scopuri, incluzând emulsionarea, stabilizarea și dispersia.

Agenții tensioactivi neionici, cum ar fi de exemplu și polisorbitatul 80, se adaugă de asemenea la diferite formulări farmaceutice ce conțin proteine, în scopul de reducere a agregării și denaturării, precum și pentru creșterea solubilității. Polisorbitatul 80 a fost folosit, de asemenea, pentru stabilizarea unor diversități de compuși. În literatura de specialitate, se descrie un procedeu de obținere de compuși de glucop 1ranozonitrozoree, care utilizează drept stabilizator polisorbitat 80. Se descrie, de asemenea, utilizarea polisorbitatului 80 drept stabilizator pentru pirido(1,2-a)pirimidine substituie tetrazolil. Se mai utilizează, de asemenea, polisorbitatul 80 și pentru a solubiliza și dispersa ingredientul activ într-o compoziție farmaceutică ce conține peptide antimicrobiene de 3700 Daltoni, sau ca fiind agent de emulsionare pentru produse din colagen. Cu toate acestea este dificil să se presupună ce efect anume va avea asupra stabilității unei proteine, un agent de stabilizare particular. De exemplu, interacțiunea agentului de stabilizare cu o proteină poate produce mai degrabă degradarea acestei proteine, decât efectul dorit de reducere a degradării.

Așadar, într-un mod preferat de realizare, compozițiile farmaceutice conțin un inhibitor IL-1, în particular IL-1ra,

și un agent de suprafață neionic. Un agent tensioactiv neionic este un agent activ de suprafață a cărei contribuție solubilizatoare poate fi asigurată printr-o catenă de grupări de oxid de etilenă. Un agent tensioactiv schimbă proprietățile unui solvent în care este dizolvat, la extindere mult mai mare decât ar fi de așteptat de la concentrația sa. Caracterul hidrofил la agenții tensioactivi neionici se asigură prin legarea hidrogenului cu molecule de apă. Atomii de oxigen și grupările hidroxil formează cu promptitudine punți de hidrogen puternice, în timp ce grupările ester și amidă formează punți de hidrogen mai puțin rapid. Legarea hidrogenului asigură solubilizarea în mediu neutru și alcalin. În mediu acid puternic, atomii de oxigen sunt protonați, asigurând un caracter cvasica-tionic. Fiecare atom de oxigen aduce o contribuție la solubilizarea în apă. Pentru solubilizarea unui agent tensioactiv în apă, este nevoie, prin urmare, de mai mult decât un singur atom de oxigen. Agenții de suprafață neionici sunt compatibili cu agenții tensioactivi ionici și amfoteri. Deoarece o grupare polioxi-etilenică poate fi introdusă cu ușurință prin reacția oxidului de etilenă cu orice moleculă organică care conține un atom activ de hidrogen, prin oxilare, pot fi solubilizate o varietate de structuri.

Agentii de suprafață servesc, de asemenea, pentru reducerea agregării și denaturării proteinelor. Termenul de "agregare", așa cum este folosit în cadrul prezentei invenții, înseamnă formarea unui complex de mai multe proteine (cu alte cuvinte gruparea împreună a câtorva proteine). Termenul de "denaturare", folosit de asemenea în cadrul prezentei invenții, înseamnă pierderea structurii secundare și terțiare a unei proteine, care de obicei se corelează cu o pierdere a bioactivității. Prin reducerea agregării, se reduce de asemenea și degradarea fizică datorată schimbărilor încărcărilor la suprafață. Se presupune că agenții tensioactivi neionici servesc pentru blocarea interferenței aer-lichid, prevenind astfel denaturarea proteinei la

această suprafață. În plus, utilizarea agenților de suprafață permite compoziției farmaceutice să fie expusă tensiunilor de agitare a suprafeței; fără însă a se produce denaturarea proteinei. Suplimentar, asemenea formulări farmaceutice, care conțin agenți de suprafață, pot fi folosite în dispozitiv de pulverizare, cum ar fi cele folosite la administrarea pulmonară și dozatoare de jet, pentru injectare fără ac.

