

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2003-2735

(13) Druh dokumentu: **A3**

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **26.10.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.04.2001 18.10.2001
25.10.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/282614 2001/330404
2001/035397**

(33) Země priority: **US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.03.2005**
(Věstník č. 3/2005)

(86) PCT číslo: **PCT/US2001/051074**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/080976**

(51) Int. Cl.:

A 61 K 38/21

A 61 K 47/18

A 61 P 25/00

(71) Přihlašovatel:

CHIRON CORPORATION, Emeryville, CA, US

(72) Původce:

Shirley Bret A., Emeryville, CA, US

Choe Minna, Emeryville, CA, US

Tellers Melanie, Emeryville, CA, US

Babuka Susan, Emeryville, CA, US

Chen Bao-Lu, San Ramon, CA, US

Hora Maninder, Danville, CA, US

(74) Zástupce:

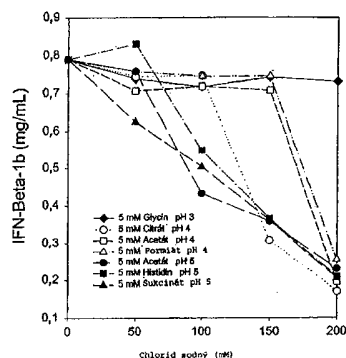
JUDr. Otakar Švorčík, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**HSA - prosté prostředky s obsahem interferonu-
beta**

(57) Anotace:

Řešením jsou stabilizované farmaceutické kompozice obsahující v podstatě monomerní interferon- β (IFN- β) a způsoby použitelné při jejich přípravě. Tyto kompozice obsahují IFN- β solubilizovaný v prostředí o nízké iontové síle, který udržuje kompozici na hodnotě pH zhruba 5,0. Řešením jsou i způsoby přípravy těchto kompozicí a zvyšování rozpustnosti IFN- β ve farmaceutických kompozicích.



HSA prosté prostředky s obsahem interferonu β

Oblast techniky

Tento vynález se obecně týká farmaceutických prostředků, konkrétněji stabilizovaných prostředků interferonu β prostých lidského serumalbuminu jako přidávané farmaceutické pomocné látky.

Dosavadní stav techniky

Interferony jsou skupinou glykoproteinů, jejichž vylučování z buněk se vyvolává řadou signálů včetně virů, RNA s dvojitou šroubovicí, dalších polynukleotidů, antigenů a mitogenů. Interferony vykazují více biologických aktivit včetně protivirové, protiproliferační a imunomodulační aktivity. Alespoň tři zřetelné typy lidských interferonů α , β a γ se rozlišují na základě řady faktorů včetně protivirových a protiproliferačních aktivit.

Interferon- β (IFN- β) je prvním identifikovaným účinným lékem pro pacienty s mnohočetnou sklerózou (MS) a prokazuje se, že snižuje počet příhod, které pacienti utrpí s relapsem a remisí MS a sekundární progresivní MS. Kompozice IFN- β lze též použít při léčbě infekce hepatitidy B a C.

Podobně jako u všech léků na bázi proteinů je třeba při použití IFN- β jako terapeutického prostředku překonat jednu velkou překážku, kterou je ztráta farmaceutické použitelnosti, která může vyplývat z nestability ve farmaceutických přípravcích. Fyzikální nestabilita, která ohrožuje aktivitu polypeptidu a účinnost ve farmaceutických prostředcích, zahrnuje denaturaci a tvorbu rozpustných a

nerozpustných agregátů, zatímco chemická nestabilita zahrnuje hydrolýzu, tvorbu imidu, oxidaci, racemizaci a deamizaci. Některé z těchto změn vedou ke ztrátě či snížení farmaceutické aktivity daného proteinu. V dalších případech jsou přesné účinky těchto změn neznámé, avšak stále je třeba uvažovat, že výsledné produkty degradace jsou farmaceuticky nepřijatelné vzhledem k možnosti nežádoucích vedlejších účinků.

Stabilizace polypeptidů ve farmaceutických prostředcích zůstává oblastí, ve které hraje značnou úlohu pokus a omyl [přehledný referát Wang, *Int. J. Pharm.* 185, 129-188 (1999), Wang a Hanson, *J. Parenteral Sci. Tech.* 42, S3-S26 (1988)]. Pomocné látky, které se přidávají k polypeptidovým farmaceutickým prostředkům pro zvyšování jejich stability, zahrnují pufry, cukry, povrchově aktivní látky, aminokyseliny, polyethylenglykoly a polymery, avšak stabilizační účinky těchto chemických přísad se mění v závislosti na proteinu.

Jednou z hlavních překážek přípravy stabilizovaných IFN- β farmaceutických prostředků je špatná rozpustnost molekuly IFN- β . Současné prostředky používají HSA jako prostředek pro zvýšení rozpustnosti IFN-B. Avšak použití HSA má své nevýhody. HSA je produkt z lidské krve a musí se tedy získávat od lidí. I když se činí kroky pro snížení rizika, použití produktů z lidské krve, jako je HSA, sebou nese možné zavedení lidských virů jako jsou HIV a HCV. Zavedení HSA do přípravku též interferuje se schopností správně stanovit stabilitu IFN- β v přípravku. Je tomu tak proto, že HSA i IFN- β jsou proteiny a HSA interferuje při některých analýzách zjišťujících stabilitu IFN- β .

Navíc je IFN- β protein, který vykazuje tvorbu agregátu

při přípravě ve farmaceutických prostředcích, a proto je množství tohoto proteinu v jeho monomerním biologicky aktivním stavu ohroženo v průběhu skladování těchto prostředků. Tvorba agregátu s polypeptidem, jako je IFN- β , může v průběhu skladování farmaceutického prostředku nepříznivě ovlivnit biologickou aktivitu tohoto polypeptidu, což způsobuje ztátu terapeutické účinnosti farmaceutického prostředku. Dále může tvorba agregátu způsobit další problémy, jako je blokování trubiček membrán či čerpadel při podávání farmaceutického prostředku s obsahem IFN- β pomocí infuzního systému. Navíc injekce farmaceutického prostředku obsahujícího agregovanou formu proteinu přináší možnost vzniku imunogenní reakce na tento agregovaný protein.

Proto existuje potřeba dalších IFN- β farmaceutických prostředků obsahujících fyziologicky kompatibilní stabilizační prostředky, které zlepšují rozpustnost tohoto proteinu a stabilizují tento protein proti tvorbě agregátů, čímž zlepšují farmaceutickou použitelnost.

Podstata vynálezu

Poskytují se kompozice obsahující interferon β (IFN- β) jako terapeuticky účinnou složku a způsoby použitelné při jejich přípravě. Tyto kompozice jsou stabilizované farmaceutické kompozice, které jsou prosté lidského serumalbuminu (HSA) jako farmaceutické pomocné látky a které obsahují v podstatě monomerní IFN- β solubilizovaný v přípravku o nízké iontové síle. Tento přípravek o nízké iontové síle je roztok obsahující pufr v množství dostatečném pro udržení přípravku na udané hodnotě pH $\pm 0,5$ jednotek, kde udané pH je od zhruba 3,0 do zhruba 5,0 a iontová síla nepřevyšuje zhruba 60 mM. Do farmaceutických prostředků se zahrnuje neiontový prostředek

pro úpravu osmotického tlaku tak, aby tyto prostředky byly izotonické a tímto prostředkem pro úpravu osmotického tlaku je některý glycid. Poskytují se též způsoby zvyšování rozpustnosti IFN- β ve farmaceutických prostředcích a zvyšování množství monomerního IFN- β v těchto prostředcích bez použití lidského serumalbuminu.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 ukazuje rozpustnost IFN- β -1b v roztocích chloridu sodného.

Obrázek 2 ukazuje rozpustnost IFN- β -1b v prostředcích o nízké iontové síle.

Obrázek 3 ukazuje účinek pH 3,0 na stav agregace IFN-B-1b.

Obrázek 4 ukazuje účinek pH 4,0 na stav agregace IFN-B-1b.

Obrázek 5 ukazuje účinek pH 5,0 na stav agregace IFN-B-1b.

Obrázek 6 ukazuje účinek iontové síly (0 mM NaCl) na stav agregace IFN- β -1b.

Obrázek 7 ukazuje účinek iontové síly (50 mM NaCl) na stav agregace IFN- β -1b.

Obrázek 8 ukazuje účinek iontové síly (150 mM NaCl) na stav agregace IFN- β -1b.

Obrázek 9 ukazuje stav agregace v prostředí o pH 3,0, který obsahuje pouze glycinový pufr 5 mM.

Obrázek 10 ukazuje účinek neiontového prostředku pro úpravu osmotického tlaku (9 % sacharosy) na stav agregace prostředku IFN- β -1b podle obrázku 9.

Obrázek 11 ukazuje účinek neiontového prostředku pro úpravu osmotického tlaku (9% trehalosa) na stav agregace IFN- β -1b v prostředí z obrázku 9.

Obrázek 12 znázorňuje procento z počáteční koncentrace IFN- β -1b v lyofilizovaných prostředcích obsahujících 9 % trehalosy nebo 9 % sacharosy po 8 týdnech skladování při teplotě 40 °C. Koncentrace se stanoví absorbcí ultrafialového světla.

Obrázek 13 znázorňuje procento z počáteční koncentrace IFN- β -1b v lyofilizovaných prostředcích obsahujících 9 % trehalosy nebo 9 % sacharosy po 8 týdnech skladování při teplotě 40 °C. Procento hlavního vrcholu se stanoví vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií s reverzními fázemi.

Obrázek 14 znázorňuje počáteční koncentraci IFN- β -1 v lyofilizovaných prostředcích obsahujících 9 % trehalosy po 9 měsících skladování při 5 °C nebo při 30 °C.

Obrázek 15 ukazuje procento hlavního vrcholu IFN- β -1b v lyofilizovaných prostředcích obsahujících 9 % trehalosy po 9 měsících skladování při teplotě 5 °C nebo při 30 °C. Procento hlavního vrcholu se stanoví vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií s reverzními fázemi.

Obrázek 16 ukazuje procento počáteční koncentrace IFN- β -1b v kapalných prostředcích obsahujících 9 % trehalosy nebo 9 % sacharosy po 9 týdnech skladování při teplotě 30 °C. Koncentrace se stanoví absorbcí ultrafialového světla.

Obrázek 17 ukazuje procento hlavního vrcholu IFN- β -1b v kapalných prostředcích obsahujících 9 % trehalosy nebo 9 % sacharosy po 8 týdnech skladování při teplotě 30 °C. Procento hlavního vrcholu se stanoví vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií s reverzními fázemi.

Obrázek 18 ukazuje počáteční koncentraci IFN- β -1b v kapalných prostředcích obsahujících 9 % trehalosy nebo 9 % sacharosy po 9 měsících skladování v lahvičkách při teplotě 5 °C. Koncentrace se stanoví spektroskopií v ultrafialovém světle.

Obrázek 19 ukazuje procento hlavního vrcholu IFN- β -1b v kapalných prostředcích obsahujících 9 % trehalosy nebo 9 % sacharosy po 9 měsících skladování v lahvičkách při teplotě 5 °C. Procento hlavního vrcholu se stanoví vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií s reverzními fázemi.

Obrázek 20 znázorňuje procento počáteční koncentrace IFN- β -1b v kapalných prostředcích obsahujících 9 % trehalosy nebo 9 % sacharosy po 9 týdnech skladování při teplotě 30 °C. Koncentrace se stanoví spektroskopií v ultrafialovém světle.

Obrázek 21 znázorňuje procento počáteční koncentrace IFN- β -1b v lyofilizovaných prostředcích obsahujících 9 % trehalosy nebo 9 % sacharosy po 8 týdnech skladování při

teplotě 40 °C. Koncentrace se stanoví spektroskopií v ultrafialovém světle.

Obrázek 22 znázorňuje procento počáteční koncentrace IFN-β-1b v kapalných prostředcích obsahujících 5 % mannitolu při skladování po dobu 6 měsíců při teplotě 5 °C. Koncentrace se stanoví spektroskopií v ultrafialovém světle.

Obrázek 23 ukazuje procento hlavního vrcholu IFN-β-1b v kapalných prostředcích obsahujících 5 % mannitolu při 6 měsících skladování při teplotě 5 °C. Procento hlavního vrcholu se stanoví vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií s reverzními fázemi.

Následuje podrobný popis vynálezu.

Tento vynález se zaměřuje na stabilizované farmaceutické prostředky obsahující interferon β (IFN-β) a způsoby jejich přípravy. Tyto prostředky se připravují bez přítomnosti lidského serumalbuminu (HSA) a jsou proto prosté této farmaceutické pomocné látky. Tyto přípravky se zde uvádějí jako "HSA prosté" farmaceutické přípravky IFN-β. Tyto přípravky obsahují v podstatě monomerní IFN-β, který se solubilizuje v přípravku o nízké iontové síle. Pojem přípravek o "nízké iontové síle" znamená roztok obsahující pufr v množství, které je dostatečné pro udržování pH tohoto farmaceutického prostředku v mezích ±0,5 jednotek udaného pH, který nemá vyšší iontovou sílu než zhruba 60 mM. "Iontová síla" se vztahuje ke standardní chemické definici, která se používá pro roztoky, kde iontová síla roztoku se rovná $\frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$, kde c je koncentrace a z je náboj. Pufr je přítomen v prostředku o nízké iontové síle o koncentraci zhruba 1 mM až zhruba 30 mM, přednostně zhruba 2 mM až zhruba 25 mM lépe

zhruba 2 mM až zhruba 20 mM, ještě lépe zhruba 2 mM až zhruba 10 mM, a dokonce ještě lépe zhruba 2 mM až zhruba 5 mM. Proto v některých ztělesněních obsahuje prostředek o nízké iontové síle pufr o koncentraci zhruba 2 mM až zhruba 10 mM, zhruba 2 mM až zhruba 7 mM, zhruba 2 mM až zhruba 5 mM, zhruba 2 mM, zhruba 3 mM, zhruba 4 mM nebo zhruba 5 mM. Vhodné pufrы, které lze pro přípravu prostředku o nízké iontové síle, ve kterých se solubilizuje IFN- β , zahrnují, avšak bez omezení, glycin, kyselinu aspartovou, sukcinát sodný, citrát, formiát, acetát, kyselinu glutamovou, histidin, imidazol a fosfát, přednostně glycin, kyselinu aspartovou a sukcinát sodný, přednostněji glycin a kyselinu aspartovou.

Přednostně má přípravek o nízké iontové síle iontovou sílu, která nepřevyšuje zhruba 60 mM, přednostněji která nepřevyšuje zhruba 40 mM a ještě lépe která nepřevyšuje 20 mM. V některých ztělesněních se iontová síla přípravku určuje pouze koncentrací pufru a proto tento přípravek nemá přídavné iontové složky, jako je chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, amoná sůl a podobně, přispívající k jeho iontové síle.

Použití přípravku o nízké iontové síle, který je roztokem obsahujícím pufr o koncentracích zhruba 1 mM až zhruba 30 mM, přednostně zhruba 2 mM až zhruba 5 mM, poskytuje přípravu stabilizovaných IFN- β farmaceutických prostředků, které mají pH zhruba 3,0 až zhruba 5,0, přednostně 3,0 až zhruba 4,5, přednostněji zhruba 3,0 až zhruba 4,0, ještě lépe zhruba 3,5 až zhruba 4,0, nejlépe zhruba 4,0, v závislosti na konkrétním použitém pufru. Proto, pokud je pufr glycin, je pH prostředku zhruba 3,0 až 3,5, přednostněji zhruba 3,0. Pokud je pufr kyselina aspartová, je pH prostředku zhruba 3,5 až zhruba 4,5, přednostně zhruba 4,0.

Pokud je puftrem sukcinát sodný, je pH prostředku zhruba 4,5 až zhruba 5,0, přednostně zhruba 5,0.

Při udržování pH IFN- β farmaceutických prostředků podle tohoto vynálezu v rozmezí od zhruba 3,0 do zhruba 5,0 lze zvýšit rozpustnost IFN- β v těchto prostředcích mimo normálně možné rozmezí bez použití lidského serumalbuminu. Dále zavedením IFN- β do prostředku o nízké iontové síle, jak se zde definuje, lze připravit farmaceutické prostředky obsahující v podstatě monomerní IFN- β . Pojem "v podstatě monomerní" znamená, že většina IFN- β (na základě hmotnosti) přítomná v roztoku je v monomerní formě spíše než v agregované formě. Pojem agregovaný zde znamená fyzikální interakci mezi molekulami polypeptidů, která vede ke tvorbě multimerů (dimerů, trimerů atd), které zůstávají rozpustné, nebo se mohou vysrážet z roztoku. Monomerní forma polypeptidu IFN- β zůstává rozpustná a proto se zde popisuje jako "solubilizovaná" v prostředku o nízké iontové síle nebo ve farmaceutických prostředcích podle tohoto vynálezu. Procento (hmotnostní) IFN- β , které je v monomerní formě v HSA prostých prostředcích podle tohoto vynálezu, se může měnit od 80 % k vyšším hodnotám. Tento vynález tedy poskytuje HSA prosté IFN- β farmaceutické prostředky, které obsahují alespoň zhruba 80 % IFN- β v monomerní formě oproti agregované formě, přednostně alespoň 85 %, přednostněji alespoň 90 %, dokonce ještě lépe 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % nebo více IFN- β v monomerní formě.

V některých ztělesněních tohoto vynálezu HSA prosté farmaceutické prostředky IFN- β dále zahrnují neiontový prostředek pro úpravu osmotického tlaku v množství dostatečném k tomu, aby prostředky byly isotonické s tělesnými tekutinami. Tyto prostředky lze upravit na isotonické řadou

neiontových prostředků pro pozměnění osmotického tlaku dobře známých těm, kteří mají zkušenost v oboru. Jsou to obvykle glycidy z různých skupin [viz například Voet a Voet (1990) *Biochemistry* (John Wiley & Sons, New York)]. Monosacharidy klasifikované jako aldosa, jako je glukosa, mannosa, arabinosa a ribosa, stejně tak jako ty, které se klasifikují jako ketosa, jako je fruktosa, sorbosa a xylulosa lze použít jako neiontové prostředky pro úpravu osmotického tlaku v tomto vynálezu. Disacharidy, jako je sacharosa, maltosa, trehalosa a laktosa lze rovněž použít. Navíc lze též použít alditoly (acyklické polyhydroxyalkoholy), jako je glycerol, mannitol, xylitol a sorbitol, jako neiontové prostředky pro úpravu osmotického tlaku v tomto vynálezu. Nejpreferovanějšími neiontovými prostředky pro úpravu osmotického tlaku jsou trehalosa, sacharosa a mannitol nebo jejich kombinace. Neiontové prostředky pro úpravu osmotického tlaku se přidávají v množství dostatečném k tomu, aby prostředek byl isotonický s tělesnými tekutinami. Při zavádění do HSA prostých farmaceutických prostředků IFN- β je koncentrace prostředku pro úpravu osmotického tlaku zhruba 1 % až zhruba 10 % v závislosti na použitém prostředku. Proto v jednom ztělesnění je neiontovým prostředkem pro úpravu osmotického tlaku trehalosa nebo sacharosa při koncentraci zhruba 8 % až zhruba 10 %, přednostně zhruba 9 % (hmotnost/objem) a přednostně se používá trehalosa o této koncentraci. V dalším ztělesnění je neiontovým prostředkem pro úpravu osmotického tlaku mannitol o koncentraci zhruba 4 % až zhruba 6 %, přednostně zhruba 5 % (hmotnost/objem). V dalších ztělesněních je neiontovým prostředkem pro úpravu osmotického tlaku kombinace trehalosy a mannitolu nebo sacharosy a mannitolu, kde trehalosa a sacharosa jsou přítomny v koncentracích zhruba 1 % (hmotnost/objem) a mannitol je přítomen o koncentraci zhruba 3 % až zhruba 5 % (hmotnost/

objem), přednostně zhruba 4,6 % (hmostnost/objem). HSA prosté farmaceutické prostředky IFN- β podle tohoto vynálezu zahrnují kapalně prostředky a jejich sušené formy. Pro účely tohoto vynálezu pojem "kapalný" vzhledem k farmaceutickým kompozicím či prostředkům zahrnuje pojem "vodný" a zahrnuje kapalně přípravky, které jsou zmrazené. "Sušená forma" znamená kapalnou farmaceutickou kompozici či prostředek vysušené buď sušením za mrazu [to je lyofilizací, viz například Williams a Polli, *J. Parenteral Sci. Technol.* 38, 48-59 (1984)], sušení ve spreji [viz Masters (1991) v *Spray-Drying Handbook* (5. vydání, Longman Scientific a Technical, Essex, U. K.), str. 491-676, Broadhead a kol., *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18, 1169-1206 (1992) a Mumenthaler a kol., *Pharm. Res.* 11, 12-20 (1994)] nebo sušení na vzduchu [Carpenter and Crowe, *Cryobiology* 25, 459-470, (1988) a Roser, *Biopharm.* 4, 47-53 (1991)]. Pojem "lyofilizace" vzhledem k farmaceutickým prostředkům s obsahem IFN- β znamená rychlé sušení za mrazu, za sníženého tlaku v řadě lahviček, z nichž každá obsahuje jednotkovou dávku interferonového přípravku podle tohoto vynálezu. Lyofilizační zařízení provádějící výše popsanou lyofilizaci jsou komerčně dostupná a snadno je ovládá ten, kdo má zkušenost v oboru. V jednom ztělesnění tohoto vynálezu se kapalně prostředek připravuje jako lyofilizovaná kompozice.

V dalších ztělesněních tohoto vynálezu lze připravit HSA prosté farmaceutické kompozice s obsahem IFN- β podle tohoto vynálezu ve formě, která je vhodná pro dodávání do plic a pro podávání přípravku osobě plicní inhalací. "Plicní inhalace" znamená, že se farmaceutická kompozice podává přímo do plic dodávkou kompozice ve formě aerosolu nebo jiného vhodného přípravku z dodávacího zařízení do ústní dutiny osoby a osoba inhaluje tento přípravek ústní dutinou. Pojem

"aerosol" znamená suspenzi tuhých či kapalných částic v proudícím vzduchu nebo jiném fyziologickém akceptovatelném proudu plynu. Další vhodné přípravky zahrnují, avšak bez omezení, mlhu, páru nebo sprejové prostředky, pokud jsou částice obsahující proteinovou kompozici v rozmezí rozměrů konzistentním s rozmezím popisovaným pro formu sušeného prášku farmaceutické kompozice, jak se definuje níže. Plicní inhalaci lze též uskutečnit dalšími vhodnými způsoby známými tomu, kdo má zkušenost v oboru. Ty mohou zahrnovat instilaci kapaliny pomocí vhodného zařízení nebo jiných takových způsobů. Plicní inhalace vede k ukládání inhalované proteinové kompozice v alveolech plic osoby. Po vložení se protein může absorbovat, pasivně či aktivně, epithelem alveolů a vrstvami kapilárního epitelu do krevního řečiště s následnou systémovou distribucí.

