



H U 0 0 0 2 2 7 3 4 7 B 1

(19) **HU****MAGYAR KÖZTÁRSASÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **227 347**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 04 01975**(22) A bejelentés napja: **2000. 10. 03.**(40) A közzététel napja: **2002. 12. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértéktobben: **2011. 04. 28.**(51) Int. Cl.: **A61K 9/08** (2006.01)**A61K 9/14** (2006.01)**A61K 9/20** (2006.01)**A61K 38/00** (2006.01)**A61K 38/21** (2006.01)**A61K 38/57** (2006.01)**A61K 45/00** (2006.01)**A61K 47/04** (2006.01)**A61K 47/12** (2006.01)**A61K 47/18** (2006.01)**A61K 47/20** (2006.01)**A61K 47/34** (2006.01)**A61K 49/00** (2006.01)**A61P 17/06** (2006.01)**A61P 19/02** (2006.01)**A61P 25/00** (2006.01)**A61P 25/14** (2006.01)**A61P 25/16** (2006.01)**A61P 25/18** (2006.01)**A61P 25/22** (2006.01)**A61P 25/24** (2006.01)**A61P 25/28** (2006.01)**A61P 29/00** (2006.01)**A61P 31/18** (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)**A61P 37/06** (2006.01)**A61P 43/00** (2006.01)**C07K 1/02** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 00/27156(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 0124814**

(30) Elsőbbségi adatok:

60/157,696 1999. 10. 04. **US(62)****P0203133** 2000. 10. 03. **HU**

(73) Jogosult:

Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.,
Emeryville, CA (US)

(72) Feltalálók:

Chen, Bao-Lu, Emeryville, Kalifornia (US);**Hora, Maninder, Emeryville, Kalifornia (US)**

(74) Képvisező:

S. B. G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda,
Budapest(54) **Stabilizált, folyékony polipeptidtartalmú gyógyszerkészítmények**

(57) Kivonat

A találmány tárgya stabilizált folyékony gyógyszerkészítmény, amely az alábbiakat tartalmazza:

gyógyászatiilag hatékony komponensként egy interleukin-2-t (IL-2) vagy annak egy az IL-2 biológiai aktivitását megtartó variánsát, ahol az említett IL-2 vagy annak variánsa folyékony készítményben a tárolás alatt aggregátumot képez;

100 mM–400 mM mennyiségű aminosavbázist, amely bázis legalább egy arginint, lizint, aszparaginsavat vagy glutaminsavat tartalmaz; és

egy puffert, amely puffer egy a só formájától lényegében mentes sav.

A leírás terjedelme 40 oldal (ezen belül 11 lap ábra)

HU 227 347 B1

A találmány gyógyszerkészítményekkel foglalkozik, közelebbről olyan gyógyszerkészítményekkel, melyek a folyékony készítményekben tipikusan instabil polipeptideket tartalmaznak.

A géntechnológia jelenlegi fejlettsége lehetővé tette a legkülönbözőbb biológiai aktív polipeptideknek gyógyszerként történő felhasználáshoz elegendő mennyiségben való előállítását. A polipeptidek azonban fizikai instabilitásuk – például denaturáció vagy oldható vagy oldhatatlan aggregátumok képződése – és kémiai átalakulásuk – például hidrolízisük, oxidációjuk és deaminációjuk – következményeként elveszítik biológiai aktivitásukat. A folyékony gyógyszerkészítményekben lévő polipeptidek stabilitását több tényező befolyásolhatja, például a kémhatás, az ionerősség, a hőmérséklet, az ismételt lefagyasztás/felolvasztás, a feldolgozások alatt ért mechanikai nyíróerő. Az aggregátumok képződése és a biológiai aktivitás elvesztése a tárolófiolákban történő fizikai mozgás, a polipeptidmolekuláknak az oldatban és a folyadék/levegő határfelületén létrejövő kölcsönhatása révén is megtörténhet. A szállítás vagy más tevékenység alatti keveredés következtében kialakuló interfázisok összenyomódása és fellazulása alatt a polipeptidek adszorbeálódhatnak a levegő/folyadék és szilárd anyag/folyadék határfelületekhez, ami ugyancsak okozhat konformációs változásokat. A fizikai mozgás a proteinmolekulák „összekuszálódását”, aggregálódását, részecskék keletkezését és végül más adszorbeált proteinekkel való kicsapódását okozhatja. A proteintartalmú gyógyszerek stabilitásának általános áttekintését találjuk például az alábbi cikkekben: Manning és munkatársai, *Pharm. Res.* 6:903–918 (1989); Want és Hanson, *J. Parenteral Sci. Tech.* 42:S14 (1988).