Agenții tensioactivi neionici, corespunzătorii utilizării în compozițiile farmaceutice, în conformitate cu prezenta invenție, includ de exemplu bloc-copolimeri ai oxidului de etilenă și oxidul de propilenă, ai oxidului de propilenă și oxidului de etilenă, sorbitan monolaurat, sorbitol ester, acid gras poliglicerol ester, cocamidă DEA lauril sulfat, alcanolamidă, polioxietilen propilenglicol stearat, polioxietilen lauril eter, polioxietilen cetil eter, polisorbitat, glicerolmonostearat, gliceroldistearat, sorbitol monopalmitat, polioxietilen sorbitanmonooleat, polioxietilen sorbitanmonolaurat și propilenglicol monostearat. De exemplu, în studiile care s-au efectuat, la agitare, comparând cu controlul IL-1ra la care compoziția care conține 0,1 % polisorbitat 80 (Tween 80), s-a demonstrat că IL-1ra în tamponul care conține 0,1 % polisorbitat 80, a avut valori similare controalelor neagitate, în timp ce IL-1ra, în formula care nu conține polisorbitat 80, a prezentat o precipitare puternică. Gradul de precipitare s-a măsurat prin adăugarea de 150 μl de produs de testat per godeu, într-o placă cu 96 godeuri și apoi măsurarea turbidității la 405 nm. Aceste studii de agitare au furnizat baza rațională pentru folosirea de formulări farmaceutice care conțin polisorbitat 80. S-au testat de asemenea și alți agenți de suprafață, pentru capacitatea lor de stabilizare a formulărilor farmaceutice când sunt agitate, așa cum se va arăta în cele ce urmează mai jos.

Toate compozițiile testate s-a dovedit a prezenta rezistență la degradare fizică și precipitare la agitare. De asemenea, s-a găsit că mărimea concen-

trațiilor de inhibitor de interleukină-1 la concentrații sunt 0,1 %, crește proporțional cantitatea de agent tensioactiv neionic necesară pentru stabilizarea compoziției farmaceutice. Pentru stabilizarea compoziției, sunt preferate concentrații de ordinul a 0,1 % în greutate de polisorbat 80.

Intr-o realizare preferată a prezentei invenții, compozițiile farmaceutice conțin un inhibitor de IL-1ra și un intensificator de viscozitate. Un intensificator de viscozitate este o substanță care acționează ca un agent de îngroșare pentru creșterea viscozității unei compoziții. Se presupune că un intensificator de viscozitate împiedică moleculele IL-1ra să interacționeze una cu alta sau interfața aer-lichid ce poate duce la degradare fizică.

Intensificatorii de viscozitate corespunzători, care sunt folosiți în cadrul invenției de față, includ, de exemplu, polietilenglicolul(PEG)hidroxilpropilceluloza și guma carageen. S-a evaluat în studii experimentale că polietilenglicolul are capacitatea de a preveni precipitarea și agregarea. S-a găsit a fi eficiente în prevenirea precipitării, concentrații de până la 2 % polietilenglicol.

Compozițiile farmaceutice din prezenta invenție conțin de asemenea un tampon pentru menținerea pH-ului la un nivel biologic dorit. Pentru acest scop, se pot folosi orice tampoane care sunt lipsite de toxicitate. Tampoanele utile pot include, de exemplu tampoane citrat și tampoane acetat. Aceste compoziții pot fi depozitate în fiole sterile, sub formă de soluție, suspensie, gel, emulsie, sub formă solidă sau sub formă deshidratată sau pudră liofilizată. Astfel de formulări pot fi depozitate fie sub formă gata de utilizare, fie sub formă care să necesite reconstituirea imediat înainte de administrare. De preferință, astfel de formulări se depozitează la temperatura aproximativ de refrigerare sau înghețare. Este de asemenea de preferat ca asemenea formulări care conțin IL-1ra să se păstreze și să se administreze la pH-ul fiziologic sau în apropiere de valoarea

acestui.

Este dovedit în prezent că depozitarea și administrarea într-o formulare la un pH ridicat (adică mai mare de 8) sau la un pH scăzut (adică mai mic de 5) nu este de dorit.

De preferință, modul de administrare al formulărilor care conțin 1RA-1ra este pe cale intraarticulară, subcutanată, intradermică, intratecală (CNS), intramusculară, intravenoasă, topică sau pe cale orală, sau sub formă de supozitor, clismă sau aerosoli în inhalații. Pentru atingerea și menținerea nivelului dorit de IL-1ra în corp, se pot administra doze repetate. Toate aceste metode au intenția să creeze un domeniu de concentrație precizat de IL-1ra în circuitul sanguin al pacientului, sau în alte țesuturi și fluide ale corpului. De exemplu, se presupune că menținerea concentrațiilor plasmatică de IL-1ra în circulația sanguină mai mici de 0,01 ng/ml plasmă poate să exprime o compoziție ineficientă, în timp ce menținerea prelungită a nivelurilor circulatorii mai mari de 100 μg/ml poate să indice o compoziție cu efecte secundare nedorite.