Podávání do plic polypeptidu či proteinu, jako je IFN- β , vyžaduje dodávku biologicky aktivní látky v zařízení pro dodávání do orální dutiny osoby inhalací. Pro účely tohoto vynálezu se HSA prosté farmaceutické prostředky obsahující IFN- β nebo jejich varianty podávají inhalací aerosolu či jiného vhodného přípravku, který se obdrží z vodného či nevodného roztoku nebo ve formě suspenze nebo jako tuhá látka či forma suchého prášku farmaceutického prostředku, v závislosti na použitém zařízení pro dodávku. Tato zařízení pro dodávku jsou dobře známá v oboru a zahrnují, avšak bez omezení, nebulizátory, inhalátory s odměřováním dávky a inhalátory suchých prášků nebo jakékoliv jiné vhodné mechanismy dodávání, které umožňují dodávku farmaceutického prostředku vodného či nevodného roztoku nebo suspenze nebo ve formě tuhé či ve formě suchého prášku. Při použití v souvislosti s farmaceutickými prostředky vhodnými pro dodávku do plic mají tyto pojmy následující zamýšlený význam. Pojem

"vodný" se týká prostředku připraveného s vodou obsahujícího vodu či rozpuštěného ve vodě, včetně směsí, ve kterých je voda převládající látkou této směsi. Převládající látka je přítomná ve větším množství než jiná složka této směsi. Pojem "nevodný" se týká prostředku připraveného s látkou jinou než je voda obsahující takovou látku nebo rozpuštěnou v takové látce nebo ve směsích, ve kterých voda není převládající složkou této směsi. Pojem "roztok" se týká homogenní přípravy dvou či více látek, které mohou být tuhé, kapalné, plynné nebo vzájemné kombinace těchto stavů. Pojem "suspenze" se týká směsi látek takových, že jedna či více nerozpustných látek jsou homogenně dispergované v jiné převládající látce.

Pro účely tohoto vynálezu se pojmy "tuhý" a "suchý prášek" používají se vzájemnou záměnou s odkazem na HSA prosté farmaceutické prostředky vhodné pro dodávku do plic. Pojem "tuhá forma" nebo "forma suchého prášku" farmaceutického prostředku znamená kompozici, která se vysuší na jemně rozmělněný prášek s obsahem vlhkosti menším než zhruba 10 hmotnostních procent, obvykle menším než zhruba 5 hmotnostních procent a přednostně menším než zhruba 3 hmotnostních procenta. Tato forma suchého prášku kompozice obsahuje částice s obsahem IFN- β nebo variantu této látky. Preferované velikosti částic jsou menší než zhruba 10,0 μm středního průměru, preferovaněji menší než zhruba 7,0 μm , lépe než zhruba 6,0 μm , ještě lépe menší než zhruba 0,1 až 5,0 μm , nejlépe v rozmezí zhruba 1,0 až zhruba 5,0 μm středního průměru.

HSA prostý kapalný farmaceutický prostředek s obsahem IFN- β nebo jeho varianty zamýšlené pro dodávku do plic lze tedy použít buď jako kapalný roztok či suspenzi v zařízení pro dodávku nebo ve formě nejprve zpracované na suchý prášek s použitím lyofilizace nebo způsobů sušení ve spreji dobře

známých v oboru. Tam, kde se kapalný roztok či suspenze používá v dodávacím zařízení, nebulizátoru, inhalátoru s odměřováním dávky nebo v jiných vhodných zařízeních pro dodávku v jednotlivé dávce či ve více částečných dávkách plicní inhalací, je farmaceuticky účinné množství kompozice pro dodávku do plic pacienta ve formě kapiček o stejném rozmezí velikosti částic, jako se popisuje výše pro formu suchého prášku. Pojem "farmaceuticky účinné množství" znamená množství použitelné při léčení, prevenci či diagnostice choroby nebo stavu vykazujícího odpověď na IFN- β . Podobný roztok či suspenzi kompozice lze použít s fyziologicky vhodnými stabilizačními prostředky, pomocnými látkami, modifikátory viskozity, prostředky pro zvětšení objemu, povrchově aktivními látkami nebo s jejich kombinacemi známými tomu, kdo má zkušenost v oboru, pokud neohrožují význačné charakteristiky kompozicí podle tohoto vynálezu s obsahem IFN- β prostých HSA.

Pokud se kapalný farmaceutický prostředek lyofilizuje před použitím dodávkou do plic, rozmělní se lyofilizovaný prostředek pro obdržení jemně rozptýleného suchého prášku složeného z částic s požadovaným rozmezím rozměrů popisovaným výše. Tam, kde se používá sušení ve spreji pro obdržení suchého prášku z kapalného farmaceutického prostředku, provádí se tento způsob za podmínek, které vedou k v podstatě amorfnímu jemně rozmělněnému suchému prášku, který se skládá z částic v rámci požadovaného rozmezí popisovaného výše. Podobně, pokud je výchozí farmaceutický prostředek již v lyofilizované formě, může se rozmělnovat s obdržením suché práškové formy pro následnou přípravu aerosolu či jiného přípravku vhodného pro inhalaci do plic. Pokud je výchozí farmaceutická kompozice ve formě sušené ve spreji, připravuje se v preferovaných případech takovým způsobem, že již je ve

formě suchého prášku o vhodné velikosti částic pro distribuci vodných či nevodných roztoků či suspenzí suché práškové formy v souladu s plicním podáváním. Ohledně způsobu přípravy suchých práškových forem farmaceutických prostředků viz například publikace WO 96/32149, WO 97/41833, WO 98/29096 a US patenty č. 5 976 574, 5 985 248 a 6 001 336, které se zde zahrnují formou odkazu.

Výsledná suchá prášková forma kompozice se poté umístí do vhodného zařízení pro dodávku pro následnou přípravu aerosolu či jiného vhodného přípravku, který se dodává pacientovi plicní inhalací. Pokud se používá suchá prášková forma farmaceutické kompozice, je třeba ji připravit a distribuovat ve formě vodného či nevodného roztoku či suspenze, inhalátoru odměřované dávky nebo jiného vhodného zařízení pro dodávku. Farmaceuticky účinné množství suché práškové formy kompozice se podává v aerosolu či jiném přípravku vhodném pro plicní inhalaci. Množství formy suchého prášku kompozice umístěné do zařízení pro dodávku je dostatečné pro umožnění dodávky farmaceuticky účinného množství kompozice subjektu inhalací. Proto bude množství suché práškové formy umístěné do dodávacího zařízení kompenzovat možné ztráty v zařízení v průběhu skladování a dodávky suché dávkové formy kompozice. Po umístění suché práškové formy do dodávacího zařízení se částice o správné velikosti, jak se popisuje výše, suspendují v hlavním prostředí aerosolu. Tlaková nevodná suspenze se poté uvolňuje z dodávacího zařízení do dýchacích cest subjektu v průběhu inhalace. Dodávací zařízení dodávají ve formě jedné dávky či ve více dílčích dávkách plicní inhalací farmaceuticky účinné množství kompozice do plic pacienta. Hnací plyn aerosolu musí být konvenční látkou používanou pro tyto účely, jako je chlorfluorkarbon, hydrochlorfluorkarbon, hydrofluorkarbon nebo

uhlovodík, včetně trichlorfluormethanu, dichlordifluor-methanu, dichlortetrafluormethanu, dichlordifluormethanu, dichlortetrafluorethanolu a 1,1,1,2-tetrafluorethanu nebo jejich kombinace. Do farmaceutického prostředku lze přidávat povrchově aktivní látku pro snížení adheze suchého prášku obsahujícího protein na stěny dodávacího zařízení, ze kterého se aerosol vypouští. Vhodné povrchově aktivní látky pro tento účel zahrnují, avšak bez omezení, sorbitol-trioleát, sojový lecithin a kyselinu olejovou. Zařízení vhodná pro dodávku do plic suché práškové formy proteinové kompozice ve formě nevodné suspenze jsou komerčně dostupná. Příklady takových zařízení zahrnují inhalátor s odměřovanou látkou Ventolin (Glaxo atd.) a inhalátor Intal (Fisons, Corp., Bedford, MA). Viz též zařízení pro dodávku aerosolu popisovaná v US patentech č. 5 522 378, 5 775 320, 5 934 272 a 5 960 792 a tyto patenty se zde zahrnují formou odkazu.

Pokud se má tuhá látka nebo suchý prášek HSA prostě farmaceutické kompozice s obsahem IFN- β dodávat ve formě suchého prášku, používá se v preferovaných případech inhalátor suchého prášku či jiné příslušné zařízení pro dodávku. Forma suchého prášku farmaceutického prostředku se přednostně připravuje jako aerosol suchého prášku disperzí v proudu vzduchu či jiném fyziologicky akceptovatelném proudu plynu konvenčním způsobem. Příklady komerčně dostupných inhalátorů suchého prášku vhodných pro použití v souladu se způsoby, které se zde popisují, zahrnují inhalátor prášku Spinhaler (Fisons Corp., Bedford, MA) a zařízení Ventolin Rotahaler (Glaxo, Inc., Research Triangle Park, NC). Viz též zařízení pro dodávku suchého prášku popisovaná v publikacích WO 93/00951, WO 96/09085, WO 96/32152, a v US patentech č. 5 458 135, 5 785 049 a 5 993 783, které se zde zahrnují formou odkazu.

Forma suchého prášku HSA prostého farmaceutického prostředku s obsahem IFN- β nebo jeho biologicky aktivní varianty se může rekonstituovat na vodný roztok pro následnou dodávku ve vodném aerosolovém roztoku s použitím nebulizátoru, inhalátoru s odměřováním dávky nebo jiného vhodného zařízení pro dodávku. V případě nebulizátoru se vodný roztok udržovaný v nádobce s kapalinou převádí na vodný sprej a pouze jeho malá část opouští nebulizátor pro dodávku pacientovi v jakémkoliv daném čase. Zbývající sprej odtéká zpět do nádoby kapaliny v nebulizátoru, kde se opět mění na aerosol ve vodném spreji. Tento proces se opakuje tak dlouho, až je nádoba zcela vyprázdněná nebo až se ukončí podávání spreje ve formě aerosolu. Takové nebulizátory jsou komerčně dostupné a zahrnují například nebulizátor Ultraven (Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO) a nebulizátor Acorn II (Marquest Medical Products, Englewood, CO). Viz též nebulizátor popsany v publikaci VO 93/00951 a zařízení pro dodávání vodných prostředků ve formě aerosolu popisovaných v US patentu č. 5 544 646, který se zde zahrnuje formou odkazu.

HSA prosté farmaceutické prostředky s obsahem IFN- β podle tohoto vynálezu jsou "stabilizované kompozice". Pojem "stabilizované" znamená kompozice, které uchovávají polypeptid IFN- β v jeho v podstatě monomerním stavu v průběhu skladování, takže terapeutická účinnost tohoto polypeptidu není ohrožena následkem tvorby agregátů.

Pojem "v průběhu skladování" uvažuje, že se kapalný farmaceutický prostředek či kompozice po přípravě nepodává ihned pacientovi. Spíše se podává po balení přípravku pro skladování buď v kapalně formě nebo ve zmrazeném stavu nebo v sušené formě pro další rekonstituci na kapalnou formu nebo jinou formu vhodnou pro podávání pacientovi. Stabilita se

dosahuje bez přítomnosti HSA jako stabilizačního a solubilizujícího prostředku. Přednostně se kompozice podle tohoto vynálezu uskladňují přímo v jejich kapalně formě pro plné využití vhodnosti skladovací stability v kapalně formě, pro snadnost podávání bez rekonstituce a možnost dodávat přípravky v předem naplněných injekčních stříkačkách připravených pro použití nebo ve formě vícedávkových preparátů, pokud je formulace kompatibilní s bakteriostatickými prostředky. Stabilizované kompozice s obsahem IFN- β prosté HSA podle tohoto vynálezu mají přednostně dobu použitelnosti alespoň 6 měsíců, 12 měsíců, 18 měsíců, přednostněji alespoň 20 měsíců a ještě lépe alespoň 22 měsíců, nejlépe alespoň 24 měsíců při ukládání při teplotách 2 až 8 °C.

Způsoby sledování stability HSA prostých farmaceutických prostředků s obsahem IFN- β podle tohoto vynálezu jsou dostupné v oboru včetně těch způsobů, které se popisují v příkladech níže. Proto lze tvorbu agregátu IFN- β v průběhu skladování kapalného farmaceutického prostředku podle tohoto vynálezu snadno stanovit měřením změny rozpustného IFN- β v roztoku v průběhu času. Množství rozpustného polypeptidu v roztoku lze vyjádřit kvantitativně řadou analytických rozborů přizpůsobených pro detekci IFN- β . Tyto rozborů zahrnují například vysokovýkonnou kapalinovou chromatografii s reverzními fázemi a absorbní spektroskopii v ultrafialovém světle, jak se popisují v příkladech níže. Stanovení rozpustných i nerozpustných agregátů v průběhu skladování v kapalných prostředcích lze provádět například analytickou ultracentrifugací, jak se popisuje v příkladech níže pro rozlišení podílu rozpustného polypeptidu přítomného ve formě rozpustných agregátů a podílu, který je přítomný v neagregované biologicky aktivní molekulové formě.

Stabilizované farmaceutické prostředky podle tohoto vynálezu obsahují IFN- β a jejich varianty. Pojem "IFN- β ", jak se zde používá, se týká IFN- β nebo jeho variant, které se někdy nazývají polypeptidy typu IFN- β . Lidské varianty IFN- β , které se mohou vyskytovat v přírodě (například allelické varianty, které se vyskytují na místě IFN- β) nebo mohou vznikat rekombinací, mají aminokyselinové sekvence, které jsou stejné, podobné nebo v podstatě podobné sekvenci zralého nativního IFN- β . Fragmenty IFN- β nebo zkrácené formy IFN- β uchovávající svou aktivitu se rovněž uvažují. Tyto biologicky aktivní fragmenty či zkrácené formy IFN- β se tvoří odstraněním aminokyselinových zbytků z aminokyselinové sekvence IFN- β pomocí způsobů rekombinantní DNA dobře známých v oboru. Polypeptidy IFN- β mohou být glykosylované či neglykosylované, jak se uvádí v literatuře, kde glykosylované i neglykosylované IFN- β vykazují kvalitativně podobné specifické aktivity, takže glykosylové zbytky se neúčastní biologické aktivity IFN- β a nepřispívají k ní.

Varianty IFN- β , které se zde uvažují, zahrnují muteiny zralé nativní sekrece IFN- β , kde lze jeden či více cysteinových zbytků, které nejsou nezbytné pro biologickou aktivitu, úmyslně vypustit či nahradit jinými aminokyselinami pro eliminaci míst jejich intermolekulárního příčného spojování nebo nesprávné tvorby disulfidických můstků. Varianty IFN- β tohoto typu zahrnují ty, které obsahují glycin, valin, alanin, leucin, isoleucin, tyrosin, fenylalanin, histidin, tryptofan, serin, threonin nebo methionin místo cysteinu, který je aminokyselinou 17 ve zralé přirozené aminokyselinové sekvenci. Serin a threonin představují preferovanější náhrady vzhledem k jejich chemické analogii s cysteinem. Serinové substituce jsou nejpreferovanější. V jednom ztělesnění se cystein na místě aminokyseliny 17 zralé přirozené sekvence

nahrazuje serinem. Cystein 17 se též může vypustit způsoby známými v oboru (viz například US patent č. 4 588 584, který se zde zahrnuje formou odkazu) s obdržením zralého muteinu IFN- β , který je o jednu aminokyselinu kratší než zralý nativní IFN- β . Viz též jako příklady US patenty č. 4 530 787, 4 572 798 a 4 588 585. Proto tento vynález též uvažuje varianty IFN- β s jednou či více mutacemi, které zlepšují například jejich farmaceutickou použitelnost.

Ten, kdo má zkušenost v oboru, si uvědomí, že lze zavádět další změny mutací do nukleotidových sekvencí kódujících IFN- β , což vede ke změnám aminokyselinové sekvence IFN- β bez pozměňování biologické aktivity interferonu. Proto lze vytvořit izolovanou molekulu nukleové kyseliny kódující variantu IFN- β o sekvenci, která se liší od aminokyselinové sekvence zralé nativní IFN- β , zavedením jedné či více nukleotidových substitucí, adicí nebo delecí do odpovídající nukleotidové sekvence, která se zde popisuje, jako je tomu v případě jedné či více aminokyselinové substituce, adice či delece zaváděné do kódovaného IFN- β . Mutace lze zavádět standardními způsoby, jako je mutagenéza zaměřená na místo a mutagenéza zprostředkovaná v PCR. Tyto varianty IFN- β se rovněž uvažují v tomto vynálezu.

Například lze provést konzervativní aminokyselinové substituce na jednom či více předem určených přednostně neesenciálních, aminokyselinových zbytků. "Neesenciální" aminokyselinový zbytek je zbytek, který se může pozměnit oproti sekvenci IFN- β přirozeného typu bez změny biologické aktivity, zatímco "esenciální" aminokyselinový zbytek se vyžaduje pro zajištění biologické aktivity. "Konzervativní aminokyselinová substituce" je taková, při které se aminokyselinový zbytek nahrazuje aminokyselinovým zbytkem s podobným

postranním řetězcem. Skupiny aminokyselinových zbytků s podobnými postranními řetězci se definují v oboru. Tyto skupiny zahrnují aminokyseliny s bázeckými postranními řetězci (například lysin, arginin, histidin), s kyselými postranními řetězci (například kyselina aspartová, kyselina glutamová), polárními postranními řetězci bez náboje (glycin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, cystein), nepolárními postranními řetězci (alanin, valin, lucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, methionin, tryptofan), beta-rozvětvenými postranními řetězci (například threolin, valin, isoleucin) a aromatickými postranními řetězci (například tyrosin, fenylalanin, tryptofan, histidin). Tyto substituce by nešlo provést pro zachované aminokyselinové zbytky nebo pro aminokyselinové zbytky zůstávající v rámci konzervovaného motivu.

Aternativně lze provést sekvence varianty IFN- β nukleotidu zavedením mutací náhodně podél celé kódovací sekvence IFN- β nebo podél její části, jako je tomu saturační mutagenézí a lze provést screening výsledných mutantů ohledně biologické aktivity IFN- β pro identifikaci mutantů zachovávající aktivitu. Po mutagenezi lze exprimovat kódovaný protein rekombinantně a aktivitu proteinu lze stanovit standardními způsoby analýzy, které se zde popisují.

Biologicky aktivní varianty IFN- β mají obecně alespoň 80 %, přednostněji zhruba 90 % až zhruba 95 % nebo více a nejlépe zhruba 96 % až zhruba 99 % identity aminokyselinové sekvence s aminokyselinovou sekvencí zralého nativního IFN- β , který slouží jako základ srovnání. "Sekvenční identita" uvažuje stejné aminokyselinové zbytky přítomné ve variantě polypeptidu a v polypeptidové molekule sloužící jako referenční složka, jestliže se daný souvislý úsek aminokyse-

linové sekvence varianty přiřadí a srovnává s aminokyselinovou sekvencí referenční molekuly.

Pro účely optimálního přiřazení dvou sekvencí pro stanovení identity sekvence může mít souvislý segment aminokyselinové sekvence varianty přídavné aminokyselinové zbytky nebo vypuštěné aminokyselinové zbytky oproti aminokyselinové sekvenci referenční molekuly. Souvislý segment použitý pro srovnání s referenční aminokyselinovou sekvencí obsahuje alespoň 20 souvislých aminokyselinových zbytků. Korekce na zvýšenou sekvenční identitu související se zařazením mezer do sekvence aminokyselin varianty lze zavést přidělením trestných bodů za mezeru (gap penalty). Způsoby přiřazení sekvence jsou dobře známé v oboru.

Proto lze stanovení procenta identity mezi kterýmikoli dvěma sekvencemi provést pomocí matematického algoritmu. Jeden neomezující případ matematického algoritmu užívaného pro srovnání sekvencí je algoritmus Myersa a Millera, *Comput. Appl. Biosci.* 4, 11-17 (1988). Takový algoritmus se používá v programu ALIGN (verze 2.0), který je částí souboru programového vybavení pro přiřazení GCG. Tabulku zbytku hmotnosti PAM120, vody pro délku mezery 12 a vody pro délku mezery 4 lze použít s programem ALIGN při srovnání aminokyselinových sekvencí. Dalším preferovaným neomezeným příkladem matematického algoritmu pro použití při srovnání dvou sekvencí je algoritmus Karlina a Altschula, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5873-5877 (1990) a modifikovaný algoritmus Karlina a Altschula, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5873-5877 (1993). Tento algoritmus se inkorporuje do programu NBLAST a XBLAST Altschula a kol., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990). Hledání aminokyselinové sekvence BLAST lze provést programem XBLAST, skóre = 50, délka slova = 3 pro obdržení aminokyselinové

sekvence podobné danému polypeptidu. Přiřazení s mezerami pro účely srovnávání, BLAST s mezerami, lze použít, jak popisuje Altschul a kol, *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402 (1997). Alternativně lze použít PSI-BLAST pro provedení integrovaného vyhledávání, které detekuje vztahy vzdáleností mezi molekulami. Viz Altschul a kol (1997) výše. Při použití programu BLAST, BLAST s mezerami nebo programu PSI-BLAST lze použít parametry standardního nastavení. Viz též program ALIGN [Dayhoff (1978) v *Atlas Protein Sequence a Structure* 5, Suppl. 3, National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C.] a programy v souboru Wisconsin Sequence Analysis Package, Verze 8 (od Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), například program GAP, kde se používají parametry standardního nastavení programů.

Při úvaze nastavení procenta aminokyselinové frekvenční identity se mohou některé polohy aminokyselinových zbytků lišit následkem konzervativních aminokyselinových substitucí, které neovlivňují vlastnosti proteinové funkce. V těchto příkladech se může procentická sekvencí identita upravit směrem vzhůru, aby se vzala v úvahu podobnost konzervativně substitovaných aminokyselin. Tyto úpravy jsou dobře známy v oboru. Viz například Myers a Miller, *Comput. Appl. Biosci.* 4, 11-17 (1988).

Biologicky aktivní varianty IFN- β zahrnuté do tohoto vynálezu též zahrnují polypeptidy IFN- β kovalentně spojené například s polyethylenglykolem (PEG) nebo albuminem. Kovalentní hybridní molekuly IFN- β mají určité žádoucí farmaceutické vlastnosti, jako je například prodloužený poločas v krevním séru po podání pacientovi. Způsoby tvorby aduktů PEG-IFN zahrnují chemickou modifikaci monomethoxy-polyethylenglykolu pro vytvoření aktivované sloučeniny, která

bude reagovat s IFN- β . Způsoby tvorby a použití polypeptidů spojených s PEG se popisují například v Delgado a kol., *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 9, 249-304 (1992). Způsoby tvorby albuminových hybridních polypeptidů zahrnují spojení kódovacích sekvencí pro daný polypeptid (IFN- β) a albuminu a popisují se v US patentu 5 876 969, který se zde zahrnuje formou odkazu.

Biologicky aktivní varianty IFN- β uvažované v tomto vynálezu by měly zachovávat aktivity IFN- β , zejména schopnost vazby na receptory IFN- β . V některých ztělesněních varianta IFN- β zachovává alespoň 25 %, alespoň 50 %, alespoň 75 %, alespoň 85 %, alespoň 90 %, alespoň 95 %, alespoň 98 %, alespoň 99 % nebo více biologické aktivity polypeptidů, jejichž aminokyselinové sekvence znázorňuje obrázek 1 nebo 2. Varianty IFN- β , jejichž aktivita se zvyšuje ve srovnání s aktivitou polypeptidů znázorněnou na obrázku 1 nebo 2 se rovněž uvažují. Biologickou aktivitu variant IFN- β lze měřit jakýmkoliv způsobem známým v oboru. Příklady těchto analýz uvádí Fellous a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3082-3086 (1982) Czerniecki a kol., *J. Virol.* 49 (2), 490-496, (1984), Mark a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5662-5666 (1984), Branca a kol., *Nature* 277, 221-223 (1981), Williams a kol., *Nature* 282, 582-586 (1979), Herberman a kol., *Nature* 277, 221-223 (1979), Anderson a kol., *J. Biol. Chem.* 257 (19), 11301-11304 (1982) a rozbor účinnosti IFN- β , který se zde popisuje (viz příklad 2).