A polipeptid tartalmú folyékony gyógyszerkészítmények instabilitása oda vezetett, hogy ezeket a készítményeket liofilizált állapotban tárolják a készítmény elkészítéséhez használható alkalmas folyékony közeg kíséretében. Noha a liofilizálás javítja a készítmény tárolási stabilitását, sok polipeptidnél az aktivitás csökkenése így is megmutatkozott vagy a száraz állapotban történő tárolás alatt [Pikal, *Biopharm.*, 27:26–30 (1990)], vagy a folyékony készítmény visszaállítása alatt aggregátumképződés vagy a katalitikus aktivitás elvesztése miatt [például Carpenter és munkatársai, *Develop. Biol. Standard*, 74:225–239 (1991); Broadhead és munkatársai, *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18:1169–1206 (1992); Mumenthaler és munkatársai, *Pharm. Res.*, 11:12–20 (1994); Carpenter és Crowe, *Cryobiology*, 25:459–470 (1988); Roser, *Biopharm.* 4:47–53 (1991)]. Noha adalék anyagokkal javítható volt a száraz fehérjék stabilitása, sok rehidrált készítmény továbbra is tartalmazott elfogadhatatlan vagy nemkívánatos mennyiségű inaktív, aggregálódott proteint [például, Townsend és DeLuca, *J. Pharm. Sci.*, 80:63–66 (1983); Hora és munkatársai, *Pharm. Res.*, 9:33–36 (1992); Yoshioka és munkatársai, *Pharm. Res.*, 10:687–691 (1993)]. A folyékony készítmény visszaállítása emellett kényelmetlen és magában hordozza a hibás dozozás lehetőségét.

Miközben számos folyékony gyógyszerkészítményt dolgoztak ki azzal a céllal, hogy stabilizálják a bennük lévő polipeptidek biológiai aktivitását, a folyékony készítményekben lévő polipeptidek lebomlása továbbra is problémát jelent a gyakorlatban. Szükség van tehát további olyan gyógyszerkészítményekre, melyek a polipeptidkomponensek állandóságát elősegítő, kompatibilis stabilizálóanyagokat tartalmaznak, hogy megőrizzék a terápiás hatékonyságukat.

A találmány terápiásan hatásos alkotórészként IL–2-t vagy annak egy, az IL–2 biológiai aktivitását megtartó variánsát tartalmazó készítményekkel és előállítási eljárásaikkal szolgál. A készítmények stabilizált folyékony gyógyszerkészítmények, melyeknél a terápiásan aktív komponensként szereplő IL–2 vagy variánsa hatékonyságát a szokásos körülmények között tárolás alatti aggregálódásuk veszélyezteti. A találmány szerinti stabilizált folyékony gyógyszerkészítmények a tárolás alatt aggregálódásra hajlamos IL–2 vagy variánsa mellett aminosavbázisok (bázisos aminosavak) olyan mennyiségét is tartalmazzák, mely csökkenti az aggregátumképződését. Az adott aminosavbázis egy aminosav vagy aminosavak kombinációja, ahol bármelyik aminosav vagy szabad bázis vagy só alakjában van jelen. A készítmény továbbá puffert is tartalmaz, mely a folyékony közeg kémhatását olyan pH-tartományon belül tartja, ahol az IL–2 vagy variánsa stabil. A puffer egy, a sójától lényegében mentes sav vagy egy sav sója vagy a savnak és sójának keveréke. A továbbiakban a „polipeptid” vagy „polipeptidek” kifejezés alatt az IL–2-t vagy variánsát értjük.

Az aminosavbázis a polipeptidnek a folyékony gyógyszerkészítményben lejárló aggregátumképződés elleni stabilizálására szolgál, míg a lényegében sómentes szabad sav, mint pufferoló ágensek, egy közel izotóniás ozmolaritású folyékony készítményt eredményeznek. A folyékony gyógyszerkészítmény más stabilizálószerkeket is tartalmazhat, főképpen metionint, nemionos felületaktív anyagot, mint amilyen a Polisorbát 80 és az EDTA, melyek tovább növelik a polipeptid stabilitását. Az ilyen folyékony gyógyszerkészítményeket stabilizáltaknak nevezzük, minthogy az aminosavbázisnak egy sójától lényegében mentes sav kíséretében való alkalmazása olyan készítményt eredményez, melynek tárolási stabilitása nagyobb az említett két komponenst nem tartalmazó folyékony gyógyszerkészítmények stabilitásánál.