Așa cum s-a arătat mai sus, s-a stabilit că unele formulări care conțin IL-1ra sunt destinate pentru administrare orală. De preferință, IL-1ra care să administreze în acest mod, este protejat enteric sau polimeric. Protecția enterică pentru IL-1ra se poate formula cu adaos sau fără acei purtători care sunt folosiți în acest scop, în mod obișnuit, pentru obținerea formelor dozate solid. De preferință, se alege materialul de condiționare în așa fel, încât porțiunea activă a formulării să se elibereze la acel punct al tractului gastrointestinal unde bioaccesibilitatea este maximă și degradarea presistemică este mică, prin urmare dozele orale vor fi mai mari decât cele enumerate mai sus. Pentru a facilita absorbția IL-1ra, pot fi incluși excipienți suplimentari. Se pot folosi de asemenea diluanți, aromatizanti, ceruri cu punct de topire scăzut, uleiuri vegetale, lubrifianti, agenți de suspendare, agenți pentru dezintegrarea tabletelor și lianți. Un dozaj

perfect subcutanat, pentru tratamentul artritei mediată de interleukina-1, ar trebui să producă concentrații de IL-1ra în sânge între 1 și 1000 ng/ml. Este de preferat ca la început dozele administrate să aducă nivelurile IL-1ra din circulație la valoarea de aproximativ 10 ng/ml sau chiar peste această valoare. Frecvența dozării va fi în funcție de parametrii farmacocinetici care descriu absorbția IL-1ra din formularea subcutanată. Frecvența dozării poate fi de 1 ... 10 ori pe zi, sau mai puțin frecventă decât zilnic, în cazul unei forme de administrare cu efect întârziat sau cu eliberare controlată.

Un domeniu preferat de dozaj pentru tratamentul IBD mediată de interleukina-1 este de circa 0,5 ... 50 mg/kg greutate corporală a pacientului, administrate între circa 1 și 10 ori pe zi, sau mai puțin. Într-un mod de administrare mai preferat, dozajul este între circa 1 și 10 ng/kg greutate corporală a pacientului, administrate între circa 3 și 5 ori pe zi. Frecvența de dozare va fi în funcție de parametrii farmacocinetici care descriu absorbția IL-1ra din formularea folosită. Când pentru tratamentul IBD se folosesc mediată de interleukină, atunci administrarea de IL-1ra poate fi realizată de asemenea printr-o clismă formulată corespunzător.

Un domeniu preferat de dozaj pentru tratamentul șocului septic, mediat de interleukină-1, este între circa 10 până la 120 mg/zi/greutate a pacientului pe o perioadă de 24 h, administrat prin perfuzie intravenoasă în sistem continuu. Într-un mod de realizare mai preferat, dozajul este între circa 1 și 2 mg kg/h, de greutate corporală a pacientului, administrate intravenos prin perfuzie continuă.

Un domeniu preferat de dozaj pentru tratamentul ischemiei și leziunilor de perfuzare, mediate de interleukina-

1, este între circa 1 și 50 mg/kg greutate corporală a pacientului, administrate o dată pe oră. Într-un mod preferat de realizare, se administrează inițial un bol de circa 15 ... 20 mg/kg corp de IL-1ra, urmată de injecții de aproximativ 5 ... 20 mg/kg, una pe oră. Frecvența dozării va fi în funcție de parametrii farmacocinetici și IL-1ra pentru formularea folosită.

Legat de modul de administrare, doza specifică se calculează conform greutății corporale sau a ariei suprafeței aproximative a pacientului. Perfecționarea ulterioară a calculelor necesare determinării dozajului corespunzător pentru tratamente, care implică fiecare dintre formulările menționate mai sus, este făcută în mod obișnuit de către specialiștii din domeniu și aparține atribuțiilor obișnuite realizate de ei, fără necesitatea unor experimentări suplimentare. Aceste dozaje se pot atribui prin folosirea cercetărilor efectuate pentru determinarea dozajelor în legătură cu datele doză-răspuns și datele farmacocinetice.

Este de remarcat că formulările IL-1ra, descrise în această invenție, pot fi folosite la fel de bine la oameni, cât și pentru aplicații veterinare, și că termenul "pacient" nu este interpretat într-un mod limitativ. În cazul aplicațiilor veterinare, domeniile de dozare vor fi aceleași cu cele arătate mai sus.