IFN- β v prostředí podle tohoto vynálezu může pocházet od kteréhokoli živočišného druhu včetně, avšak bez omezení, druhů ptáků, psa, skotu, vepře, koně a člověka. Přednostně pochází IFN- β od savčích druhů, kdy se přípravek používá při léčbě poruchy savčího IFN- β a přednostněji pochází od savce

téhož druhu, jako je savec, který se podrobuje léčbě takové poruchy. Proto tam, kde je savcem, který se podrobuje léčbě, člověk, se subjektu přednostně podává HSA prostý farmaceutický prostředek obsahující v podstatě monomerní lidský IFN- β nebo jeho biologicky aktivní variantu.

Neomezující příklady polypeptidů IFN- β a polypeptidů varianty IFN- β uvažovaných v tomto vynálezu popisuje Nagat a kol., *Nature* 284, 316-320 (1980), Goeddel a kol., *Nature* 287, 411-416 (1980), Yelverton a kol., *Nucleic Acids Res.* 9, 731-741 (1981), Streuli a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 2848-2852 (1981), EP028033B1 a EP109748B1. Viz též US patenty č. 4 518 584, 4 569 908, 4 588 585, 4 738 844, 4 753 795, 4 769 233, 4 793 995, 4 914 033, 4 959 314, 5 545 723, a 5 814 485. Tyto popisy se zde zahrnují formou odkazu. Tyto citace též poskytují vodítko ohledně zbytků a oblastí polypeptidu IFN- β , které se mohou pozměnit bez ztráty biologické aktivity.

V jednom ztělesnění tohoto vynálezu je IFN- β v rámci stabilizovaných farmaceutických formulací zralým nativním polypeptidem IFN- β . V dalším ztělesnění je IFN- β v těchto formulacích zralým polypeptidem IFN- β , ve kterém se cystein na místě aminokyseliny 17 zralé nativní sekvence nahradí serinem, jak se diskutuje výše. Avšak tento vynález zahrnuje další ztělesnění, ve kterých IFN- β v rámci stabilizované farmaceutické formulace je kterýkoliv biologicky aktivní polypeptid IFN- β nebo jeho varianta, jak se zde jiným způsobem popisuje.

V některých ztělesněních tohoto vynálezu se tvoří IFN- β rekombinantně. Jako rekombinantně vytvořený IFN- β se uvažuje IFN- β , který má srovnatelnou biologickou aktivitu se

zralým nativním IFN- β a který se připraví způsoby rekombinantní DNA. IFN- β lze vytvořit pěstováním hostitelských buněk transformovaných expresním vektorem obsahujícím nukleotidovou sekvenci, která kóduje polypeptid IFN- β . Hostitelská buňka je taková, která přepisuje nukleotidovou sekvenci a poskytuje požadovaný protein a může být prokaryotní (například, *E. coli*) nebo eukaryotní (například buňka kvasinky, hmyzu nebo savce). Příklady rekombinantní tvorby IFN- β popisují Mantei a kol., *Nature* 297, 128 (1982), Ohno al. a kol., *Nucleic Acids Res.* 10, 967 (1982), Smith a kol., *Mol. Cell. Biol.* 3, 2156 (1983) a US patenty č. 4 462 940, 5 702 699 a 5 814 485, které se zde zahrnují formou odkazu. Geny lidského interferonu se klonují s použitím způsobu rekombinantní DNA ("rDNA") a exprimují se v *E. coli* [Nagola et al. *Nature* 284, 316 (1980), Goeddel a kol., *Nature* 287, 411 (1980), Yelverton a kol., *Nucl. Acid Res.* 9 731 (1981), Streuli a kol., *Proc Natl. Acad. Sci U. S. A.* 78, 2848 (1981)]. Alternativně lze vytvářet IFN- β transgenním živočichem či rostlinou, u kterých se zajistí způsoby genetického inženýrství exprese daného IFN- β proteinu v souladu se způsoby známými v oboru.

Proteiny či polypeptidy vykazující vlastnosti typu nativního interferonu- β lze též tvořit technologií rDNA extrakcí poly-A-rich 12S messengerové mRNA z virově indukovaných lidských buněk, syntézou cDNA s dvojitou šroubovicí při použití mRNA jako templátu, zavedením cDNA do příslušného klonovacího vektoru, transformací vhodných mikroorganismů vektorem, sbíráním těchto mikroorganismů a expresí interferonu β . Viz například evropská patentová vyhláška č. 28033 (vydaná 6. května 1981), 32134 (vydaná 15. července 1981) a 34307 (vydaná 26. srpna 1981) popisující různé způsoby tvorby interferonu β -rDNA.

Alternativně lze IFN- β připravit chemicky kterýmkoliv z několika způsobů známých těm, kteří mají zkušenost v oboru peptidů. Viz například Li a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2216-2220 (1983), Steward a Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Company, Rockford, Illionis) a Barany a Merrifield (1980) *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, red. Gross a Meinhofer, díl 2 (Academic Press, New York, 1980), str. 3-254, diskutující způsoby přípravy peptidů v tuhé fázi a Bodansky (1984) *Principles of Peptide Synthesis* (Springer-Verlag, Berlin) a Gross a Meinhofer, red. (1980) *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, díl 1 (Academic Press, New York), diskutující klasickou přípravu v roztoku. IFN- β lze též chemicky připravit způsobem v současné přípravě více peptidů. Viz například Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5131-5135 (1984), a US patent č. 4 631 211.

Rekombinantně získaný IFN- β pro použití při přípravě stabilizovaných farmaceutických prostředků s obsahem IFN- β prostých HSA podle tohoto vynálezu lze obdržet a purifikovat kterýmkoliv způsobem známým tomu, kdo má zkušenost v oboru. Tyto způsoby zahrnují způsoby popsané v US patentech č. 4 462 940 a 5 702 699, které se zde zahrnují formou odkazu. Tyto způsoby získávají interferon v čisté formě IFN- β , která má tendenci k vytváření agregátů za nepřítomnosti SDS, který se používá jako solubilizační prostředek. Dále tyto způsoby vystavují protein vysokému pH, které může nepříznivě ovlivnit biologické vlastnosti proteinu a vést k prostředkům obsahujícím zbytková množství SDS použitého pro solubilizaci proteinu v průběhu purifikace. Proto, i když lze těmito způsoby obdržet IFN- β , přednostně se získává a purifikuje zlepšeným způsobem popsáním v provizorní přihlášce nazvané "*Improved Method of Protein Purification and Recovery*" podané 27. října 2000

s číslem US přihlášky 60/243 965, v provizorní přihlášce nazvané "*Improved Method of Protein Purification and Recovery*" podané 9. dubna 2001 s číslem US přihlášky 60/282 607 a v provizorní přihlášce podané současně nazvané "*Method of Protein Purification and Recovery*" s číslem US přihlášky ____, jejichž obsah se zde zahrnuje jako celek formou odkazu. V těchto současně projednávaných a současně podaných přihláškách se popisují dva zlepšené způsoby purifikace a získávání IFN- β . První z těchto způsobů purifikace a získávání zahrnuje srážení v podstatě purifikovaného IFN- β alkoholem, jako je některý alifatický alkohol a rozpuštění vysráženého IFN- β do guanidin-hydrochloridu. Výsledný roztok se poté zředí do příslušného pufru pro renaturaci proteinu. Druhý z těchto způsobů purifikace a získávání vynechává krok srážení. Tímto způsobem se vzorek obsahující v podstatě purifikovaný IFN- β smísí s guanidin-hydrochloridem s vytvořením roztoku, který obsahuje solubilizovaný IFN- β , tento roztok se poté zředí do příslušného pufru pro renaturaci proteinu. Při obou způsobech se roztok obsahující renaturovaný IFN- β poté filtruje nebo dialyzuje do pufru užívaného pro farmaceutické účely. Při použití pro přípravu HSA prostého farmaceutického prostředku podle tohoto vynálezu se purifikovaný renaturovaný IFN- β protein diafiltruje nebo dialyzuje do prostředku o nízké iontové síle podle tohoto vynálezu, jak popisuje příklad 8 níže.

Prostředky uvažované v tomto vynálezu mohou mít od nízkých koncentracích zhruba 0,01 mg/ml IFN- β až do zhruba 20,0 mg/ml IFN- β (hmotnost/objemem). V různých ztělesněních jsou koncentrace IFN- β od zhruba 0,01 mg/ml do zhruba 20 mg/ml, od zhruba 0,015 mg/ml do zhruba 12,5 mg/ml, od zhruba 0,025 mg/ml do zhruba 10,0 mg/ml, od zhruba 0,05 mg/ml do zhruba 8,0 mg/ml, od zhruba 0,075 mg/ml do zhruba 6,0 mg/ml,

od zhruba 0,1 mg/ml do zhruba 4,0 mg/ml, od zhruba 0,125 mg/ml do zhruba 2,0 mg/ml, od zhruba 0,175 mg/ml do zhruba 1,0 mg/ml, od zhruba 0,2 mg/ml do zhruba 0,5 mg/ml, od zhruba 0,225 mg/ml do zhruba 0,3 mg/ml a zhruba 0,25 mg/ml.

V některých ztělesněních prostředky podle tohoto vynálezu obsahují farmaceuticky přijatelný nosič. Pojem "farmaceuticky přijatelný nosič" znamená, že je to nosič, který se konvenčně používá v oboru pro usnadnění skladování, podávání a/nebo zlepšení léčivého účinku terapeutických složek. Nosič může též snižovat vedlejší nežádoucí účinky IFN- β . Vhodný nosič by měl být stabilní, to jest neschopný reakce s dalšími složkami v prostředku. Neměl by vytvářet významné místní či systémové nepříznivé účinky u příjemce při dávkách a koncentracích používaných při léčbě. Tyto nosiče jsou obecně známy v oboru. Vhodné nosiče pro tento vynález jsou ty, které konvenčně používají velké stabilní makromolekuly, jako je želatina, kolagen, polysacharid, monosacharidy, polyvinylpyrrolidon, kyselina polymléčná, kyselina polyglykolová, polymerní aminokyseliny, fixované oleje, ethyl-oleát, liposomy, glukosu, laktosu, mannosu, dextrosu, dextran, celulosu, sorbitol, polyethylenglykol apod. Mohou být též vhodné nosiče pro pomalé uvolňování, jako je kyselina hyaluronová. Viz zejména Prisell a kol., *Int. J. Pharmaceu.* **85**, 51-56 (1991), a US patent č. 5 166 331.

Farmaceutický prostředek může navíc obsahovat solubilizující prostředek nebo prostředek pro zvýšení rozpustnosti, který přispívá k rozpustnosti proteinu mimo zvýšení rozpustnosti, které se obdrží použitím prostředků o nízké iontové síle, které se zde popisují. Sloučeniny obsahující guanidinovou skupinu, nejlépe arginin, jsou vhodnými prostředky pro zvýšení rozpustnosti IFN- β . Příklady takových

látek zvyšujících rozpustnost zahrnují aminokyselinu arginin, stejně tak jako aminokyselinové analogy argininu, které uchovávají schopnost zvyšovat rozpustnost IFN- β . Tyto analogy zahrnují bez omezení bipeptidy a tripeptidy obsahující arginin. Další vhodné solubilizační prostředky se diskutují v US patentech č. 4 816 440, 4 894 330, 5 004 605, 5 183 746, 5 643 566 a práci Wang a kol., *J. Parenteral Drug Assoc.* 34, 452-462 (1980), a tyto publikace se zde zahrnují formou odkazu.

Navíc k prostředkům popisovaným výše lze přidávat další stabilizační prostředky jako je kyselina ethylen-diamintetraoctová (EDTA) nebo jedna z jejích solí, jako je dvojsodná sůl EDTA, pro další zvýšení stability kapalných farmaceutických prostředků. Edta působí zachycování kovových iontů, o kterých je známo, že katalyzují mnohé oxidační reakce, čímž zajišťuje přídatný stabilizační účinek. Jiné vhodné stabilizační prostředky zahrnují neiontové povrchově aktivní látky včetně polyoxyethylensorbitolesterů, jako je polysorbát 80 (Tween 80) a polysorbát 20 (Tween 20), polyoxypropylenpolyoxyethylenové estery, jako je Pluronic F68 a Pluronic F127, polyoxyethylenalkoholy, jako je Brij 35, simethikon, polyethylenglykol, jako je PEG400, lysofosfatidylcholin a polyoxyethylenp-tercoktylphenol, jako je Triton X-100. Klasická stabilizace farmaceutických látek povrchově aktivními látkami se popisuje například v Levine a kol., *J. Parenteral Sci. Technol.* 45, (3) 160-165 (1991) a tato práce se zde zahrnuje formou odkazu.

Farmaceuticky účinné množství stabilizovaného kapalného HSA prostého prostředku s obsahem IFN- β podle tohoto vynálezu nebo rekonstituovaný stabilizovaný lyofilizovaný HSA prostý prostředek s obsahem IFN podle

tohoto vynálezu se podává pacientovi. Pojem farmaceuticky účinné množství znamená množství, které je použitelné při léčení, prevenci, či diagnóze choroby či stavu. Obvyklé cesty podávání zahrnují, avšak bez omezení, perorální podávání, nosní podávání, plicní podávání a parenterální podávání včetně transdermálního, intravenózního, intramuskulárního, subkutánního, intraarteriálního a intraperitoneálního injekčního či infuzního podávání. V jednom takovém ztělesnění se podává injekcí, přednostně subkutánní injekcí. Injekční formy prostředku podle tohoto vynálezu zahrnují, avšak bez omezení, roztoky, suspenze a emulze. Obvykle obsahuje terapeuticky účinné množství IFN- β zhruba 0,01 $\mu\text{g/kg}$ až zhruba 5 mg/kg prostředku, přednostně zhruba 0,05 $\mu\text{g/kg}$ až zhruba 1000 $\mu\text{g/kg}$, přednostněji 0,1 $\mu\text{g/kg}$ až zhruba 500 $\mu\text{g/kg}$, ještě přednostněji zhruba 0,5 $\mu\text{g/kg}$ až zhruba 30 $\mu\text{g/kg}$.

V jednom ztělesnění se stabilizovaný HSA prostý farmaceutický prostředek obsahující v podstatě monomerní IFN- β formuluje v jednotkové dávce a může být v injekční či infuzní formě ve formě roztoku, suspenze nebo emulze. Dále se může skladovat zmrazený či připravený v suché formě, jako je lyofilizovaný prášek, který se může rekonstituovat do kapalného roztoku, suspenze či emulze před podáním kterýmkoliv z různých způsobů včetně perorálních nebo parenterálních způsobů podávání. Stabilizovaný farmaceutický prostředek se může sterilizovat membránovou filtrací a ukládá se v nádobkách pro jednotkovou dávku či více dávek, jako jsou uzavřené lahvičky či ampule. Další způsoby přípravy farmaceutického prostředku obecně známé v oboru lze použít pro další zvýšení stability při skladování farmaceutických prostředků, které se zde popisují bez nepříznivého ovlivnění prospěšných účinků popisovanými stabilizačními prostředky. Podrobná diskuse formulace a volby farmaceuticky přijatelných

nosičů stabilizačních prostředků atd. se popisuje v *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1990) (18. vydání, Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania) a zde se zahrnuje formou odkazu.

Formulace obsahující účinné množství farmaceutických prostředků podle tohoto vynálezu s obsahem β -interferonu (IFN- β) nebo jeho varianty, jako je mutein lidského IFN- β (hIFN- β), označovaný hIFN- β_{ser17} , jsou použitelné při diagnostice, prevenci a léčení (lokálním či systémovým) klinických indikací, které reagují na terapii tímto polypeptidem. Tyto klinické indikace zahrnují například poruchy či choroby centrálního nervového systému, mozku a/nebo míchy včetně Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, Lewyho demence, mnohočetné sklerózy, epilepsie, mozečkové ataxie, progresivní supranukleární palsy, amyotrofní laterální sklerózy, afektivních poruch, úzkostných poruch, obsedantně kompulsivních poruch, poruch osobnosti, poruch s nedostatkem pozornosti, poruch s hyperaktivitou a nedostatkem pozornosti, Tourettova syndromu, Tay Sachsovy choroby, Nieman Pickovy choroby a schizofrenie, poškození nervů na základě cerebrovaskulárních poruch a mrtvice v mozku či míše následkem infekcí centrální nervové soustavy včetně meningitidy a HIV, tumoru mozku a míchy a prionového onemocnění, autoimunitních chorob včetně získané nedostatečnosti imunity, revmatické artritidy, psoriázy, Crohnovy choroby, Sjogrenova syndromu, amyotrofní laterální sklerózy a lupusu a karcinomu včetně karcinomu prsu, prostaty, močového měchýře, ledvin a kolonu. Podávání IFN- β nebo jeho muteinu lidem či zvířatům se může provádět perorálně, intraperitoneálně, intramuskulárně, subkutánně, intravenózně, intranasálně nebo pulmunálně, podle posouzení lékaře.

Tento vynález poskytuje způsoby zvyšování rozpustnosti interferonu- β (IFN- β) nebo jeho aktivní varianty ve farmaceutickém prostředku za nepřítomnosti lidského serumalbuminu. Tento způsob zahrnuje přípravu prostředku o nízké iontové síle, jak se zde popisuje na jiném místě, takovým způsobem, že se pH prostředku udržuje na zhruba pH 3,0 až zhruba pH 5,0 a zavedení IFN- β nebo jeho biologicky aktivní varianty do tohoto prostředku. V jednom ztělesnění obsahuje prostředek o nízké iontové síle glycin, kyselinu aspartovou nebo sukcinát sodný jako pufr o koncentracích zhruba 1 mM až zhruba 30 mM, přednostně 2 mM až zhruba 5 mM. Kompozice může dále obsahovat neiontový prostředek pro úpravu osmotického tlaku v množství, které je dostatečné k tomu, aby byl prostředek isotonický s tělesnými kapalinami, jak se zde popisuje na jiném místě. V jednom ztělesnění se neiontový prostředek pro úpravu osmotického tlaku volí ze skupiny zahrnující trehalosu, sacharosu, mannitol a jejich kombinace. Dále udržováním pH kompozice mezi zhruba 3,0 a 5,0 přednostně 4,0 se umožňuje uchovat většinu IFN- β v monomerním stavu. Tento vynález tedy též poskytuje způsoby přípravy stabilizovaného HSA prostého farmaceutického prostředku s obsahem v podstatě monomerního IFN- β .

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady se poskytují jako ilustrace a nikoliv jako omezení.

Tento vynález se uskutečňuje díky lepšímu pochopení vlastností rozpustnosti a stability IFN- β -1b. Preferované charakteristiky HSA prostých prostředků s obsahem IFN- β -1b představují rozmezí pH od zhruba 3,0 do zhruba 5,0 a velice nízkou iontovou sílu. Použití podmínek velice nízké iontové

síly v tomto rozmezí pH vede k vyššímu obsahu monomerního IFN- β -1b a nižšímu obsahu agregovaných složek IFN- β -1b. Tyto podmínky zajišťují rozpustnost a stabilitu IFN- β -1b, které byly dříve nedosažitelné bez použití HSA v prostředí. Rovněž umožňují přípravu prostředků s maximálním obsahem IFN- β -1b.

IFN- β -1b pro použití v těchto experimentech tvoří *E. coli* v podstatě tak, jak se popisuje v několika pevných purifikačních krocích v US patentech č 4 462 940 a/nebo 4 816 400. Znamená to, že se transformované bakterie použijí pro tvorbu IFN- β , hostitelské buňky se zkoncentrují a jejich stěny se naruší s obdržáním hrubého materiálu IFN- β -1b.

Takto obdržený hrubý materiál IFN- β -1b má koncentrace 50 mM octanu sodného, 1 mM EDTA, 0,1 % natrium-dodecylsulfátu (SDS) při pH 5,5. Po získání výchozí látky pro měření rozpustnosti a stability popisovaná níže se z hrubého materiálu IFN- β -1b odstraní SDS zpracováním sloupcem G-25 (Pharmacia) v rovnováze s 1,5 mM roztokem hydroxidu sodného při pH větším než 11. Po odebrání ze sloupce G-25 se přidá zhruba 1 desetina objemu 1 M glycinu, pH 3 při rychlém míchání s úpravou na pH zhruba 3. Materiál se ukládá při teplotě 4 °C nebo zmrazený pro následné použití pro měření rozpustnosti a stability.

Příklad 1

Stanovení rozpustnosti IFN- β -1b

Počáteční experimenty se provádějí pro pochopení rozpustnosti IFN- β -1b za řady podmínek pH, typu pufru a iontové síly. Roztok IFN- β -1b (zhruba 0,8 mg/ml IFN- β -1b ve 100 mM roztoku glycinu, pH 3,0) se dialyzuje proti pufru z

tabulky 1. Výsledky ukazuje obrázek 1. Tyto výsledky ukazují, že rozpustnost IFN- β -1b závisí na pH a iontové síle. IFN- β -1b při pH 3,0 zůstává rozpustný při všech koncentracích chloridu sodného do 200 mM. Při pH 4,0 se formulace IFN- β -1b stávají méně rozpustnými, když koncentrace chloridu sodného dosahuje 150 mM. Ve formulacích při pH 5,0 se IFN- β -1b stává méně rozpustným při dosažení koncentrace chloridu sodného 100 mM. Při úvaze všech těchto údajů se ukazuje, že IFN- β -1b je nejrozpustnější v prostředcích při pH 3,0, méně rozpustný v prostředcích pH 4,0 a nejméně rozpustný při pH 5,0. Tyto údaje též ukazují, že rostoucí iontová síla přípravku (zvyšující se koncentrací chloridu sodného) též snižuje rozpustnost IFN- β -1b.

