

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11)

190649

Bejelentés napja: (22) 1982.12.22. (21) (4137/82)

Nemzetközi osztályozás:

(51) NSZO:

A 61 K 45/02

Elsőbbség: (33) US (32) 1981.12.23.

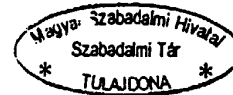
(31) (334 052)

(33) Dél-Afrikai Köztársaság

1982.11.19. (82/8580)

Közzététel napja: (41) (42) 1983.12.28.

Megjelent: (45) 1988.02.29.



Feltalálók: (72)

Kwan Henry King Hong
Summit, New Jersey, US

Szabadalmaz: (71)

Schering Corp, Kenilworth,
New Jersey, US

(54) Eljárás interferont tartalmazó stabil készítmények előállítására

¹ (57) Kivonat

A találmány interferont tartalmazó, vízzel oldható liofilizált gyógyászati készítmények előállítására vonatkozik oly módon, hogy glicin, α -alanin vagy sójuk stabilizálásra alkalmas mennyiségét, puffert, interferont és humán albumint steril vízben oldanak, majd az oldatot liofilizálják.

A találmány tárgya eljárás interferont tartalmazó fokozott stabilitású készítmények előállítására.

A találmány szerinti eljárással előállított készítmények felhasználhatók steril oldatok előállítására - különösen injekciós célra vagy orr-spray, orrcseppek vagy szemcseppek formájában történő alkalmazásra -, vagy pedig kenőcsök készítésére, amelyekben az interferon az aktív hatóanyag. Interferonnal a betegségek széles skálája igen hatékonyan kezelhető, különösen a vírusfertőzések különböző típusai.

Sedmak és munkatársai [Methods in Enzymology, 78. kötet, Interferons, A. rész, 591-595 (1981)] számos módszert ismertelnek interferonok, elsősorban folyékony készítmények stabilizálására, hogy hőhatás és mechanikai ártalmak ellen stabilizálják azokat. A fagyasztva szárítás az egyik leghatásosabb módszer interferon hosszabb ideig való tartósításra. Adalékként humán albumint és nátrium-foszfát puffert javasolnak.

A 27 573 számon nyilvánossághozott európai szabadalmi bejelentés interferon stabilizálást ismerteti oldható lantanida- és kalciumsókkal; a leírás oldatokra és nem fagyasztva számított készítményekre vonatkozik.

Az interferon-oldatok jól ismert instabilitása miatt igen nehéz stabil készítményeket előállítani klinikai vagy állatgyógyászati célra. Ezért ajánlatos az interferont liofilizált formában csomagolni, majd steril vízzel újraoldani. Az ilyen készítmények puffert is tartalmaznak, amely biztosítja a gyógyszereszetileg elfogadható pH-t az újraoldás során, továbbá elegendő mennyiségű nátrium-kloridot is tartalmaznak, amely az újraoldás után az oldatot izotóniássá teszi. Azonban az interferon stabilitása még az ilyen liofilizált készítményekben is igen korlátozott és elégtelen.

Azt találtuk, hogy bizonyos aminosavaknak és ezek egyszerű származékainak a liofilizált interferon-készítményekbe történő bevitelle gyógyszereszetileg elfogadható, lényegesen stabilabb liofilizált terméket eredményez. Továbbá, ily módon újabb előnyök is nyerhetők, például magának a liofilizációs lépésnek az egyszerűbbé válása, a liofilizált termék könnyebb újraoldása és a termék előnyösebb külső megjelenése, azaz enyhébb elszíneződése.

A találmány tárgya tehát eljárás olyan gyógyszerkészítmény előállítására, amely steril vízzel újraoldható, és amely az interferon mellett tartalmazza a glicin, az alfa-alanin és ezek gyógyszereszetileg elfogadható sói közül választott aminosav vagy aminosav-származék stabilizáló mennyiségét, továbbá egy kompatibilis puffer-rendszert. Alkalmas módon körülbelül $1 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^6$, előnyösen $1 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ NE interferon jut minden 5-150 mg aminosavra vagy aminosavszármazékra, amely

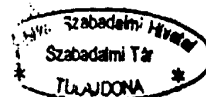
utóbbi súlyát mint szabad aminosavat számoljuk.

A találmány szerinti eljárással előállított készítményben használt interferon bármilyen interferon lehet, de előnyösen emberi interferon vagy más, emberi használatra alkalmas ineterferon vagy polipeptid, amelynek biológiai tulajdonságai hasonlóak az ilyen interferonéhoz. Nevezetesen, az emberi interferon lehet fehérvérsejt- vagy fibroblaszt-interferon, és fehérvérsejt-, illetve fibroblaszt-tenyésztéssel vagy pedig megfelelően programozott mikroorganizmusok tenyésztésével állítható elő, genetikai beavatkozással, azaz DNS rekombinációs módszerekkel, ilyen fajta interferonok vagy velük egyenértékű polipeptidok létrehozása céljából.