Exemplele următoare demonstrează eficacitatea acestor formulări, care au fost preparate și testate, și au fost găsite satisfăcătoare pentru obiectivele menționate, în conformitate cu prezenta invenție.

Controlul pentru următoarele exemple, care au fost experimentate, s-a efectuat prin măsurarea densității optice la 405 nm la diferite concentrații de IL-1ra uman recombinat (rh IL-1ra) după diferite perioade de agitare. Rezultatele obținute sunt menționate în tabelul 1.

Timp (h)	Concentrația IL-1ra (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

Se dau, în continuare, 7 exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Prepararea formulării A.

a) Prepararea de EDTA 10 mM. Într-un vas de sticlă de capacitatea de 250 ml, s-au pus 0,93 g EDTA și apoi s-au adăugat 200 g apă sterilă, utilizată pentru injecții. S-a agitat conținutul vasului și s-a ajustat pH-ul la valoarea de $6,5 \pm 0,2$ folosind NaOH cât este nevoie, și s-a adus la 250 g.

b) Prepararea tamponului. Într-un vas de 1 l, s-au adăugat 900 g apă sterilizată pentru injecții, și apoi s-au adăugat 8,20 g clorură de sodiu, 2,80 g citrat de sodiu dihidrat și 0,58 g acid citric monohidrat. La acest amestec, s-a mai adăugat apoi și 50 g EDTA 10 mM, care a fost preparat cum s-a arătat mai sus. În final, s-a agitat până la dizolvarea completă a componentelor. S-a ajustat pH-ul până la valoarea de $6,5 \pm 0,02$, folosind NaOH și apoi s-a adus la 1000 g.

c) Prepararea formulării farmaceutice. Concentratul voluminos de rh IL-1ra, care este ținut la temperatura de -70°C , a fost lăsat la temperatura camerei pentru dezghețare. Acest concentrat purificat voluminos de rh IL-1ra a fost preparat în conformitate cu procedeul cunoscut în domeniul de specialitate. Materialul astfel preparat se concentrează la aproximativ 190 ... 250 mg/ml în citrat de sodiu de 10 mM, NaCl 140 mM și EDTA 0,5 mM, la

valoarea pH-ului de 6,5.

Tamponul preparat ca mai sus s-a adăugat pentru ajustarea concentrației. S-au examinat câteva concentrații, incluzând 200 mg/ml, 100 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml și 20 mg/ml. S-a adăugat Tween 80 pentru a obține o concentrație, în greutate, a Tweenului 80 de 0,1 %. Concentrațiile de Tween 80 de la 0,01 % până la 1% intră în domeniul acestei invenții.

d) Stabilitatea formulării. S-a testat stabilitatea acestei formulări prin turbionarea diferitelor concentrații și pe diferite perioade de timp. După turbionarea formulării, pe o perioadă de timp desemnată, s-a măsurat densitatea optică a soluției, la 405 nm, folosind un cititor cinetic de microplăci. S-a considerat că o formulare este stabilă când densitatea optică care a fost măsurată la 405 nm, a fost mai mică de circa 0,15. Când măsurătorile densității optice la 405 nm sunt de 0,15 sau mai mari, turbiditatea formulării farmaceutice începe să devină vizibilă, datorită prezenței particulelor solide și această formulare este considerată instabilă. Rezultatele acestui experiment sunt prezentate în tabelul 2, care urmează. Acest experiment demonstrează că o concentrație de 0,1 % Tween asigură stabilitate în situația că formularea ce conține IL-1ra este agitată, și când această formulare are o concentrație de la 20 ... 200 mg/ml.

Tween 80 0,1 % (în greutate); IL-1ra 20 - 200 mg/ml						
Timp (h)	Concentrația IL-1ra (mg/ml)					
	200	100	80	70	50	20
0	0,057	0,048	0,051	0,046	0,046	0,043
0	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

e) *Rezultatele clinice.* S-a realizat un trial faza II; la întâmplare, dublu-orb și control placebo pentru formularea A care conține IL-1ra, în 63 de centre din 8 țări. Trialul a inclus 901 pacienți care aveau sindrom septic cu hipotensiune evidentă și/sau disfuncție finală. Pacienții s-au repartizat aleator, la unul din cele trei grupuri: placebo, IL-1ra (100 mg doză de solicitare, urmată de infuzare intravenoasă de 1,0 mg/kg/h, timp de 72 h), sau IL-1ra (100 mg doză de solicitare urmată de infuzare intravenoasă a 2,0 mg/kg/h, timp de 72 h).