Výše popsaný pokus dokáže určit podmínky příznivé pro rozpustnost IFN- β -1b, avšak nestanoví mez rozpustnosti při jakýchkoliv daných podmínkách. Následný experiment se provádí po stanovení mezí rozpustnosti IFN- β -1b. Pro maximalizaci rozpustnosti IFN- β -1b se používají prostředky o nízké iontové síle (například 5 mM pufr bez solí, jako je chlorid sodný). Po dialýze se IFN- β -1b zkoncentruje pro stanovení meze rozpustnosti v daném prostředku. Výsledky těchto pokusů ukazuje obrázek 2. Prostředky o pH 3,0 až 4,0 jsou nejrozpustnější a rozpustnost je nejméně 16 mg/ml. Prostředek o pH 5 je rozpustný do zhruba 8 mg/ml. Prostředky o pH převyšujícím 5,0 jsou rozpustné pouze do zhruba 0,2 mg/ml. Tyto výsledky opět ukazují, že pH má značný účinek na rozpustnost IFN- β -1b. Prostředky o nízké iontové síle při pH 3,0 a pH 4,0 jsou rozpustnější než při pH 5,0. Nad pH 5,0 je IFN- β -1b v podstatě nerozpustný v prostředcích s nízkou iontovou silou.

tabulka 1

Směsi pro zjištění rozpustnosti IFN- β -1b, pH, typ pufru a koncentrace chloridu sodného

Pufr	pH	koncentrace chloridu sodného (mM)
5 mM glycin	pH 3	0 mM
5 mM glycin	pH 3	50 mM
5 mM glycin	pH 3	100 mM
5 mM glycin	pH 3	150 mM
5 mM citrát	pH 4	0 mM
5 mM citrát	pH 4	50 mM
5 mM citrát	pH 4	100 mM
5 mM citrát	pH 4	150 mM
5 mM acetát	pH 4	0 mM
5 mM acetát	pH 4	50 mM
5 mM acetát	pH 4	100 mM
5 mM acetát	pH 4	150 mM
5 mM formiát	pH 4	0 mM
5 mM formiát	pH 4	50 mM
5 mM formiát	pH 4	100 mM
5 mM formiát	pH 4	150 mM
5 mM acetát	pH 5	0 mM
5 mM acetát	pH 5	50 mM
5 mM acetát	pH 5	100 mM
5 mM acetát	pH 5	150 mM

5 mM histidin	pH 5	0 mM
5 mM histidin	pH 5	50 mM
5 mM histidin	pH 5	100 mM
5 mM histidin	pH 5	150 mM
5 mM sukcinát sodný	pH 5	0 mM
5 mM sukcinát sodný	pH 5	50 mM
5 mM sukcinát sodný	pH 5	100 mM
5 mM sukcinát sodný	pH 5	150 mM

Příklad 2

Analytické ultracentrifugační experimenty

Experimenty zaměřené na rozpustnost mohou stanovit, kolik IFN- β -1b je v roztoku, avšak požadují se další způsoby pro stanovení stavu agregace proteinů. Je důležité stanovit, zda je protein monomerní v dané formulaci a kolik proteinu (pokud je vůbec přítomen) existuje ve vyšších formách jako jsou dimery, trimery atd. Analytická ultracentrifugace je jedním z nejúčinnějších způsobů pro objasnění stavu agregace proteinu [viz Liu a Shire *J. Pharm. Sci.* **88**, 1237-1241 (1999)]. Provádějí se tři experimenty pro charakterizaci monomerního obsahu několika prostředků IFN- β -1b za použití analytické ultracentrifugace. Tyto analytické ultracentrifugační experimenty se provádějí s různými prostředky s IFN- β -1b. Každý experiment zahrnuje společnou formulaci (5 mM glycin, pH 3,0). Avšak každá z těchto obecných formulací se mírně liší v procentickém obsahu monomeru (obrázek 3 - 89,8 %, obrázek 6 - 94,2 %, obrázek 9 - 86,3 %). Způsoby získávání a purifikace používané pro přípravu těchto IFN- β -1b poskytují stejnou agregaci molekuly IFN- β -1b, která je svou

povahou kovalentní. Prostředek o koncentraci 5 mM glycinu, pH 3,0 tedy pro každý experiment slouží jako výchozí směs pro množství agregátu na počátku experimentu.

První experiment zjišťuje účinek pH na stav agregace IFN- β -1b. Formulace o pH 3,0 (obsahující pouze 5 mM glycin pro pufování roztoku), pH 4,0 (obsahující pouze 5 mM kyselinu aspartovou pro pufování roztoku) a pH 5,0 (obsahující pouze 5 mM sukcinát sodný pro pufování roztoku) se analyzují. Výsledky ukazují obrázky 3, 4 a 5. Hlavní vrcholy v těchto profilech odpovídají molekulové hmotnosti zhruba 20 kDa, což je velice blízké molekulové hmotnosti IFN- β -1b (19,878 kDa). Hlavní vrchol tedy odpovídá monomeru IFN- β -1b. Větší složky (dimery, trimery, atd.) odpovídají vyšším sedimentačním koeficientům. Tyto výsledky ukazují, že i když je IFN- β -1b hlavně monomerní při pH 3,0 a pH 4,0 (zhruba 90 %), při pH 5,0 začíná molekula agregovat na vyšší složky a pouze 75 % je v monomerní formě. Tyto výsledky ukazují, že stav agregace IFN- β -1b ovlivňuje změny pH a že monomer IFN- β -1b je zvýhodněn při nízkých pH, jako je pH 3,0 a pH 4,0.

Druhý experiment zjišťuje účinek iontové síly na stav agregace IFN- β -1b. Iontová síla prostředku se zvyšuje v prostředcích při pH 3,0 (pufovaných 5 mM glycinem) s pří-
davkem 0,50 mM a 150 mM chloridu sodného. Výsledky ukazují obrázky 6, 7 a 8. V prostředku bez pří-
davku chloridu sodného (obrázek 6), tvoří monomerní forma IFN- β -1b zhruba 94 % z celkového IFN- β -1b (to jest 94 % v hlavním vrcholu). Při přidání chloridu sodného 50 mM do přípravku klesá obsah monomeru na zhruba 76 % (obrázek 7) a při pří-
davku 150 mM chloridu sodného do pří-
davku klesá obsah monomeru na méně než 10 % (obrázek 8). Tyto výsledky ukazují, že agregační stav

IFN- β -1b silně závisí na iontové síle a že monomer IFN- β -1b je zvýhodněný za podmínek nízké iontové síly.

Žádanou vlastností injekčního farmaceutického prostředku je, aby byl isotonický s tělesnými tekutinami. Iontové substance (jako je chlorid sodný) a neiontové substance (jako jsou cukry, sacharosa a trehalosa) lze použít pro přípravu prostředku isotonického s tělesnými tekutinami. Dřívější analytické ultracentrifugační experimenty zkoumaly přípravky, které byly buď neisotonické (obsahující pouze pufr 5 mM) nebo obsahovaly chlorid sodný jako iontový prostředek pro úpravu osmotického tlaku. Třetí experiment zkoumá účinek neiontových prostředků pro úpravu tlaku na agregační stav IFN- β -1b. V tomto experimentu se připravují tři formulace při pH 3,0 (pufrované 5 mM glycinem). Jedna obsahuje pouze glycinový pufr, druhá má upravený osmotický tlak 9 % sacharosy a třetí 9 % trehalosy. Analytické ultracentrifugační výsledky ukazují obrázky 9, 10 a 11. Obsah monomeru prostředku se samotným puffrem (obrázek 9) je zhruba 86 %. Při přidání buď sacharosy (obrázek 10) nebo trehalosy (obrázek 11) jako prostředku pro úpravu osmotického tlaku je obsah monomeru zhruba 89 %. Tyto výsledky ukazují, že neiontové prostředky pro úpravu osmotického tlaku, jako je sacharosa a trehalosa, nepodporují agregaci molekuly IFN- β -1b.

Příklad 3

Stabilita lyofilizovaných prostředků s obsahem IFN- β -1b prostých HSA za zrychlených podmínek působení teploty

HSA prosté formulace IFN- β -1b při pH 3,0 (5 mM glycin jako pufr) a pH 4,0 (5 mM aspartová kyselina jako pufr) s obsahem buď 9 % trehalosy (pH 3,0 a pH 4,0) nebo 9 %

sacharosy (pH 4,0) se lyofilizují. Lyofilizované formulace se poté uchovávají při teplotě 40 °C a jejich stabilita se měří v průběhu 8 týdnů. Sacharosa a trehalosa jsou obvykle stabilizační prostředky používané v lyofilizovaných směsích. Hladina 9 % těchto látek se používá tak, aby rekonstituovaná formulace byla isotonická s tělesnými tekutinami. Pro minimalizaci iontové síly formulací a tedy množství agregovaného IFN- β -1b se množství pufru udržuje na minimální hladině. Proto mají všechny pufrы koncentraci 5 mM.

Obvyklé podmínky uchovávání pro proteinové farmaceutické přípravky jsou často 5 °C. Avšak zrychlené podmínky působení teploty se často používají při studiích prostředků pro zvýšení rychlosti degradace konkrétního prostředku, takže lze relevantní údaje o stabilitě obdržet v kratším časovém období. V tomto experimentu se používá teplota 40 °C pro nucenou degradaci IFN- β -1b ve formulacích prostých HSA. Výsledky koncentračních měření a analýza vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií s reverzními fázemi znázorňují obrázky 12 a 13. Tyto výsledky ukazují, že dokonce ani při zvýšených teplotách nevykazují tyto formulace IFN- β -1b žádné detekovatelné změny v průběhu 8 týdenní studie.

Příklad 4

Stabilita lyofilizovaných prostředků s obsahem IFN- β -1b prostých HSA za přítomnosti trehalosy za podmínek uchovávání v reálném času

I když se proteinová léčiva obvykle skladují při teplotě 5 °C, je vhodné mít produkt stabilní při teplotě místnosti (25 °C až 30 °C). V tomto experimentu se lyofilizují prostředky s obsahem 9 % trehalosy (5 mM glycin pH 3 nebo

5 mM kyselina aspartová pH 4).. Koncentrace trehalosy 9 % se užívá proto, aby byl rekonstituovaný přípravek isotonický s tělesnými tekutinami. Přípravky se uchovávají při teplotě 5 °C a 30 °C a jejich stabilita se měří v průběhu 9 měsíců. Výsledky koncentračních měření a analýza vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií s reverzními fázemi znázorňují obrázky 14 a 15. Tyto výsledky ukazují, že ani při teplotě 30 °C tyto přípravky s obsahem IFN- β -1b nevykazují detekovatelné změny v průběhu 9 měsíců studie.

Příklad 5

Stabilita kapalných přípravků s obsahem IFN- β -1b prostých HSA za zrychlených podmínek působení teploty

Stabilita přípravků s obsahem IFN- β -1b prostých HSA při pH 3,0 až 4,0 se rovněž zjišťuje v kapalném stavu. Kompozice přípravků jsou stejné jako v příkladu 3 [9 % trehalosy (pH 3,0 a pH 4,0) nebo 9 % sacharosy pH 4,0]. Pro minimalizaci iontové síly přípravků, čímž se též minimalizuje množství agregovaného IFN- β -1b, se množství pufru udržuje na minimální hladině (5 mM). Kapalně prostředky se ukládají při teplotě 30 °C a jejich stabilita se měří v průběhu 9 týdnů. Obvyklé skladovací podmínky kapalných proteinových prostředků odpovídají teplotě 5 °C. Proto teplota 30 °C představuje zrychlené podmínky vlivu teploty pro zvýšení rychlosti degradace IFN- β -1b. Výsledky na obrázku 16 (měření koncentrací) a 17 (analýza vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií s reverzními fázemi) nevykazují žádné detekovatelné změny v přípravcích v průběhu 9 týdnů. Tyto výsledky ukazují, že za těchto podmínek je IFN- β -1b stabilní v průběhu celé studie.

Příklad 6

Stabilita kapalných přípravků s obsahem IFN- β -1b prostých HSA za podmínek skladování v reálném času

V tomto experimentu se zkoumají kapalně prostředky obsahující 9 % trehalosy (5 mM glycin, pH 3 nebo 5 mM kyselina aspartová, pH 4) nebo 9 % sacharosy (5 mM glycin, pH 3 nebo 5 mM kyselina aspartová, pH 4) za podmínek reálného času skladování při teplotě 5 °C. Prostředky se plní do lahviček a jejich stability se měří v průběhu 9 měsíců. Výsledky měření koncentrací a analýzy vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií s reverzními fázemi znázorňují obrázky 18 a 19. Tyto výsledky ukazují, že v těchto prostředcích je IFN- β -1b stabilní v průběhu 9 měsíců této studie.

Příklad 7

Trehalosa je vhodnější než sacharosa jako neiontový prostředek pro úpravu osmotického tlaku v prostředku IFN- β -1b

V tomto experimentu se připraví prostředky obsahující 9 % trehalosy (5 mM glycin pH 3 nebo 5 mM kyselina aspartová pH 4) a 9 % sacharosy (5 mM glycin pH 3 nebo 5 mM kyselina aspartová pH 4) a plní se do lahviček v kapalně formě a lahvičky se stejným prostředkem se lyofilizují. Jejich stability se měří za zrychlených podmínek teplotního vlivu, které jsou často schopné poskytnout předpověď rozmezí stability formulací daného proteinu. Kapalně přípravky se ukládají při teplotě 30 °C po dobu 9 týdnů a lyofilizované přípravky při teplotě 40 °C po dobu 8 týdnů. Výsledky koncentračních měření ukazuje obrázek 20 (kapalina) a obrázek 21 (lyofilizovaná látka). Tyto výsledky ukazují, že formulace při pH 3

obsahující sacharosu vykazují patrný vzrůst koncentrace. Tento vzrůst koncentrace je následkem hydrolýzy, sacharosy při nízkém pH s tvorbou redukujících cukrů, která vede k neenzymatickému zhnědnutí (to jest Maillardova reakce) prostředků. Trehalosa je mnohem resistantnější vůči hydrolýze a proto se v těchto prostředcích preferuje před sacharosou [viz O'Brien Science 61, 679-682 (1996)].

Příklad 8

Odstranění SDS a prostředky obsahující IFN- β -1b s použitím vysrážení guanidin-hydrochloridem

Purifikovaný IFN- β -1b (1 litr 1,91 mg/ml v 0,4% SDS, 50 mM acetátového pufru, pH 5,5) se uchovává při teplotě 5 °C. Během uchovávání se část SDS vysráží. 250 ml této látky (477,5 mg) se smísí s 229 g guanidin-hydrochloridu (6 M, celkový objem 400 ml) a míchá při teplotě místnosti po dobu 15 min s použitím míchačky s magnetickou tyčkou. 6 M roztok guanidin-hydrochlorid/protein se poté zfiltruje pomocí Sartobran^R P Capsule (velikost póru 0,45 μ m) pro odstranění vysráženého SDS. Koncentrace proteinu podle měření v ultrafialovém světle při vlnové délce 280 nm je 1,02 mg/ml. Výtěžek proteinu je 406 mg neboli 85 %.

400 ml kapaliny zpracované guanidin-hydrochloridem se koncentruje s použitím diafiltračního systému Millipore^R Labscale^R TFF (Millipore, Inc.) dvěma polysulfonovými membránami Pellicon^R XL Biomax^R 0,1 cm² 10 kD (Millipore, Inc.). Objem po tomto zkoncentrování je 37 ml s koncentrací proteinu 10,3 mg/ml pro výtěžek po koncentraci 381 mg neboli 93 %.

Pomocí pipety pro přenos se 10 ml (103 mg) koncentrovaného roztoku guanidin-hydrochlorid/protein postupně přidává do 590 ml 5 mM glycinu, pH 3,2. Pufr se rychle míchá pomocí magnetické tyčky a do vířící kapaliny se přímo přidá roztok proteinu. Toto zředění 60 x 6 M roztoku guanidin-hydrochlorid/protein poskytuje 0,1 M roztok guanidin-hydrochlorid/protein při koncentraci 0,17/ml. Těchto 600 ml se přenesse do diafiltrační jednotky velikosti 500 ml se dvěma polysulfonovými membránami Pellicon^R II 10 kD, 0,1 m². Tento roztok se nejprve zkoncentruje zhruba na 400 ml do koncentrace proteinu 0,23/ml a následně podrobí diafiltraci proti 9 výěnám objemu (3,6 litrů) 5 mM glycinu při pH 3,2. Konečný diafiltrát (402 ml) se měří v ultrafialovém světle při vlnové délce 280 nM pro konečnou koncentraci proteinu 0,23 mg/ml s výtěžkem 92,46 mg, 90 % pro diafiltrační krok a s celkovým výtěžkem 72 % rozpustného proteinu pro proces purifikace.

Příklad 9

Stabilita kapalných prostředků s obsahem IFN- β -1b prostých HSA obsahujících mannitol jako prostředek pro úpravu osmotického tlaku

V tomto experimentu se zkoumají kapalně prostředky obsahující 5 mM roztok kyseliny aspartové a 5 % mannitolu za podmínek skladování v reálném čase při teplotě 5 °C. Připraví se tři oddělené přípravky (označené přípr. A, přípr. B a přípr. C na obrázcích) z jedné dávky IFN- β -1b prosté HAS a naplní se do lahviček. Lahvičky se poté uchovávají při teplotě 5 °C a stabilita prostředků se měří po dobu 6 měsíců. Výsledky koncentračních měření a analýzy vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií s reverzními fázemi ukazují

obrázky 22 a 23. Výsledky prokazují, že v těchto prostředcích s obsahem IFN- β -1b nenastávají žádné detekovatelné změny v průběhu 6 měsíců studie.

Veškeré publikace a patentové přihlášky citované v popisu odpovídají úrovni znalostí těch, kteří mají zkušenost v oboru, kterým je tento vynález určen. Veškeré publikace a patentové přihlášky se zde zahrnují formou odkazu ve stejném rozsahu, jako kdyby byla každá jednotlivá publikace či patentová přihláška specificky a jednotlivě určená pro inkorporaci formou odkazu. Podkapitoly popisu přihlášky se zahrnují pouze pro snadný přehled tohoto dokumentu a neuvažují se žádným způsobem jako omezení obsahu tohoto dokumentu.

Vynález se popisuje do určitých podrobností pro ilustraci a s použitím příkladů za účelem jasnosti pochopení, avšak je zřejmé, že v rámci tohoto vynálezu lze provádět určité změny a modifikace.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Stabilizovaný farmaceutický prostředek prostý HSA, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje v podstatě monomerní interferon- β (IFN- β) nebo jeho biologicky aktivní variantu solubilizovaný v prostředí o nízké iontové síle, kde tímto prostředkem o nízké iontové síle je roztok obsahující pufr v množství dostatečném k udržování pH této kompozice v rozmezí + nebo - 0,5 jednotek udaného pH, kde udané pH je zhruba 3,0 až zhruba 5,0 a tento prostředek má iontovou sílu, která nepřevyšuje zhruba 60 mM.

2. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace pufru je zhruba 1 mM až zhruba 30 mM.

3. Kompozice podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace pufru je zhruba 1 mM až zhruba 10 mM.

4. Kompozice podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace pufru je zhruba 2 mM až zhruba 7 mM.

5. Kompozice podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace pufru je zhruba 2 mM až zhruba 5 mM.

6. Kompozice podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace pufru je zhruba 5 mM.

7. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že udané pH je zhruba 3,0 a pufrem je glycin.

8. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že udané pH je zhruba 4,0 a pufrem je kyselina aspartová.

9. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že udané pH je zhruba 5,0 a pufrem je sukcinát sodný.

10. Kompozice podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že udané pH je zhruba 3,0 a pufrem je glycin.

11. Kompozice podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že udané pH je zhruba 4,0 a pufrem je kyselina aspartová.

12. Kompozice podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že udané pH je zhruba 5,0 a pufrem je sukcinát sodný.

13. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde se tato vysušená forma volí z případu lyofilizované formy, formy vysušené na vzduchu a formy získané sušením ve spreji.

14. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

15. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje určité množství neiontového prostředku pro úpravu osmotického tlaku, které je dostatečné k tomu, aby byla tato kompozice isotonická, kde tímto neiontovým prostředkem pro úpravu osmotického tlaku je trehalosa.

16. Kompozice podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace trehalosy je zhruba 9 % (hmotnost/objem).

17. Kompozice podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde vysušená forma se volí z případů lyofilizované formy, formy sušené na vzduchu a formy sušené ve spreji.

18. Kompozice podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

19. Kompozice podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje určité množství neiontového prostředku pro úpravu osmotického tlaku, které je dostatečné k tomu, aby byla tato kompozice isotonická, kde tímto neiontovým prostředkem k úpravě osmotického tlaku je trehalosa.

20. Kompozice podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace trehalosy je zhruba 9 % (hmotnost/objem).

21. Kompozice podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde vysušená forma se volí z případů lyofilizované formy, formy sušené na vzduchu a formy sušené ve spreji.

22. Kompozice podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

23. Kompozice podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje určité množství neiontového prostředku pro úpravu osmotického tlaku, které je dostatečné k tomu, aby byla tato kompozice isotonická, kde tímto neiontovým prostředkem k úpravě osmotického tlaku je trehalosa.

24. Kompozice podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace trehalosy je zhruba 9 % (hmotnost/objem).

25. Kompozice podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde vysušená forma se volí z případů lyofilizované formy, formy sušené na vzduchu a formy sušené ve spreji.

26. Kompozice podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

27. Kompozice podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje určité množství neiontového prostředku pro úpravu osmotického tlaku, které je dostatečné k tomu, aby byla tato kompozice isotonická, kde tímto neiontovým prostředkem k úpravě osmotického tlaku je trehalosa.

28. Kompozice podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace trehalosy je zhruba 9 % (hmotnost/objem).

29. Kompozice podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde vysušená

forma se volí z případů lyofilizované formy, formy sušené na vzduchu a formy sušené ve spreji.

30. Kompozice podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

31. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že IFN- β je polypeptid s aminokyselinovou sekvencí zralého nativního IFN- β nebo jeho biologicky aktivní varianta.

32. Prostředek podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se IFN- β připravuje rekombinantním způsobem.

33. Kompozice podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, že IFN- β je glykosylovaný nebo neglykosylovaný.

34. Kompozice podle nároku 33, v y z n a č u j í c í s e t í m, že IFN- β je neglykosylovaný lidský IFN- β (hIFN- β) nebo jeho biologicky aktivní mutein.

35. Kompozice podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tímto muteinem je hIFN- β_{ser17} .

36. Stabilizovaný farmaceutický prostředek prostý HSA v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje v podstatě monomerní interferon- β (IFN- β) nebo jeho biologicky aktivní variantu solubilizovaný v prostředí o nízké iontové síle, kde tímto prostředkem o nízké iontové síle je roztok, který obsahuje pufr zvolený z případů glycin, kyselina aspartová nebo sukcinát sodný o koncentraci zhruba 1 mM až zhruba 10 mM a tato kompozice má pH zhruba 3,0 až zhruba 5,0 a tento

prostředek má iontovou sílu, která nepřevyšuje zhruba 60 mM.

37. Kompozice podle nároku 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že IFN- β je rekombinantní lidský IFN- β (rhIFN- β) nebo jeho biologicky aktivní mutein.

38. Kompozice podle nároku 37, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rhIFN- β nebo jeho biologicky aktivní mutein je neglykosylovaný.

39. Kompozice podle nároku 38, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento mutein je hIFN- β_{ser17} .

40. Kompozice podle nároku 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace rhIFN- β je zhruba 0,01 mg/ml až zhruba 20,0 mg/ml.

41. Kompozice podle nároku 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že puforem je glycin, koncentrace glycinu je zhruba 5 mM a pH této kompozice je zhruba 3,0

42. Kompozice podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 9 % trehalosy (hmotnost/objem).

43. Kompozice podle nároku 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že puforem je kyselina aspartová, koncentrace kyseliny aspartové je zhruba 5 mM a pH této kompozice je zhruba 4,0.

44. Kompozice podle nároku 43, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje zhruba 9 % trehalosy (hmotnost/objem).

45. Kompozice podle nároku 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že pufrem je sukcinát sodný, koncentrace tohoto sukcinátu sodného je zhruba 5 mM a pH této kompozice je zhruba 5,0.

46. Kompozice podle nároku 45, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje zhruba 9 % trehalosy (hmotnost/objem).

47. Kompozice podle nároku 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde se tato vysušená forma volí z případu lyofilizované formy, formy vysušené na vzduchu a formy získané sušením ve spreji.

48. Kompozice podle nároku 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

49. Kompozice podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde se tato vysušená forma volí z případů lyofilizované formy, formy vysušené na vzduchu a formy získané sušením ve spreji.

50. Kompozice podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

51. Kompozice podle nároku 43, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde se tato vysušená forma volí z případů lyofilizované formy, formy vysušené na vzduchu a formy získané sušením ve spreji.

52. Kompozice podle nároku 43, v y z n a č u j í c í

s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

53.Kompozice podle nároku 45, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde se tato vysušená forma volí z případů lyofilizované formy, formy vysušené na vzduchu a formy získané sušením ve spreji.

54.Kompozice podle nároku 45, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

55.Kompozice podle nároku 42, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde se tato vysušená forma volí z případů lyofilizované formy, formy vysušené na vzduchu a formy získané sušením ve spreji.

56.Kompozice podle nároku 42, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

57.Kompozice podle nároku 44, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde se tato vysušená forma volí z případů lyofilizované formy, formy vysušené na vzduchu a formy získané sušením ve spreji.