Az emberi interferon lehet alfa-interferon, béta-interferon vagy gamma-interferon. Meg kell jegyeznünk, hogy számos interferon-fajtát ismerünk, amelyeket általában a görög betű után írt számmal jelölünk. A találmány témakörébe az úgynevezett hibridinterferonok is beletartoznak, amelyekben két vagy több natív interferon-fajta fragmentumai kapcsolódnak össze. Lásuk például az EPA 51873-at, amely alfa-interferon hibrideket tartalmaz. Az egyik ilyen hibrid alfa-interferon például az alfa₁-interferon első 92 aminosavának és az alfa₂-interferon 92-165 aminosavból álló fragmentumának - a karboxi-végződésnek - az összekapcsolódásából áll. A találmány szerinti készítményekben történő felhasználásra különösen előnyös alfa-interferon-fajta az alfa₁-interferon, elsősorban a DNS-rekombinációs módszerekkel előállított alfa₁-interferon. Ezt a módszert ismertetik például Nagata és munkatársai (Nature, Vol. 284, pp. 316-320, 1980.). Az alfa-interferonnak a találmány szerinti eljárással előállított készítményben való felhasználásra alkalmas másik előnyös fajtája az alfa₂-interferon, különösen a DNS rekombinációs módszerekkel előállított alfa₂-interferon.

A találmány szerinti készítményben használt alfa₁-interferon specifikus aktivitásnak lehetőleg legalább $5 \cdot 10^7$ NE/mg-nak, előnyösen legalább $1 \cdot 10^8$ NE/mg-nak kell lennie, az interferon komponens fehérjére számítva. A specifikus aktivitás meghatározása történhet a vírusellenes aktivitás mérésével, a NIH referencia-standardhoz viszonyítva, valamint az összfehérje-tartalom mérésével, standard módszerek segítségével, például a Lowry-módszerrel. Hasonlóképpen, más interferonok klinikai használatához is magas specifikus aktivitás szükséges. A specifikus aktivitás magas szintje esetén a stabilitás fenntartása mindezekig rendkívül nehéz volt.

Az aminosavakat előnyösen eredeti aminosav formában használjuk, azaz mint glicint és alfa-alanint. Ilyen körülmények között körülbelül 5-150 mg, előnyösen 5-25 mg, első-



sorban 7-22 mg alfa-alanin vagy előnyösen glicin jut $1 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^6$ NE interferonra.

Az összetevők ezen mennyiségeit tartalmazó készítmény megfelelő újraoldásához 1 ml steril víz szükséges.

A találmány szerinti eljárással előállított készítményekben lévő puffer-rendszert úgy választjuk meg, hogy élettanilag kompatibilis legyen, és fenntartsa a kívánt pH-t az újraoldás utáni és a liofilizálás előtti oldatban egyaránt. A találmány szerinti újraoldott készítmények pH-jának - különösen az alfa-interferon tartalmúaknak -, körülbelül 6,5-8,0, előnyösen 7,0-7,4 között kell lennie. Az egyik, különösen alfa-interferon készítmények esetén előnyös puffer-rendszer nátrium-hidrogén-foszfátból és mononátrium-dihidrogén-foszfátból áll.

Akár egy aminosavat magát, akár annak sóját használjuk, a puffert úgy választjuk meg, hogy a készítmény pH-ját - az újraoldás után - olyan értékre állítsa be, amely a fent említett előnyös tartományban van.

A találmány szerinti eljárással előállított készítmények további összetevők is tartalmazhatnak, feltéve, hogy ezek élettanilag kompatibilisek és egyáltalán nem károsítják az interferont. Nevezetesen, egy további stabilizálószer is alkalmazható. Előnyös további stabilizálószer az albumin, különösen az emberi albumin, abban az esetben, ha a készítményeket klinikai használatra szánjuk. Az aminosav fent említett mennyiségéhez - vagy aminosavként számított származékához -, azaz 5-150 mg-hoz, - nevezetesen előnyösen 5-25 mg glicinhez - körülbelül maximálisan 10 mg albumint, előnyösen körülbelül 1 mg-ot adhatunk.

Ha az interferon mennyisége - különösen az alfa-interferoné - körülbelül $5 \cdot 10^6$ NE-nél kevesebb lesz az újraoldódással nyert oldat 1 ml-ében, akkor albumin hozzáadása nagyon ajánlatos.