Din cei 901 pacienți, 298 pacienți au primit IL-1ra (1,0 mg/kg/h), 293 au primit IL-1ra (2,0 mg/kg/h) și 302 au primit placebo. O analiză retrospectivă a rezultatelor a arătat că IL-1ra asigură un beneficiu de supraviețuire, ca o funcție a creșterii riscului presupus de mortalitate la pacienții cu sindrom septic.

Riscul mortalității s-a coantificat, folosind un model de risc presupus dezvoltat din baze de date independent de faza III-a trialului. Modelul s-a validat și

s-a găsit a fi util pentru prezicerea ratei de mortalitate la placebo în faza a II-a a trialului. Datele pentru derivarea riscului prezis de mortalitate au fost accesibile pentru 892 din 893 pacienți. Rezultatele au arătat că IL-1ra produce, statistic, un beneficiu de supraviețuire semnificativă la pacienții cu un risc presupus de mortalitate de 24 % ($p = 0,032$). La acești pacienți, IL-1ra a redus mortalitatea cu 22%, comparat cu placebo.

Exemplul 2. *Prepararea formulării B.* Soluția de EDTA și tamponul s-au preparat așa cum s-a menționat în cadrul exemplului 1. De asemenea, formularea s-a preparat cum s-a menționat în exemplul 1, cu excepția că s-a folosit doar o concentrație de 100 mg/ml. Agentul tensioactiv folosit este Tween 20. Rezultatele acestui experiment sunt prezentate în tabelul 3. Acest experiment demonstrează că Tween 20 la concentrații de la 0,01 până la 1,0, greutate procentuală asigură stabilitatea în situația agitării a formulării care conține IL-1ra.

Tabelul 3

Tween 20 0,001 până la 1,0 % (în greutate); IL-1ra 100 mg/ml

Timp (h)	Greutate procentuală Tween 20				
0	0,061	0,056	0,058	0,059	0,063
1,75	0,113	0,052	0,051	0,061	0,071
8	0,067	0,075	0,063	-	-
12	0,580	0,075	0,064	-	-

Exemplul 3. *Prepararea formulării C.* Soluția de EDTA și tamponul s-au preparat așa cum s-a menționat în cadrul exemplului 1. De asemenea, formularea s-a preparat cum s-a menționat în exemplul 1, cu excepția că s-a folosit o concentrație de 100 mg/ml. Agentul tensioactiv folosit a fost Pluronic 108

(BASF). Rezultatele acestui experiment sunt prezentate în tabelul 4. Acest experiment demonstrează că agentul Pluronic 108, la concentrații procentuale în greutate de la 0,01 până la 1,0, asigură stabilitatea formulării farmaceutice care conține IL-1ra.

Tabelul 4

Pluronic 108 0,001 până la 1,0 % (în greutate), IL-1ra 100 mg/ml

Timp (h)	Greutate procentuală Pluronic 108				
	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	-	-

Exemplul 4. *Prepararea formulării D.* Soluția de EDTA și tamponul s-au preparat așa cum s-a descris în cadrul exemplului 1. De asemenea, formularea farmaceutică s-a preparat ca în exemplul 1, cu excepția că s-a folosit o singură concentrație, de 100 mg/ml. Agentul tensioactiv neionic folosit a fost Pluronic

F68 (BASF). Rezultatele acestui experiment sunt menționate în tabelul 5.

Acest experiment demonstrează că agentul Pluronic F68, la concentrații procentuale în greutate de la 0,01 până la 1,0, asigură stabilitatea formulării ce conține IL-1ra.

Tabelul 5

Pluronic F68 0,001 până la 1,0 %; IL-1ra 100 mg/ml

Timp (h)	Greutate procentuală de Pluronic F68				
	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	-	-
12	0,096	0,070	0,066	-	-

Exemplul 5. *Prepararea formulării E.* Soluția de EDTA și tamponul s-au preparat ca în cadrul exemplului 1. De asemenea, formularea farmaceutică s-a preparat așa cum s-a arătat în cadrul exemplului 1, cu excepția că s-a folosit o singură concentrație de 100 mg/ml. Agentul neionic folosit a fost Pluronic

127 (BASF). Acest experiment demonstrează că agentul Pluronic 127, la concentrații de la 0,01 până la 1,0 greutate procentuală, asigură stabilitatea formulării farmaceutice ce conține IL-1ra. Rezultatele acestui experiment sunt date în tabelul 6, care urmează.