58.Kompozice podle nároku 44, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

59. Kompozice podle nároku 46, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde se tato vysušená forma volí z případu lyofilizované formy, formy vysušené na vzduchu a formy získané sušením ve spreji.

60. Kompozice podle nároku 46, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

61. Stabilizovaný farmaceutický prostředek prostý HSA, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje v podstatě monomerní lidský interferon- β (IFN- β), nebo jeho biologicky aktivní mutein solubilizovaný v prostředí o nízké iontové síle, kde tento prostředek o nízké iontové síle je roztok obsahující glycin jako pufr, kde koncentrace tohoto pufru je zhruba 2 mM až zhruba 5 mM, tato kompozice má pH od zhruba 3,0 do zhruba 4,0 a tento prostředek má iontovou sílu nepřevyšující zhruba 40 mM.

62. Kompozice podle nároku 61, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rhIFN- β nebo jeho biologicky aktivní mutein je neglykosylovaný.

63. Kompozice podle nároku 62, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tímto muteinem je hIFN- β_{ser17} .

64. Kompozice podle nároku 63, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace tohoto pufru je zhruba 5 mM, pH je zhruba 3,0 a iontová síla nepřevyšuje zhruba 20 mM.

65. Kompozice podle nároku 61, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde se tato

vysušená forma volí z případů lyofilizované formy, formy vysušené na vzduchu a formy získané sušením ve spreji.

66. Kompozice podle nároku 61, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

67. Kompozice podle nároku 61, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje zhruba 9 % trehalosy (hmotnost/objem).

68. Stabilizovaný farmaceutický prostředek prostý HSA v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje v podstatě monomerní lidský interferon- β (IFN- β), nebo jeho biologicky aktivní mutein solubilizovaný v prostředí o nízké iontové síle, kde tento prostředek o nízké iontové síle je roztok obsahující glycin jako pufr, kde koncentrace tohoto pufru je zhruba 2 mM až zhruba 5 mM, tato kompozice má pH od zhruba 3,5 do zhruba 4,5 a tento prostředek má iontovou sílu nepřevyšující zhruba 40 mM.

69. Kompozice podle nároku 68, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rhIFN- β nebo jeho biologicky aktivní mutein je neglykosylovaný.

70. Kompozice podle nároku 69, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tímto muteinem je hIFN- β_{ser17} .

71. Kompozice podle nároku 68, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace tohoto pufru je zhruba 5 mM, pH je zhruba 3,0 a iontová síla nepřevyšuje zhruba 20 mM.

19.01.04

72. Kompozice podle nároku 68, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde se tato vysušená forma volí z případů lyofilizované formy, formy vysušené na vzduchu a formy získané sušením ve spreji.

73. Kompozice podle nároku 68, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

74. Kompozice podle nároku 68, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje zhruba 9 % trehalosy (hmotnost/objem).

75. Stabilizovaný farmaceutický prostředek prostý HSA v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje v podstatě monomerní lidský interferon- β (IFN- β), nebo jeho biologicky aktivní mutein solubilizovaný v prostředí o nízké iontové síle, kde tento prostředek o nízké iontové síle je roztok obsahující glycin jako pufr, kde koncentrace tohoto pufru je zhruba 2 mM až zhruba 5 mM, tato kompozice má pH od zhruba 4,5 do zhruba 5,0 a tento prostředek má iontovou sílu nepřevyšující zhruba 40 mM.

76. Kompozice podle nároku 75, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rhIFN- β nebo jeho biologicky aktivní mutein je neglykosylovaný.

77. Kompozice podle nároku 76, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tímto muteinem je hIFN- β_{ser17} .

78. Kompozice podle nároku 75, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace tohoto pufru je zhruba 5 mM, pH

je zhruba 5,0 a iontová síla nepřevyšuje zhruba 20 mM.

79. Kompozice podle nároku 75, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kapalně nebo vysušené formě, kde se tato vysušená forma volí z případů lyofilizované formy, formy vysušené na vzduchu a formy získané sušením ve spreji.

80. Kompozice podle nároku 75, v y z n a č u j í c í s e t í m, že představuje vodný nebo nevodný roztok, vodnou nebo nevodnou suspenzi nebo suchou práškovou formu, která je vhodná pro podání pacientovi plicní inhalací.

81. Kompozice podle nároku 75, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje zhruba 9 % trehalosy (hmotnost/objem).

82. Způsob zvyšování rozpustnosti interferonu- β (IFN- β) nebo jeho biologicky aktivní varianty ve farmaceutické kompozici bez přítomnosti lidského serumalbuminu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tato kompozice připraví s prostředkem o nízké iontové síle, kde tento prostředek o nízké iontové síle je roztok, který obsahuje pufr v množství dostatečném pro udržování pH této kompozice v mezích $\pm 0,5$ jednotek udaného pH, kde toto udané pH je zhruba 3,0 až zhruba 5,0, tento prostředek má iontovou sílu, která nepřevyšuje zhruba 60 mM, a IFN- β nebo jeho biologicky aktivní varianta se uvede do této kompozice.

83. Způsob podle nároku 82, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace pufru je zhruba 1 mM až zhruba 30 mM.

84. Způsob podle nároku 83, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace pufru je zhruba 2 mM až zhruba 5 mM.

85. Způsob podle nároku 84, v y z n a č u j í c í s e t í m, že udané pH je zhruba 3,0 a pufr je glycin.

86. Způsob podle nároku 84, v y z n a č u j í c í s e t í m, že udané pH je zhruba 4,0 a pufr je kyselina aspartová.

87. Způsob podle nároku 84, v y z n a č u j í c í s e t í m, že udané pH je zhruba 5,0 a pufr je sukcinát sodný.

88. Způsob podle nároku 82, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tato kompozice dále obsahuje neiontový prostředek pro úpravu osmotického tlaku v množství dostatečném k tomu, aby byla tato kompozice isotonická, kde tímto neiontovým prostředkem pro úpravu osmotického tlaku je trehalosa.

89. Způsob podle nároku 82, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje krok přípravy sušené formy této kompozice, kde tato sušená forma se tvoří ze skupiny zahrnující lyofilizovanou formu, formu sušenou na vzduchu a formu získanou sušením ve spreji.

90. Způsob podle nároku 82, v y z n a č u j í c í s e t í m, že touto kompozicí je vodný nebo nevodný roztok, vodná nebo nevodná suspenze nebo suchá prášková forma, která je vhodná pro podávání pacientovi plicní inhalací.

91. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se připraví podle způsobu nároku 82.

92. Způsob přípravy farmaceutické kompozice prosté HSA obsahující v podstatě monomerní interferon- β (IFN- β) v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje přípravu této kompozice s prostředkem o nízké iontové síle, kde tento

prostředek o nízké iontové síle je roztok obsahující pufr v množství dostatečném pro udržování pH této kompozice v mezích plus nebo minus 0,5 jednotek udaného pH, kde toto udané pH je zhruba 3,0 až zhruba 5,0, tento prostředek má iontovou sílu nepřevyšující zhruba 60 mM, a zavedení IFN- β nebo jeho biologicky aktivní varianty do této kompozice.

93. Způsob podle nároku 92, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace pufru je zhruba 1 mM až zhruba 30 mM.

94. Způsob podle nároku 93, v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace pufru je zhruba 2 mM až zhruba 5 mM.

95. Způsob podle nároku 94, v y z n a č u j í c í s e t í m, že udané pH je zhruba 3,0 a pufrem je glycin.

96. Způsob podle nároku 94, v y z n a č u j í c í s e t í m, že udané pH je zhruba 4,0 a pufrem je kyselina aspartová.

97. Způsob podle nároku 94, v y z n a č u j í c í s e t í m, že udané pH je zhruba 5,0 a pufrem je sukcinát sodný.

98. Způsob podle nároku 92, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tato kompozice dále obsahuje neiontový prostředek pro úpravu osmotického tlaku v množství dostatečném k tomu, aby byla tato kompozice isotonická, kde tímto neiontovým prostředkem pro úpravu osmotického tlaku je trehalosa.

99. Způsob podle nároku 92, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje krok přípravy sušené formy této kompozice, kde tato sušená forma se tvoří ze skupiny zahrnující lyofilizovanou formu, formu sušenou na vzduchu a formu

získanou sušením ve spreji.

100. Způsob podle nároku 92, v y z n a č u j í c í s e t í m, že touto kompozicí je vodný nebo nevodný roztok, vodná nebo nevodná suspenze nebo suchá prášková forma, která je vhodná pro podávání pacientovi plicní inhalací.

101. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se připraví podle způsobu nároku 92.

102. Prostředek pro diagnózu, prevenci nebo léčení nemocí, které vykazují odpověď na léčbu interferonem- β (IFN- β), v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje farmaceutickou kompozici podle nároků 1, 36, 61, 68 nebo 75.