A találmány egyik különösen előnyös foganatosítási módjánál nyert készítmény az itt felsorolt összetevőket tartalmazza, a következő arányban:

$1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^6$ NE alfa-interferon - előnyösen alfa-interferon -;
 körülbelül 5-25 mg, előnyösen 7-22 mg alfa-alanin vagy elsősorban glicin;
 egy kompatibilis puffer-rendszer, amelynek feladata, hogy a pH-t körülbelül 7,0-7,4 között tartsa az újraoldás után;
 és körülbelül 1 mg albumin.

A találmány szerinti eljárás a fent már definiált új készítmény előállítására a következő lépésekből áll: a glicin, az alfa-alanin és ezek gyógyszerészetileg elfogadható sói közül kiválasztott aminosavak vagy aminosavszármazékok, egy kompatibilis puffer-rendszer, totális szerint emberi albumin és az interferon steril vízben történő feloldása, valamint keletkező oldat liofilizálása.

A találmány szerinti eljárással előállított készítmények újraoldásához használt víz tartalmazhat kompatibilis összetevőket is, nevezetesen tartósítószerket, mint például a metil- vagy izopropil-parahidroxibenzoát. Az ilyen tartósítószer akkor előnyös, ha a keletkező oldatot nem egyszeri adagban, hanem több alkalommal használjuk fel, például mint orr- vagy szemcseppeket.

A következő, nem korlátozó jellegű példák szemléltetik egy injekciós célra alkalmas interferon-oldat készítésére használható, steril, liofilizált por előállítását; az előnyös interferon az alfa-interferon.

1. példa

Liofilizálandó	oldal	(1000 ampulla: 1 ml/ampulla)
Összetétel:		
interferon		$7,5 \cdot 10^{10}$ NE
dinátrium-hidrogén-foszfát, vízmentes (USP reagens)		2,27 g/l
nátrium-dihidrogén-foszfát (USP)		0,55 g/l
glicin (USP)		20,0 g/l
emberi albumin (USP)		1,0 g/l
desztillált vízzel (pro inj.), (USP) kiegészítve		1,0 literre.

Az előállítási eljárás lépései:

1. A víz egy részét egy megfelelő, keverőberendezéssel ellátott edénybe töltjük.
2. Hozzáadjuk és rázás segítségével feloldjuk a nátrium-foszfátokat.
3. Hozzáadjuk és rázás segítségével feloldjuk a glicint.
4. Hozzáadjuk és rázás segítségével feloldjuk az albumint.
5. Hozzáadjuk és rázás segítségével feloldjuk az interferont.
6. Az adagolt mennyiséget a végső térfogatra a desztillált vízzel (pro.inj., USP) kiegészítjük.
7. Steril környezetben, aszeptikusan az oldatot egy sterilizált edénybe, sterilizált $0,2 \mu$ -os szűrőn keresztül szűrjük, amelyet előzőleg átmostunk és a sértetlenségét megvizsgáltuk. A szűrés után is megvizsgáljuk a szűrő sértetlenségét.
8. Aszeptikusan az oldatot a sterilizált ampullákba töltjük.
9. A megtöltött ampullákat aszeptikusan a sterilizált liofilizáló készülékbe helyezzük.
10. Aszeptikusan liofilizáljuk az oldatot.
11. Aszeptikusan bedugaszoljuk az ampullákat.
12. A kupakokat felteszük, és a peremüket lehajtjuk.

A liofilizálás eljárási lépései; (polcos liofilizáló készülék használatával)

1. Előre lehűljük a polcokat -30°C -ra.
2. Az ampullákat a kamrába helyezzük.
3. Az oldatot megfagyasztjuk. A kondenzátort -45°C -ra vagy az alá hűtjük. A vákuumot bekapcsoljuk. A polc hőmérsékletét -30°C -on, legalább 12 órán keresztül tartjuk.
4. A polc hőmérsékletét viszonylag fokozatosan, 25°C -nál nem melegebbre növeljük körülbelül 24 óránál nem rövidebb idő alatt.
5. Amikor a termék hőmérséklete eléri a 25°C -ot, a kamrát steril nitrogénnel elárasztjuk, amíg eléri a légköri nyomást. A kamrában lévő ampullákat bedugaszoljuk. Az ampullákat a kamrából eltávolítjuk és kupakkal lezárjuk.

2. példa

A találmány szerinti eljárással előállított készítményt egyik előnyös módszerrel - amelyben az interferon α -interferon -, az 1. példában leírt módon állítjuk elő, és interferonként alfa-interferont használunk, de az alfa-alanint glicinnel helyettesítjük.