Pluronic 127 0,001 până la 1,0 % (în greutate);
IL-1ra mg/ml

Timp (h)	Greutate procentuală de Pluronic F127				
	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	-	-

Exemplul 6. Prepararea formu- 10
lării F. Soluția de EDTA și tamponul s-au
preparat așa cum s-a arătat în cadrul
exemplului 1. De asemenea, formularea
farmaceutică s-a preparat ca în exemplul
1, cu excepția că s-a folosit doar o sin- 15
gură concentrație, de 100 mg/ml. A-
gentul tensioactiv neionic folosit a fost

PEG 8000. Rezultatele acestui experi-
ment sunt arătate în tabelul 7. Acest
experiment demonstrează că agentul
PEG 8000, la concentrații de circa 1,0
procent în greutate, asigură o bună sta-
bilitate a formulării IL-1ra, când este
agitată.

Tabelul 7

PEG 8000 1,0 % și 2 % IL-1ra 100 mg/ml

Timp (h)	Greutate procentuală PEG 8000	
	1,0	2,0
0	0,068	0,135
4	0,117	0,483
6	0,131	0,569
10	0,140	0,709

Exemplul 7. Prepararea formu- 30
lării G. Soluția de EDTA și tamponul s-au
preparat așa cum s-a arătat în cadrul
exemplului 1. De asemenea, formularea
farmaceutică s-a preparat așa cum s-a
arătat în exemplul 1, cu excepția că s-a 35
folosit o singură concentrație de 100

mg/ml. Agentul tensioactiv neionic a
fost PEG 300. Rezultatele acestui expe-
riment sunt arătate în tabelul 8. Acest
experiment demonstrează că PEG 300,
la concentrații de circa 1,0 în greutate
procentuală, asigură stabilitatea formu-
lării farmaceutice în situația agitării.

Tabelul 8

PEG 300 1,0% și 2,0 % (în greutate); IL-1ra 100 mg/ml

Timp (h)	Greutate procentuală PEG 300	
	1,0	2,0
0	0,068	0,064
4	0,107	0,107
6	0,127	0,120
10	0,140	0,133

Revendicări

1. Compoziție farmaceutică pentru inhibarea interleukinei-1, **caracterizată prin aceea că** este constituită dintr-un receptor antagonist de interleukină-1 și un agent tensioactiv neionic, în raport de greutate de circa 100 la 10.000:1 sau un intensificator de viscozitate și opțional, un tampon pentru menținerea pH-ului la un nivel biologic dorit.

2. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, receptorul antagonist de interleukină-1 este de preferință IL-1ra.

3. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, agentul tensioactiv este ales dintr-un grup care consta din bloccopolimeri ai oxidului de etilenă și oxidului de propilenă, bloccopolimeri ai oxidului de propilenă și oxidului de etilenă, alcanolamida, polioxietilen propilenglicol stearat, sorbitan monolaurat, sorbitol ester, ester poliglicerol acid gras, cocamidă DEA lauril sulfat, eter polioxietilenlauril, eter polioxietilencetil, polisorbitat, glicerolmonostearat, gliceroldistearat sorbitol - monopalmitat, polioxietilensorbitan-monoleat, polioxietilensorbitanmonolaurat și propilenglicol-monostearat, de preferință este un polisorbitat și anume polisorbitat, 80 care este în

concentrație de 0,1 % sau este un pluronic.

4. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** conține suplimentar un tampon, ales dintr-un grup cuprinzând un tampon fosfat, un tampon citrat și un tampon acetat.

5. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, intensificatorul de viscozitate, de preferință este polietilenglicol în concentrație de până la 2 %.

6. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** conține 4,9 părți inhibitor interleukină-1, 0,006 părți acid citric, 0,29 părți citrat de sodiu, 0,82 părți clorură de sodiu, 0,019 părți EDTA și 0,001 ... 1,0 părți agent tensioactiv neionic, părțile fiind exprimate în greutate.

7. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** conține 19,0 părți inhibitor de interleukină-1, 0,006 părți acid citric, 0,29 părți citrat de sodiu, 0,82 părți clorură de sodiu și 0,019 părți EDTA, părțile fiind exprimate în greutate.

8. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** conține un receptor antagonist de interleukină-1 și un intensificator de viscozitate.

Președintele comisiei de examinare: **chim. Hăulică Mariela**
 Examinator: **farm. Pentelescu Elena**