0.1. 8484

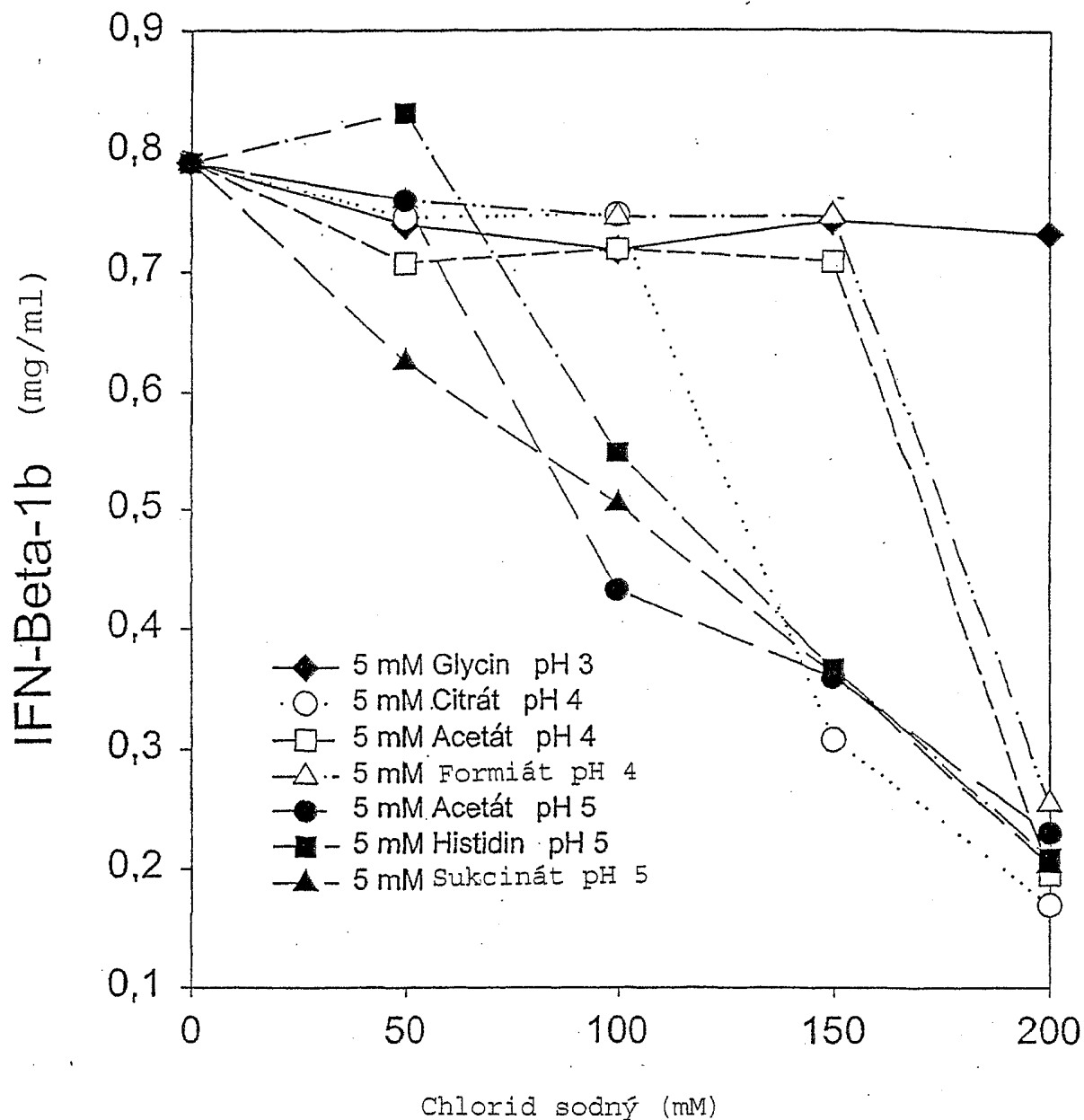
21.01.05

2005-2-35

1/24

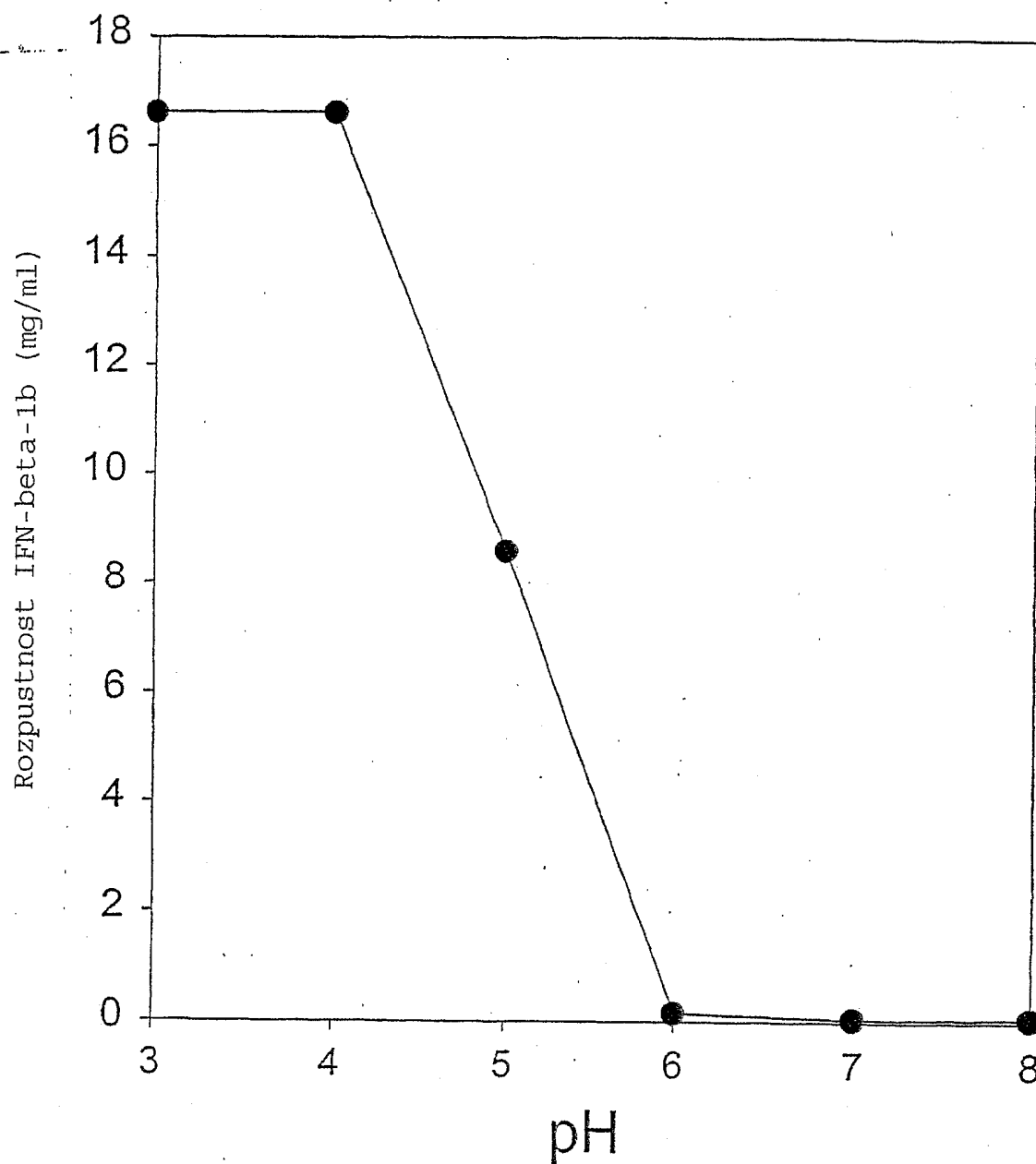
Obr. 1

Rozpustnost IFN-beta-1b v roztocích chloridu sodného



Obr. 2

Rozpustnost IFN-beta-1b v prostředcích o nízké iontové síle

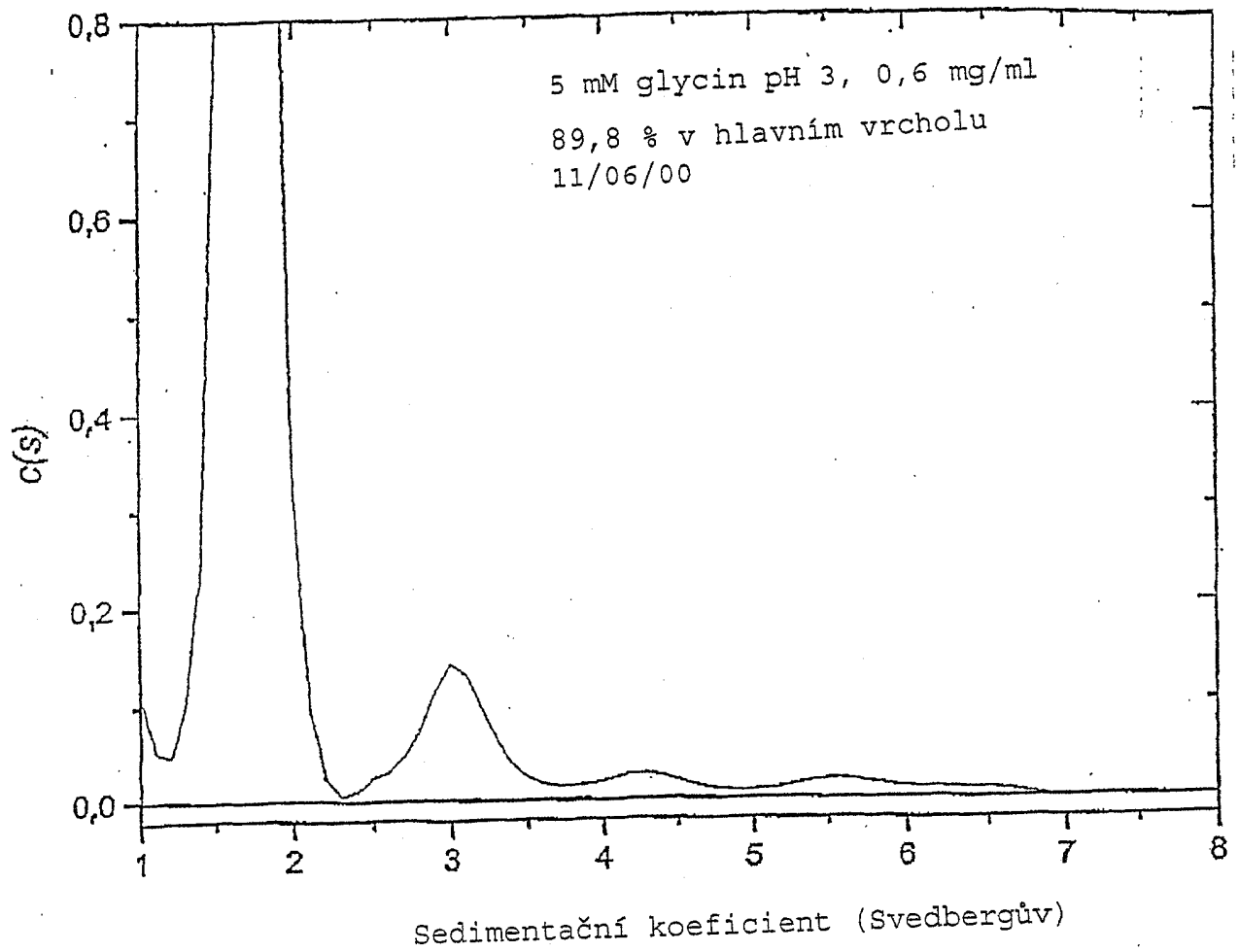


21.01.05

4/21

2001-27B

Obr. 3

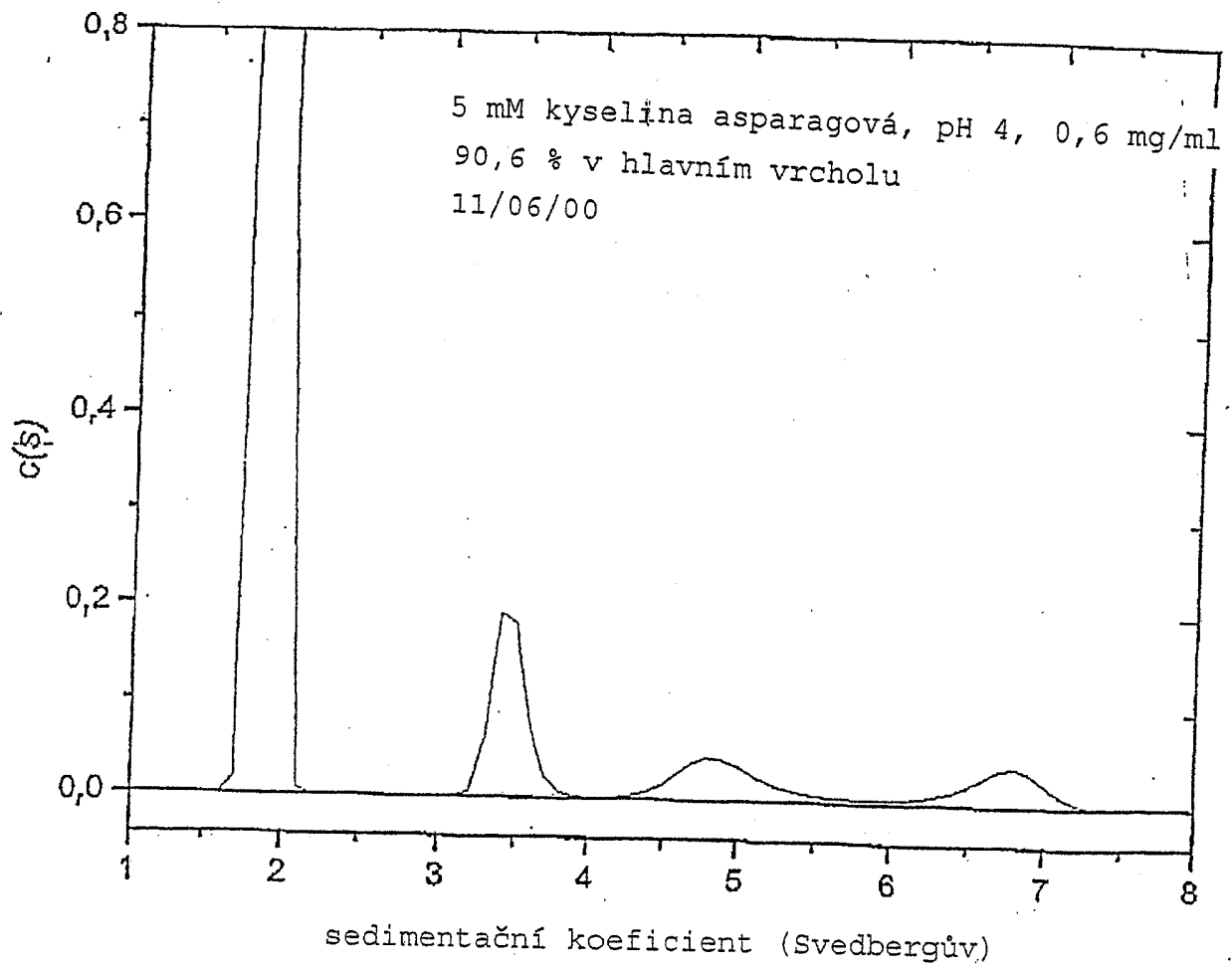


210105

7/23

2005-2785

Obr. 4

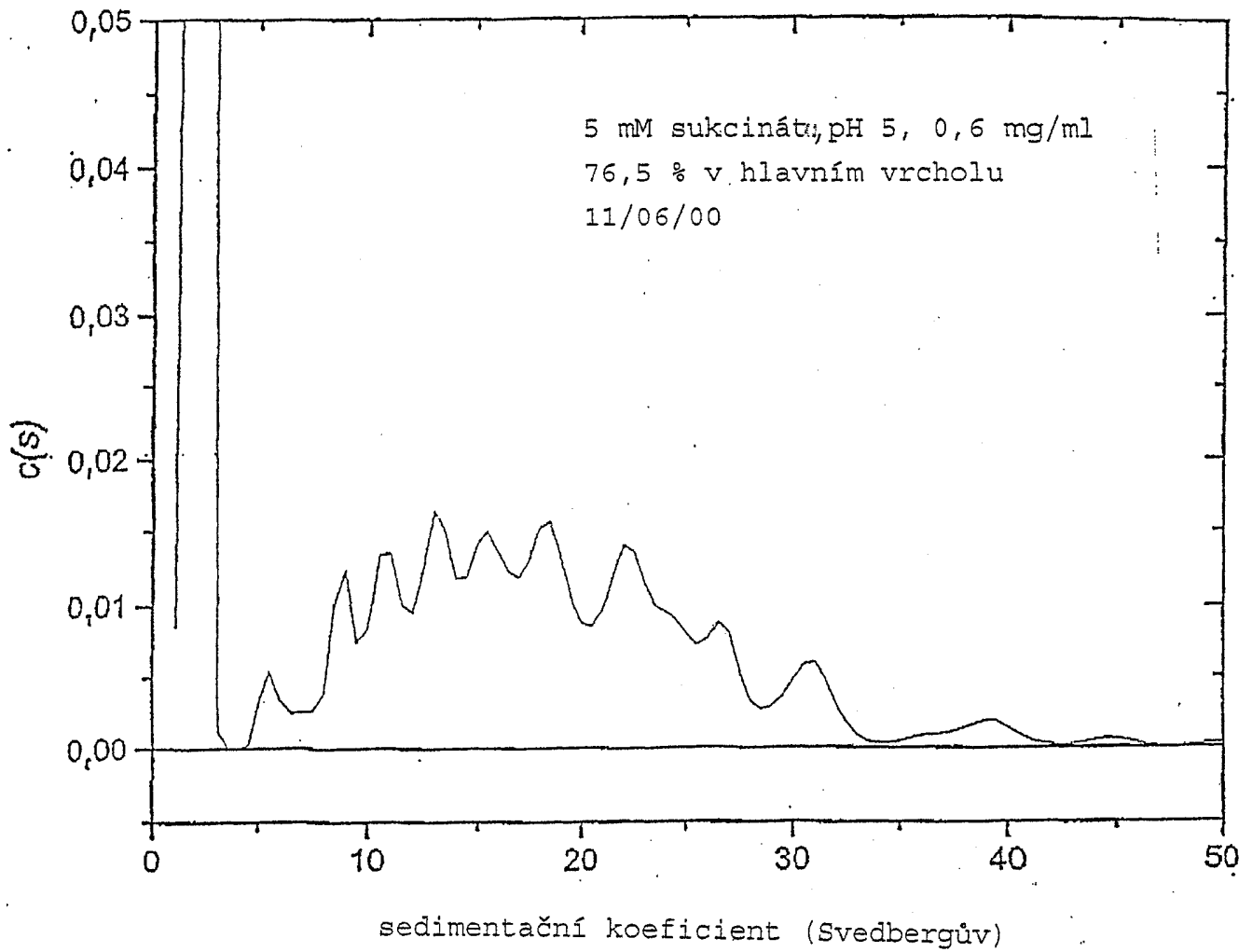


21.01.05

5/11

2001-2745

Obr. 5

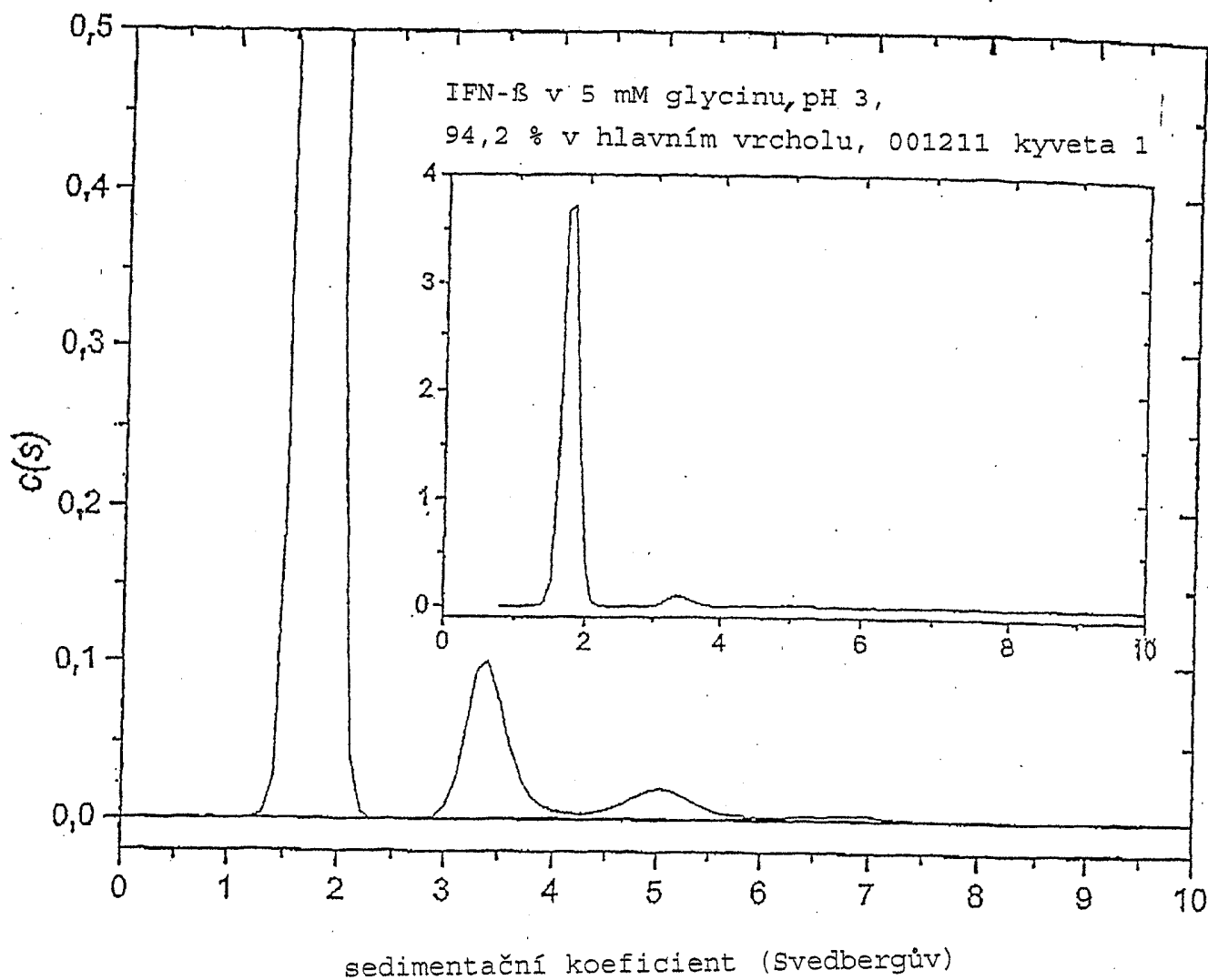


6/23

21.01.05

2003-2745

Obr. 6

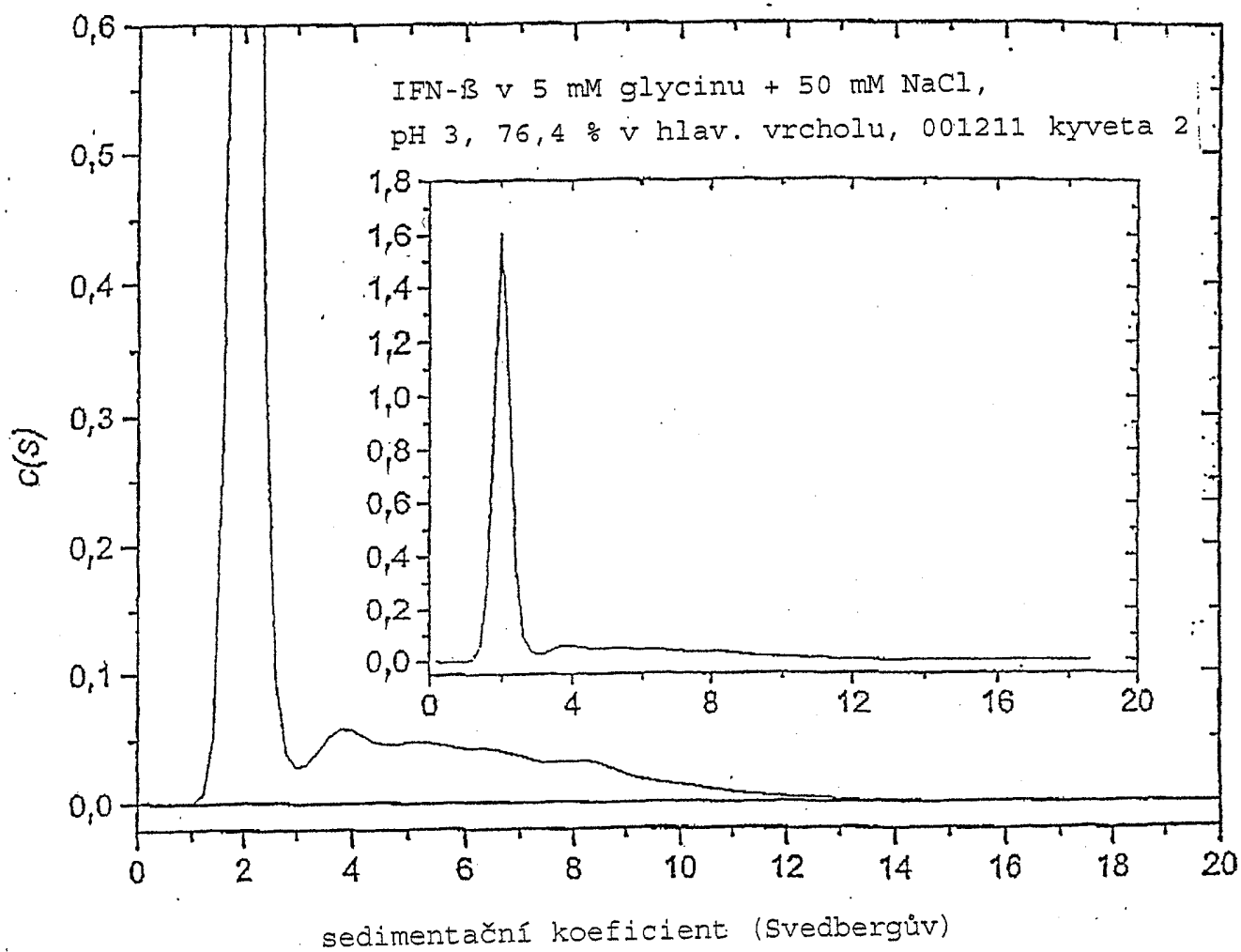


7/25

21.01.05

2003-2715

Obr. 7

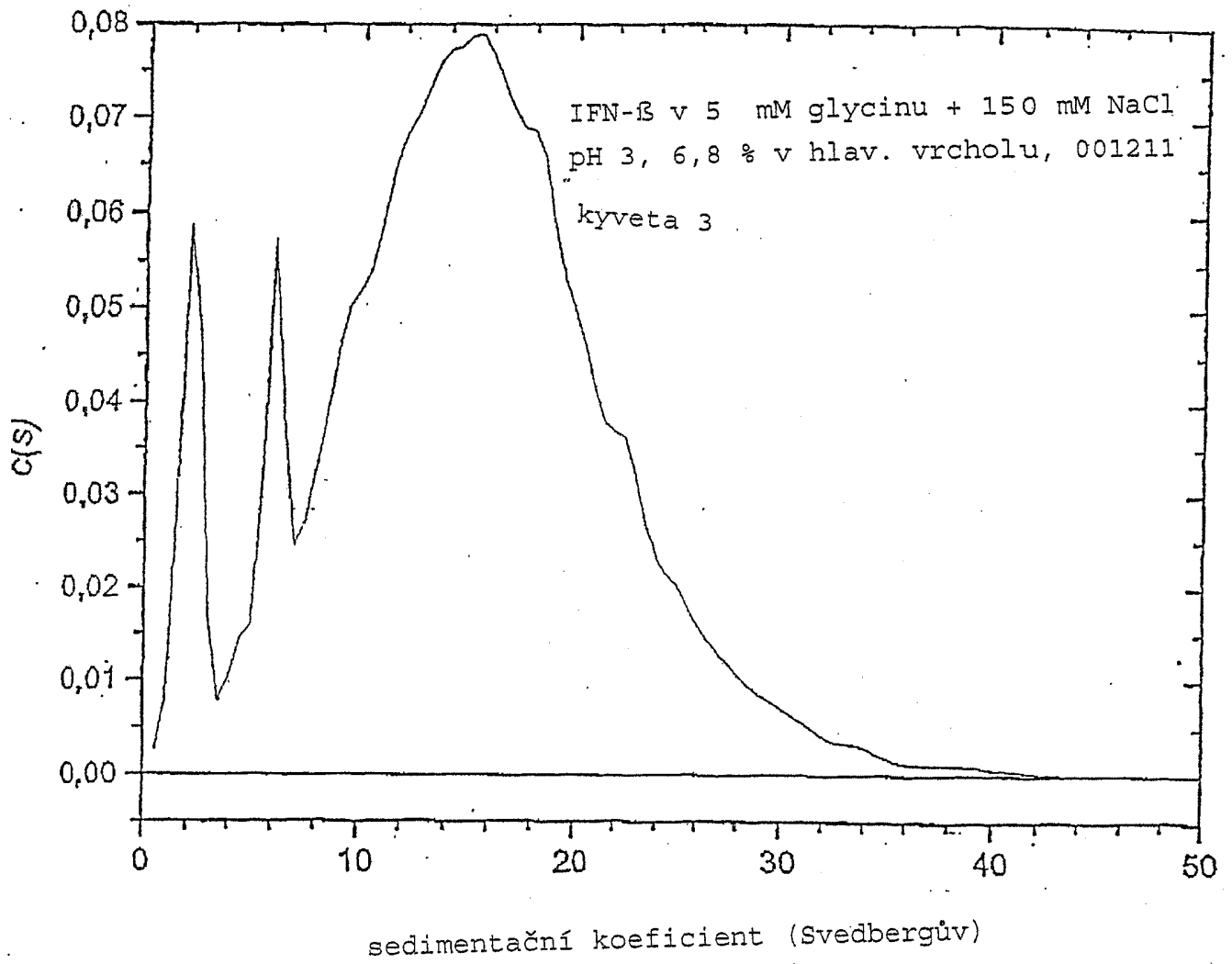


21.01.05

8/23

2001-2775

Obr. 8

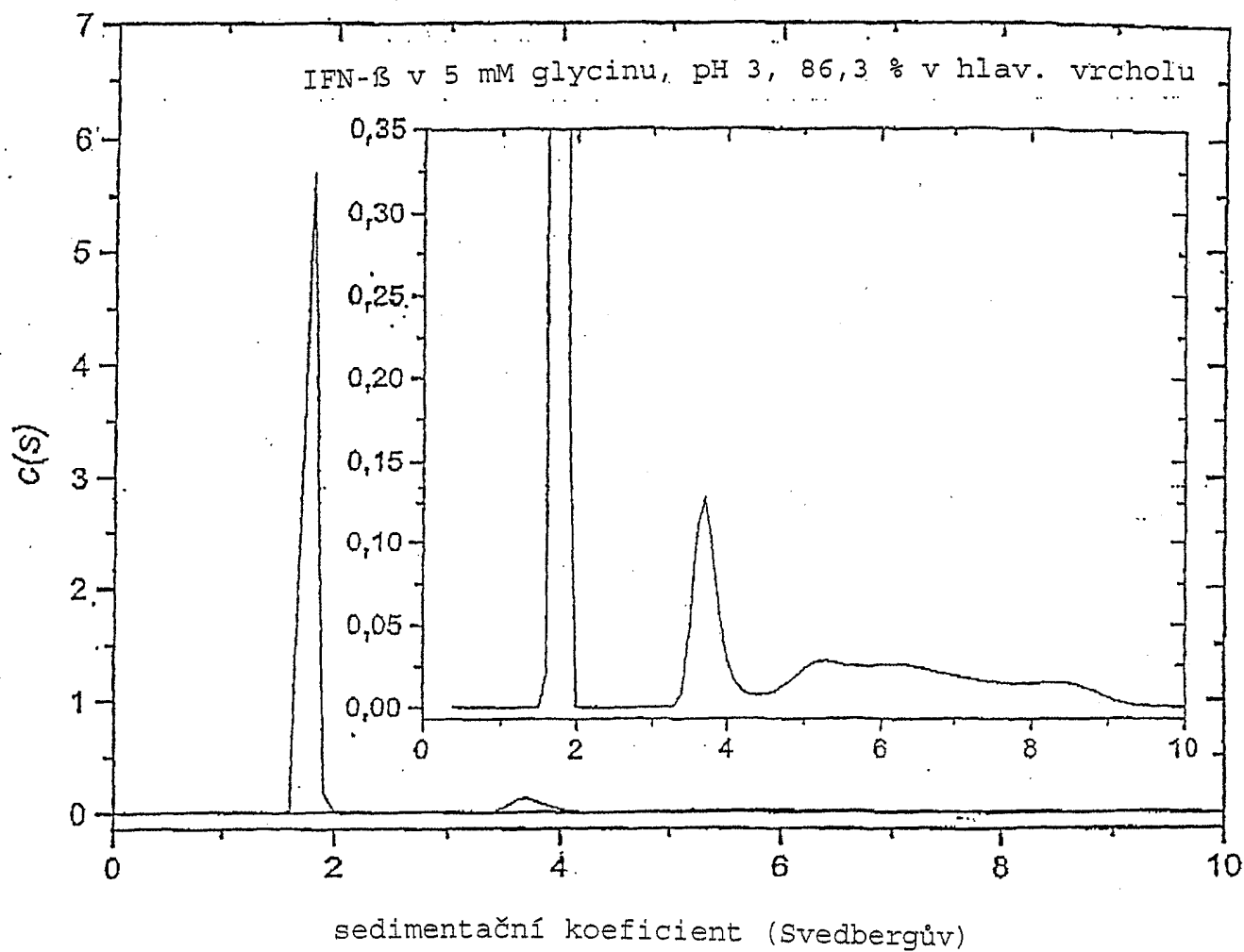


210105

9/23

2007-27/11

Obr. 9

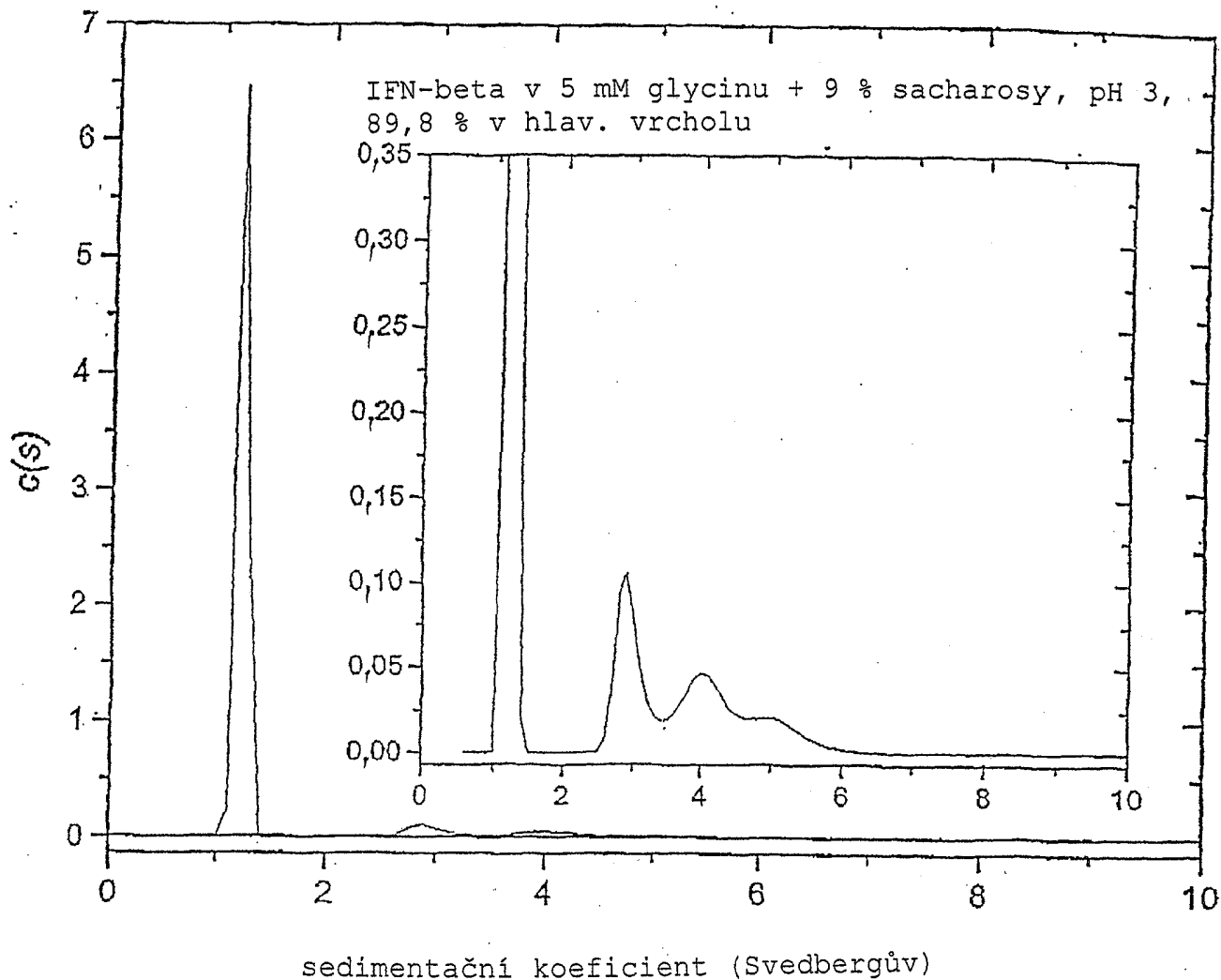


10/2

210105

2003-27-11

Obr. 10

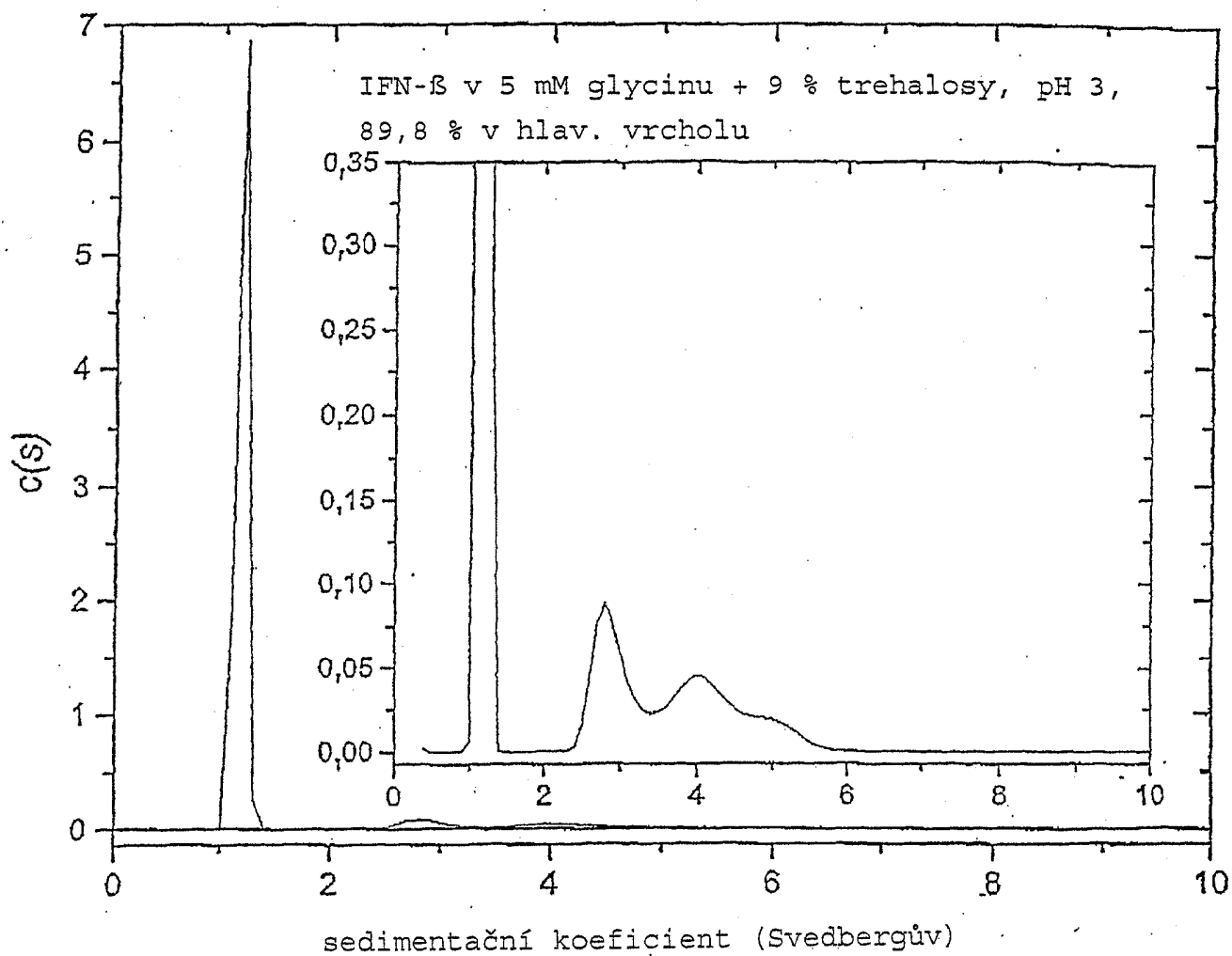


21.01.05

11/23

LOW-2735

Obr. 11