3. példa

A találmány szerinti eljárással előállított készítményt egy másik előnyös módszerrel - amelyben az interferon alfa₁-interferon -, ugyancsak az 1. példában leírt módon állítjuk elő, de interferonként alfa₁-interferont használunk.

4. példa

A találmány szerinti eljárással előállított készítményt egy újabb előnyös módszerrel az 1. példában leírt módon állítjuk elő, de interferonként alfa₁-interferont használunk, és az alfa-alanint glicinnel helyettesítjük.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás interferont tartalmazó, steril, vízzel oldható liofilizált gyógyászati készítmények előállítására azzal jellemezve, hogy glicint, α -alanint vagy gyógyászatilag elfogadható sójukat, egy összeférhető puffer-rendszert, interferont és adott esetben humán albumint - $1 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^4$ NE interferont és 0-10 mg humán albumint alkalmazva 5-150 mg szabad aminosavra vonatkoztatva - steril vízben feloldunk, majd a kapott oldatot liofilizáljuk. (Elsőbbsége: 1982. 12. 22.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy 1 mg humán albumint alkalmazunk 5-150 mg szabad aminosavra vonatkoztatva. (Elsőbbsége: 1982. 12. 22.)

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az oldatot a puffer-rendszerrel 6,5- 8,0 pH-értékre állítjuk be. (Elsőbbsége: 1982. 11. 19.)

4. A 3. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az oldatot a puffer-rendszerrel 7,0-7,4 pH-értékre állítjuk be. (Elsőbbsége: 1981. 12. 23.)

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy dinátrium-hidrogén-foszfátot és mononátrium-dihidrogén-foszfátot tartalmazó puffer-rendszert alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1981. 12. 23.)

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy interferonként humán interferont alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1982. 11. 19.)

7. A 6. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy α -interferont alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1981. 12. 23.)

8. A 6. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy β -interferont alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1982. 11. 19.)

9. Az 7. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy α -2-interferont alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1981. 12. 23.)

10. A 7. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy α -1-interferont alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1982. 12. 22.)

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy rekombináns DNS módszerekkel előállított interferont alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1981. 12. 23.)

12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy 5-25 mg glicint vagy α -alanint alkalmazunk $1 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^4$ NE interferonra. (Elsőbbsége: 1982. 11. 19.)

13. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy 7-22 mg glicint vagy α -alanint alkalmazunk $1 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^4$ NE interferonra. (Elsőbbsége: 1982. 11. 19.)

14. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy $1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^4$ NE interferont alkalmazunk 5-150 mg α -alaninra, glicinre vagy gyógyászatilag elfogadható sójukra vonatkoztatva szabad aminosavra számítva. (Elsőbbsége: 1982. 11. 19.)

15. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy $1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^4$ NE interferont alkalmazunk 5-25 mg α -alaninra, glicinre vagy gyógyászatilag elfogadható sójukra vonatkoztatva szabad aminosavként számítva. (Elsőbbsége: 1982. 11. 19.)

16. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy $1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^4$ NE interferont alkalmazunk 5-22 mg glicinre vonatkoztatva. (Elsőbbsége: 1982. 11. 19.)

17. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy $1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^4$ NE α -interferont, 5-25 mg α -alanint vagy glicint, az

újra feloldott oldatban 7,0-7,4 pH-érték kialakítására alkalmas összeférhető puffer-rendszert és célszerűen 1 mg humán albumint alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1982. 11. 19.)

18. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy $1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^8$ NE α -interferont, 7-22 mg glicint, az újra feloldott oldatba 7,0-7,4 pH-érték kialakítására alkalmas összeférhető puffer-rendszert és célszerűen 1 mg humán albumint alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1981. 12. 23.)

19. A 17. vagy 18. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy α -interferonként α -2-interferont alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1981. 12. 23.)

20. A 17. vagy 18. igénypont szerinti

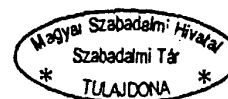
eljárás azzal jellemezve, hogy α -interferonként α -1-interferont alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1982. 12. 23.)

21. A 17-20. igénypontok bármelyike 5 szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy puffer-rendszerként dinátrium-hidrogén-foszfát és mononátrium-dihidrogén-foszfát keverékét alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1981. 12. 23.)

22. Az 1-17. igénypontok bármelyike 10 szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy aminosavként glicint alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1981. 12. 23.)

23. Az 1-17. igénypontok bármelyike 15 szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy aminosavként α -alanint alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1982. 11. 19.)

rajz nélküli



A kiadásért felel a Közgazdasági és Jogi Könyvkiadó igazgatója