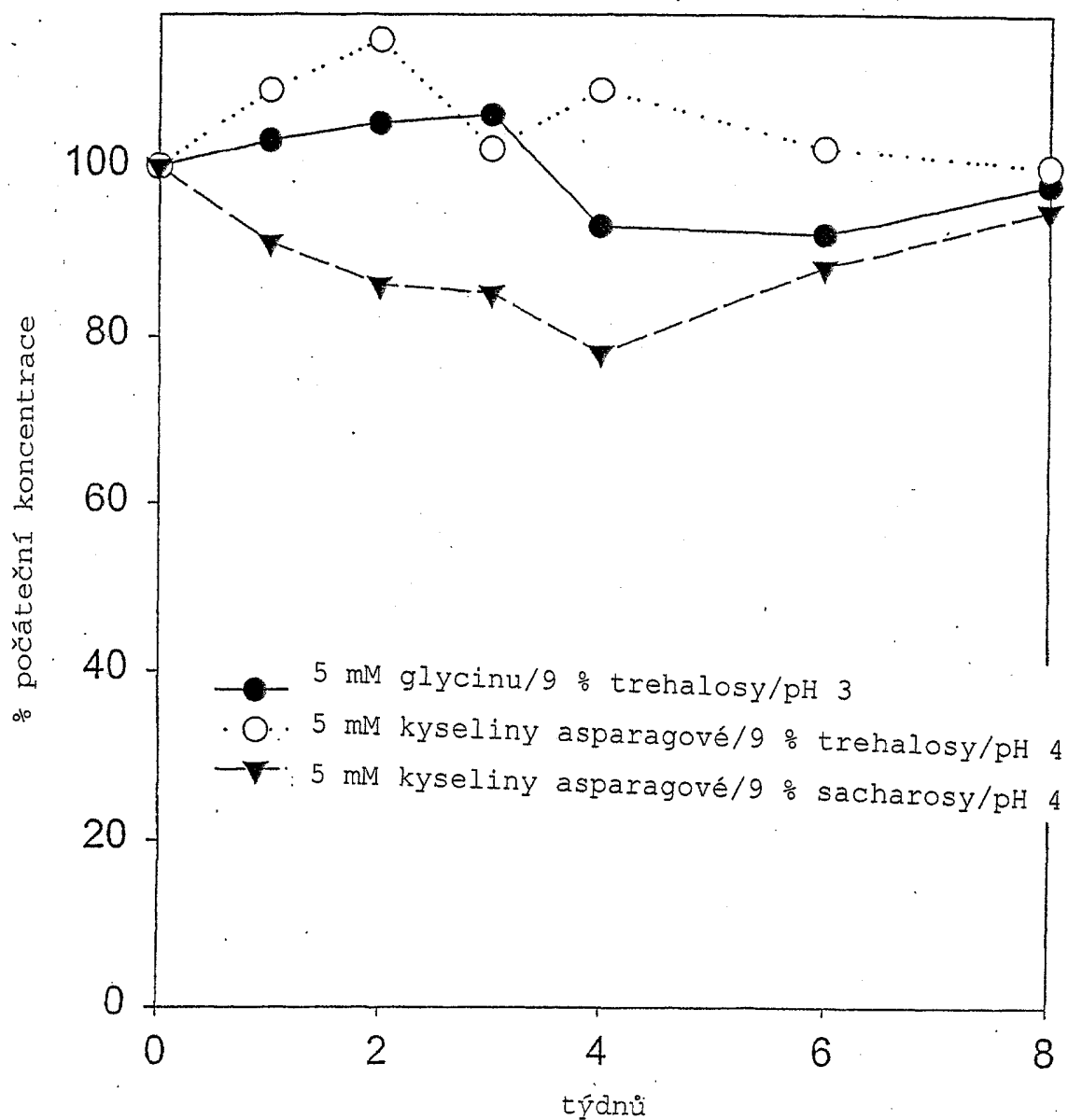
21.01.05

12/21

2003-2715

Obr. 12

Lyofilizované prostředky IFN-beta-1b, % počáteční
koncentrace, absorpce v ultrafialovém světle, 40 °C



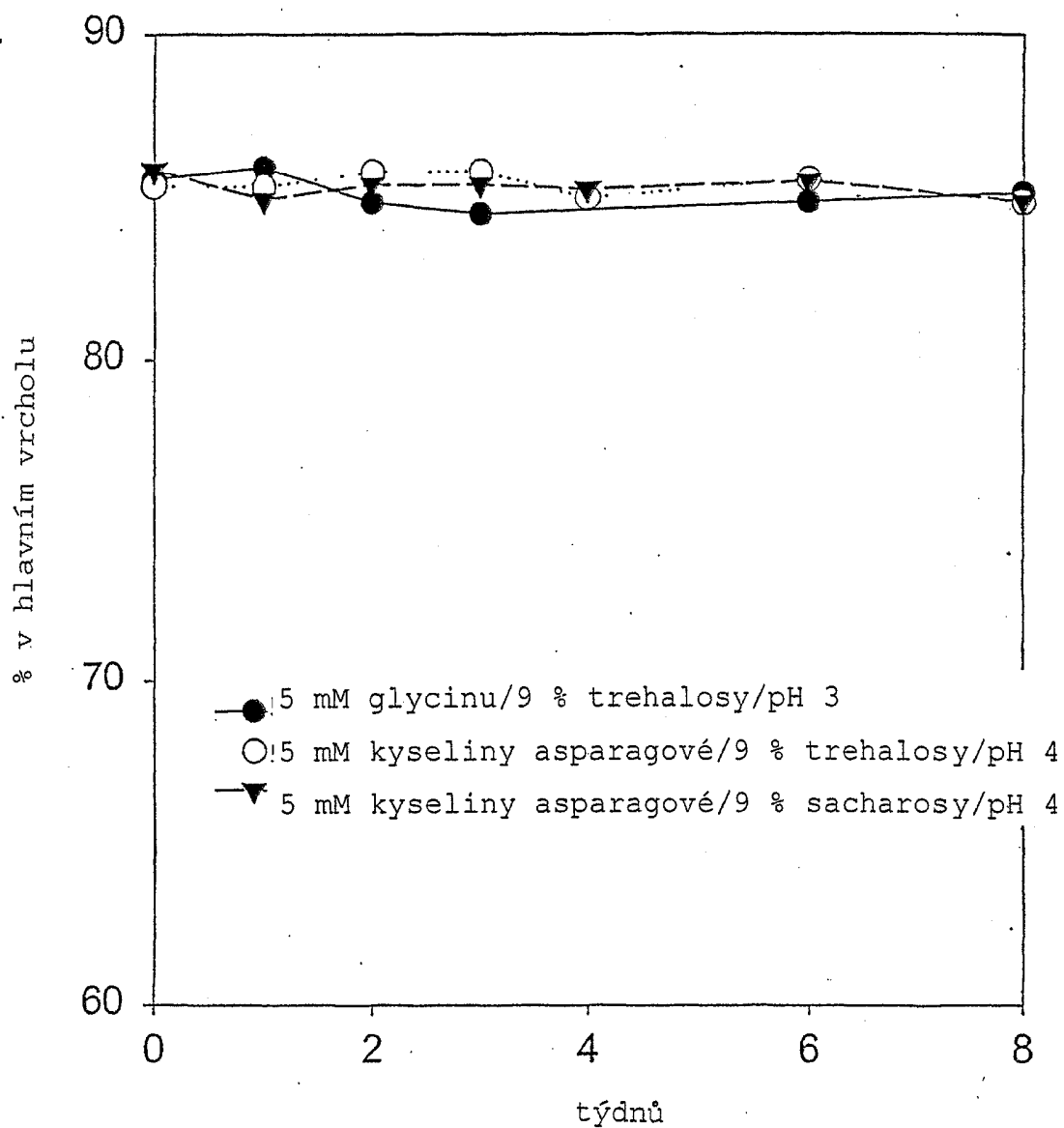
21.01.05

11/22

2001-2715

Obr. 13

Lyofilizované prostředky IFN-beta-1b, % v hlavním vrcholu,
vysokovýkonná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi,
40 °C



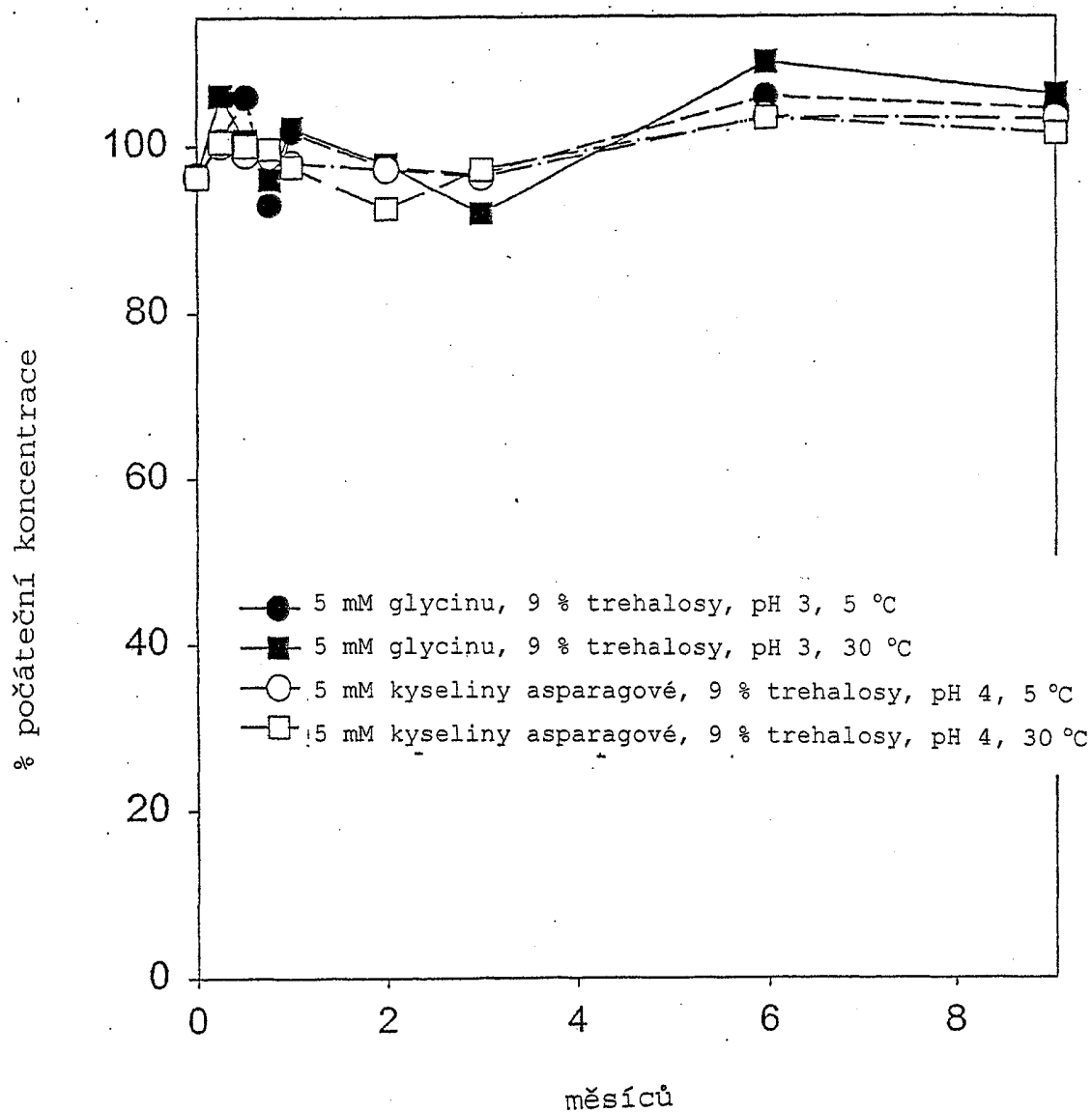
21.01.05

19/23

2001-2716

Obr. 14

Lyofilizované prostředky IFN-beta-1b, pH 3 a pH 4, %
počáteční koncentrace, spektroskopie v ultrafialovém světle

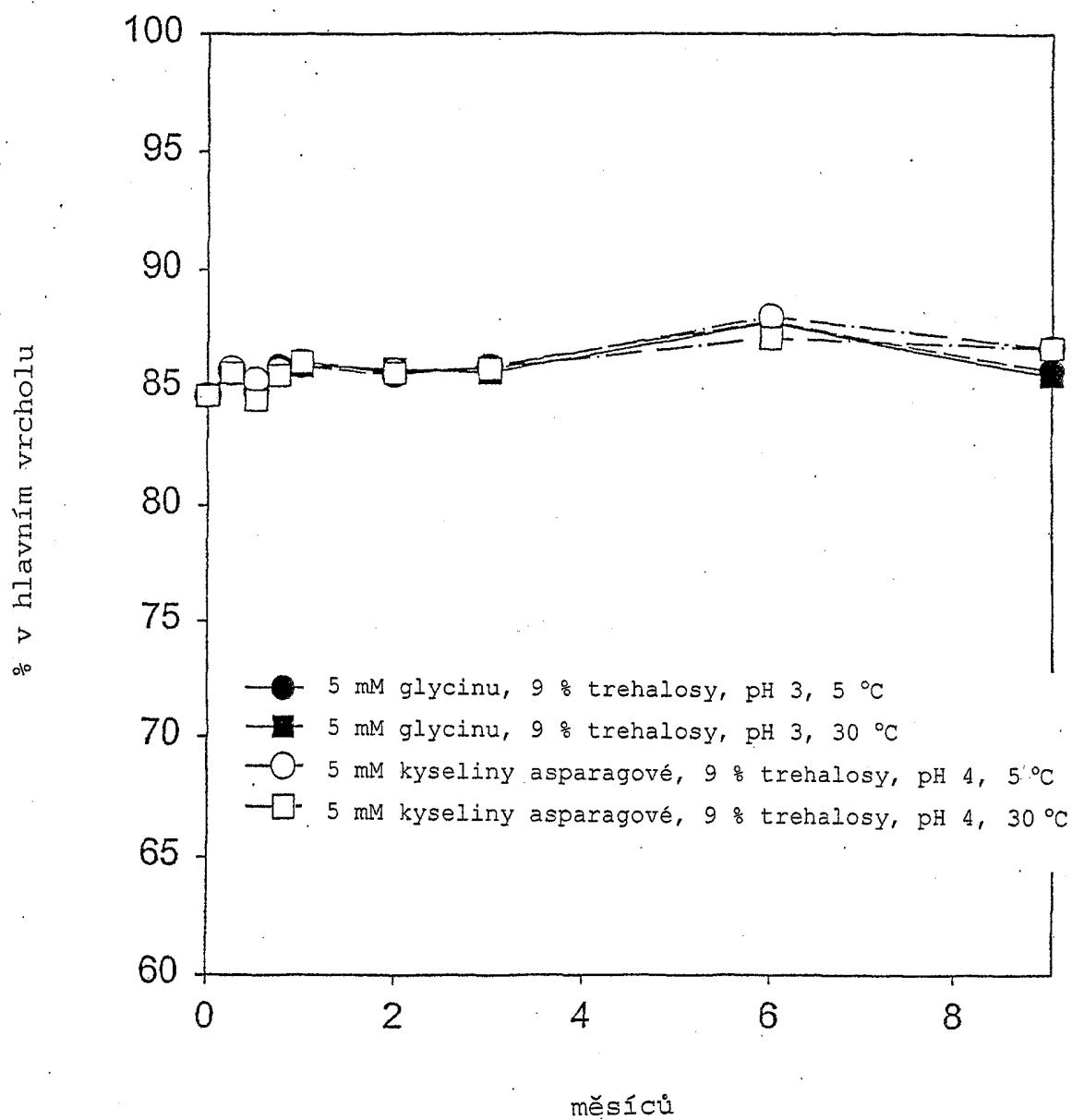


15/23

2003-2735

Obr. 15

Lyofilizované prostředky IFN-beta-1b, pH 3 a pH 4, %
v hlavním vrcholu, vysokovýkonná kapalinová chromato-
grafie s reverzními fázemi



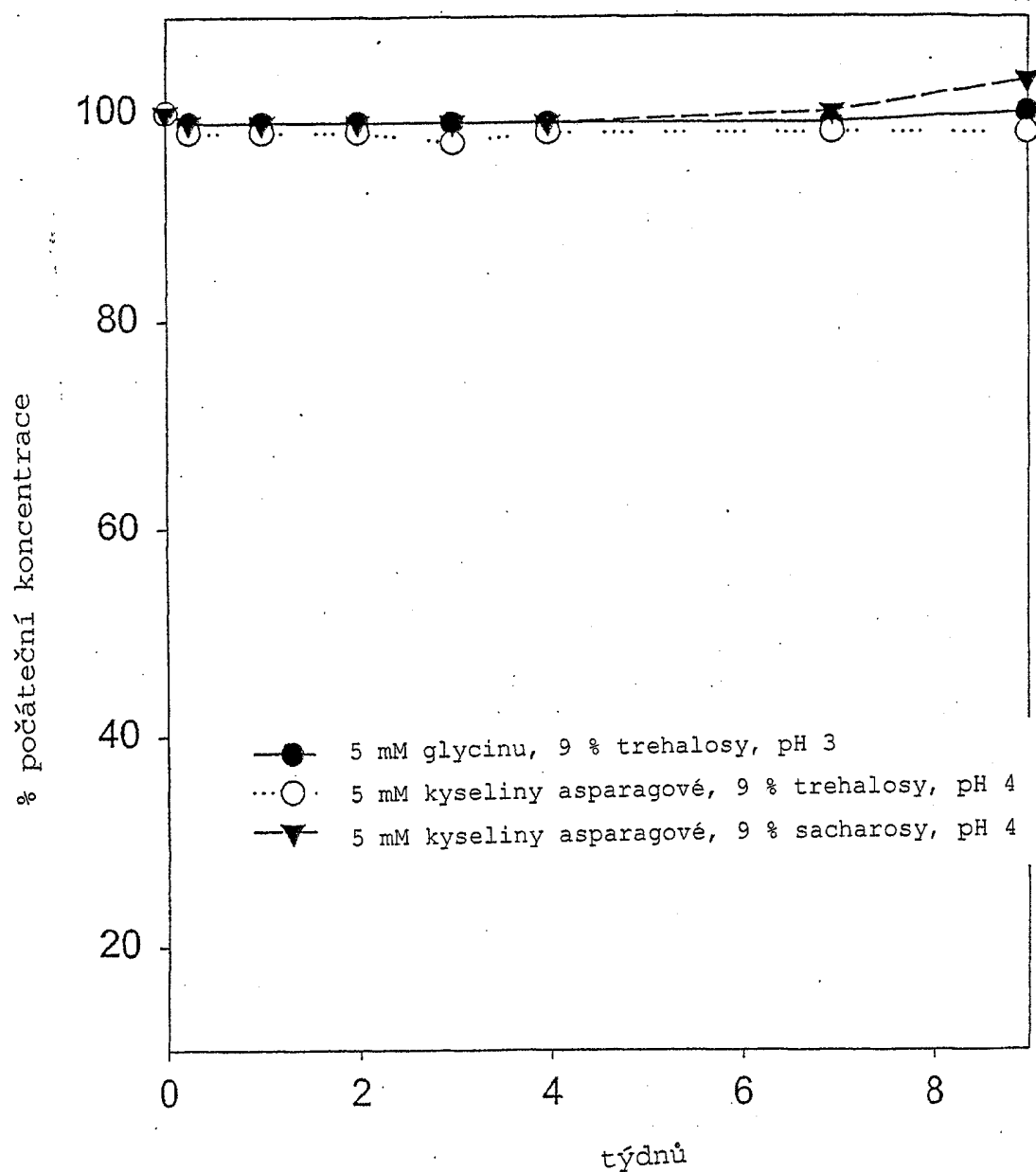
21.01.05

16/23

2003-2775

Obr. 16

Kapalné prostředky IFN-beta-1b, % počáteční koncentrace, absorbance v ultrafialovém světle, 30 °C



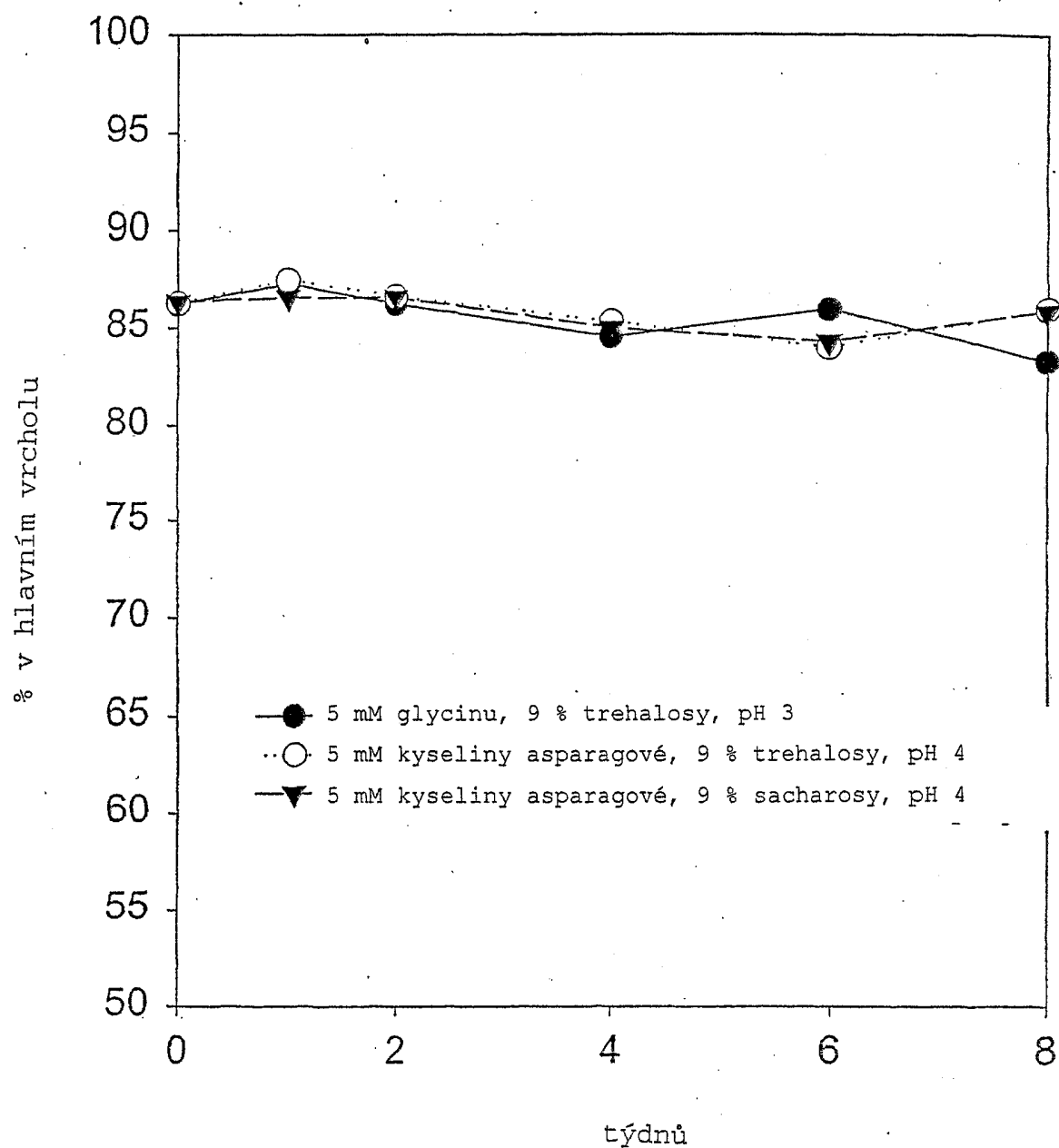
21.01.05

17/23

2001-2735

Obr. 17

Kapalné prostředky IFN-beta-1b, % v hlavním vrcholu, vysoko-
výkonná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi, 30 °C

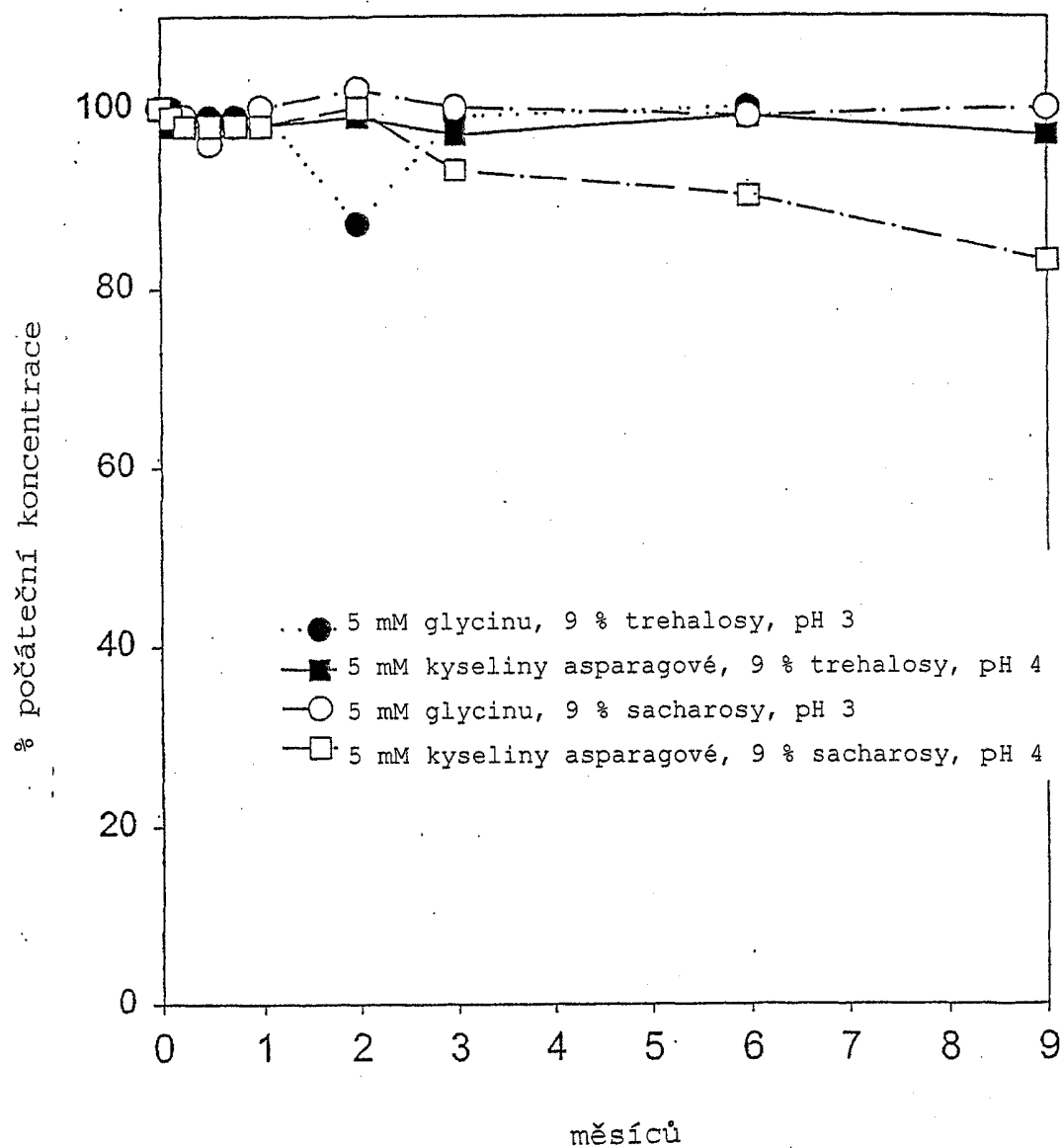


18/23

2003-2775

Obr. 18

Kapalné prostředky IFN-beta-1b v lahvičkách, % počáteční koncentrace, spektroskopie v ultrafialovém světle, 5 °C



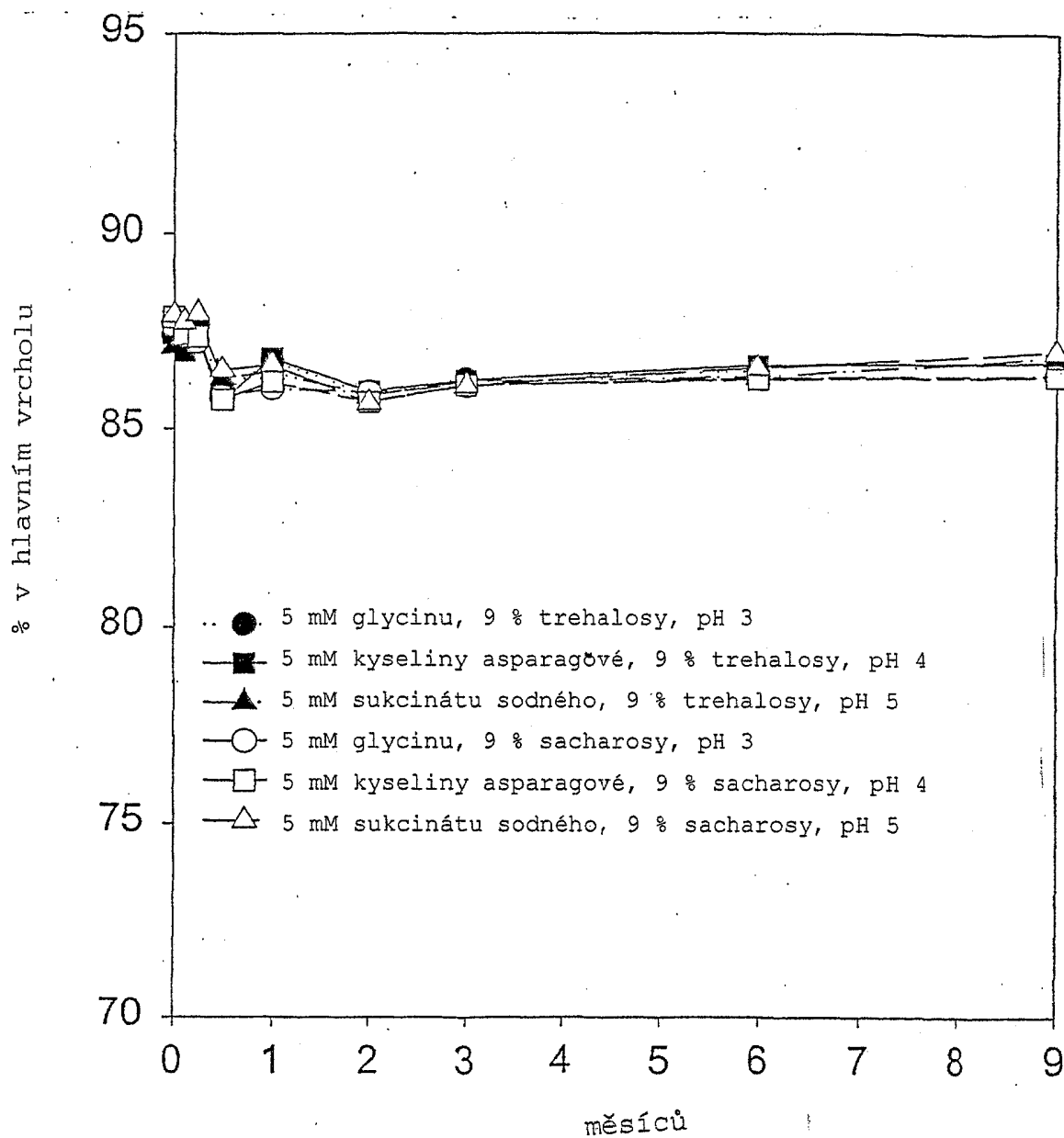
21.01.05

19/23

2005-27-35

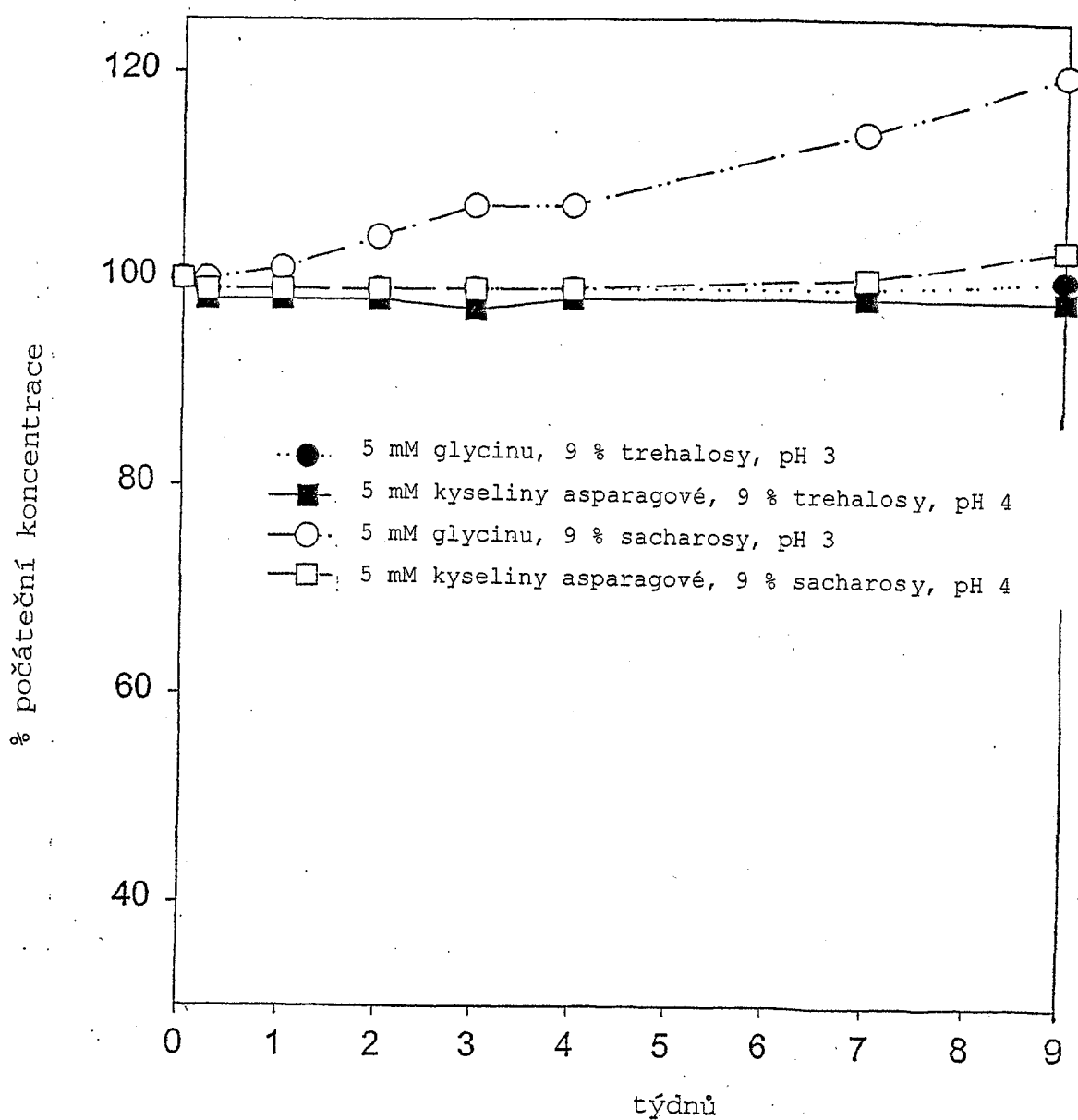
Obr. 19

Kapaln  prostředky IFN-beta-1b v lahvičkách, % v hlavním vrcholu, vysokov konn  kapalinov  chromatografie s reverzními fázemi, 5  C.



Obr. 20

Kapaln  prostředky IFN-beta-1b s obsahem trehalosy nebo sacharosy, % po ate n  koncentrace, spektroskopie v UV světle, 30  C



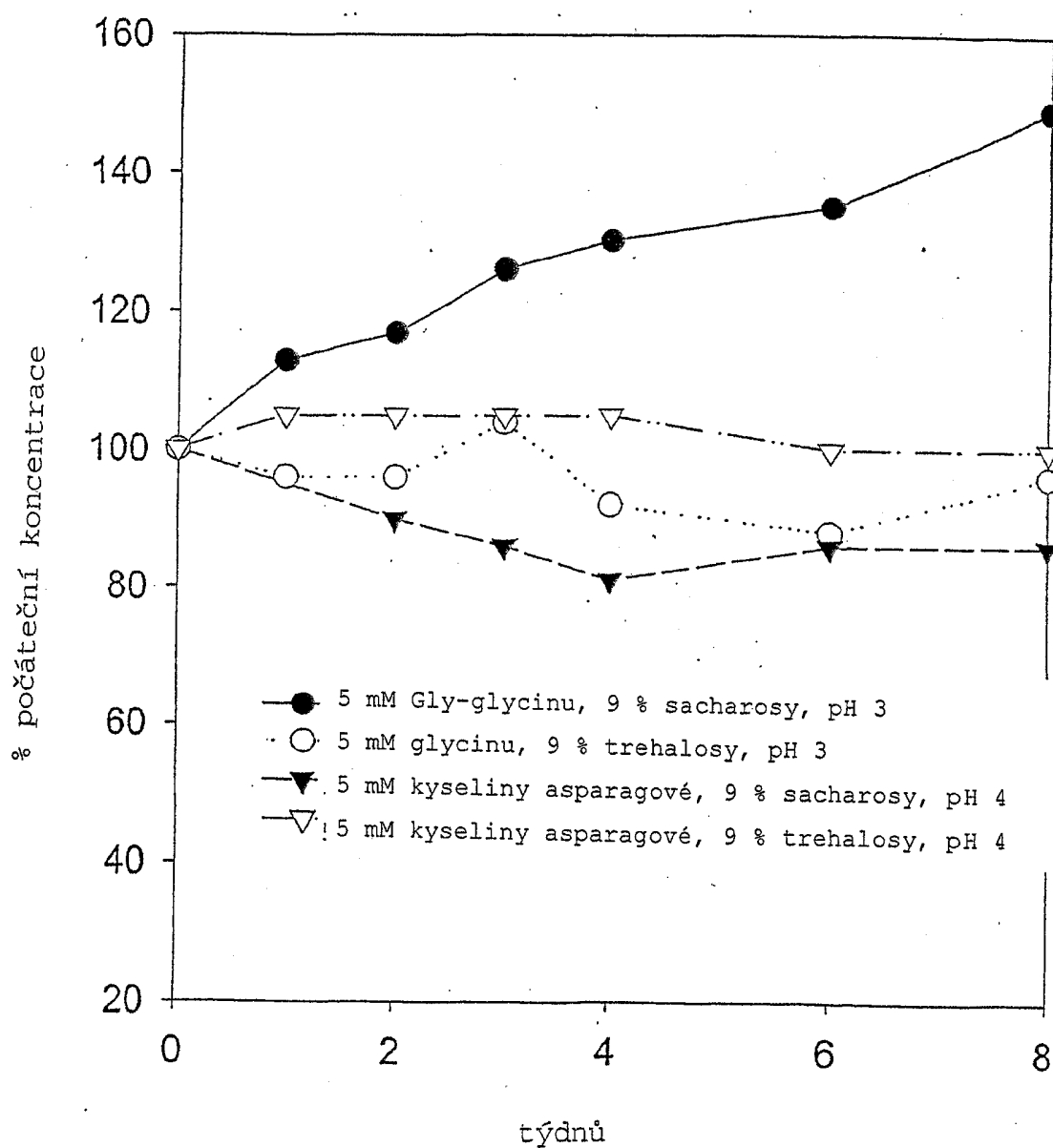
21/27

21.01.05

2001-2735

Obr. 21

Lyofilizované prostředky IFN-beta-1b, s obsahem trehalosy nebo sacharosy, % počáteční koncentrace, pH 3 a 4, 40 °C



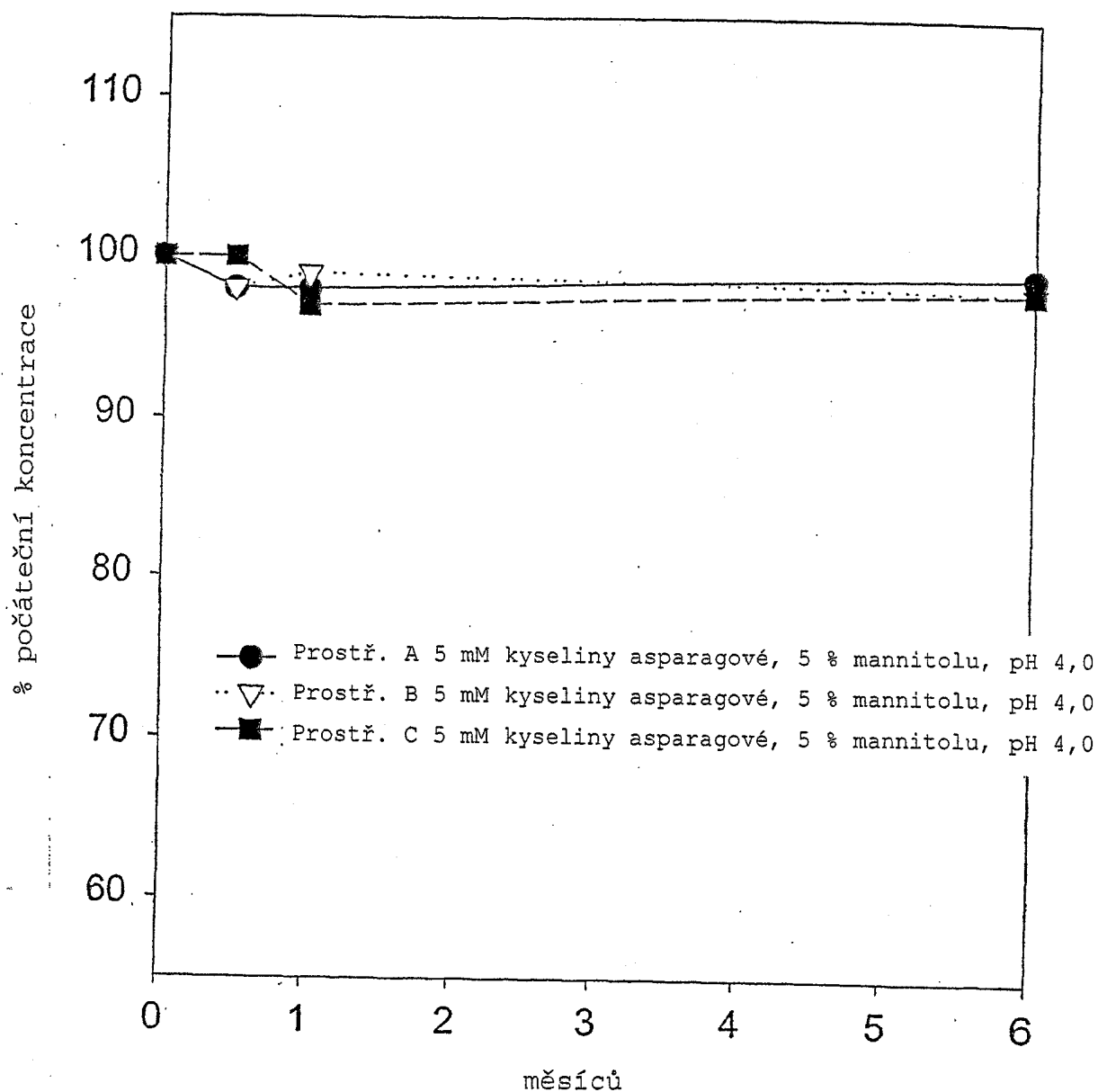
22/23

21.01.05

2003-2775

Obr. 22

Kapalné prostředky IFN-beta-1b s obsahem mannitolu, %
počáteční koncentrace, spektroskopie v ultrafialovém světle,
5 °C



21.01.05

27/27

2013-2715

Obr. 23

Kapaln  prostředky IFN-beta-1b s obsahem mannitolu, % v hlavním vrcholu, vysokov konn  kapalinov  chromatografie s reverzními fázemi, 5  C