A találmány további eljárásokat nyújt a polipeptideknek a folyékony gyógyszerkészítményekben megnyilvánuló stabilitásának fokozására és az ilyen gyógyszerkészítmények tárolási stabilitásának növelésére. Az eljárás abból áll, hogy a folyékony gyógyszerkészítményekhez puffer kíséretében egy aminosavbázisnak olyan mennyiségét adjuk, mely csökkenti a polipeptidnek a készítmény tárolása alatti aggregátumképződését, és ahol a puffer egy lényegében a sójától mentes sav. A találmány szerinti folyékony gyógyszerkészítmények előállításánál ezek a módszerek alkalmazásra találhatnak.

Az ábrák leírása

1. ábra – A oldható IL–2 megmaradt százalékos mennyisége a 40 °C hőmérsékleten tartott stabilitási mintákban, RP-HPLC módszerrel meghatározva. A készítmények összetétele: 0,2 mg/ml IL–2, 10 mmol/l nátrium-szukcinát, pH=6 és 270 mmol/l szorbit vagy szacharóz vagy mannit. 5
2. ábra – Az oldható IL–2 megmaradt százalékos mennyisége az 50 °C hőmérsékleten tartott stabilitási mintákban, RP-HPLC módszerrel meghatározva. A készítmények összetétele: 0,1 mg/ml IL–2, 10 mmol/l nátrium-szukcinát, pH=6 és 150 mmol/l az ábrán jelzett aminosav. 10
3. ábra – Az oldható IL–2 megmaradt százalékos mennyisége a 40 °C hőmérsékleten tartott stabilitási mintákban, RP-HPLC módszerrel meghatározva. A készítmények összetétele: 0,2 mg/ml IL–2, 10 mmol/l nátrium-szukcinát, pH=6 és 50, 100 vagy 270 mmol/l szorbit. 15
4. ábra – Az oldható IL–2 megmaradt százalékos mennyisége az 50 °C hőmérsékleten tartott stabilitási mintákban, RP-HPLC módszerrel meghatározva. A készítmények összetétele: 0,2 mg/ml IL–2, 10 mmol/l nátrium-szukcinát, pH=6, 50 vagy 150 mmol/l arginin. 20
5. ábra – Az oldható IL–2 felezési ideje ($t_{1/2}$, napokban kifejezve) a pH függvényében. A mintákat 50 °C hőmérsékleten tartottuk, az IL–2 mennyisége RP-HPLC módszerrel meghatározva. A készítmények összetétele: 0,2 mg/ml IL–2, 10 mmol/l puffer (glicin, nátrium-acetát, nátrium-citrát, nátrium-szukcinát, nátrium-foszfát, nátrium-borát), 150 mmol/l nátrium-klorid, 270 mmol/l szorbit vagy 150 mmol/l arginin. 25
6. ábra – A felezési idő a kezdeti fehérjekoncentráció függvényében az 50 °C hőmérsékleten tartott mintákban. Az összefüggések ln értékben ábrázolva. A készítmények összetétele: 0,1, 0,2 vagy 0,5 mg/ml IL–2, 10 mmol/l nátrium-szukcinát, pH=6, és 150 mmol/l L-arginin. 30
7. ábra – az oldható IL–2 megmaradt százalékos mennyisége, RP-HPLC módszerrel meghatározva. A mintákat 1, 3 vagy 5 alkalommal vetettük alá a –70 °C hőmérsékleten való lefagyasztás és szobahőmérsékleten történő felolvasztás ciklusainak. A készítmények összetétele: 0,2 mg/ml IL–2, 10 mmol/l nátrium-szukcinát, pH=6, 150 mmol/l arginin és 0–0,1% poliszorbát 80. 35
8. ábra – Az oldható IL–2 megmaradt százalékos mennyisége, RP-HPLC módszerrel 40

meghatározva. A mintákat jégen szállítottuk a kaliforniai Emeryville-ből a missouri St. Louisba és vissza. A különböző poliszorbát 80-tartalmú két készítményt vizsgáltunk. Az arginines készítmény összetétele a poliszorbát 80 mellett: 0,2 mg/ml IL–2, 10 mmol/l nátrium-szukcinát, pH=6 és 150 mmol/l arginin; a nátrium-kloridos készítmény összetétele a megadott poliszorbát 80 mellett: 0,2 mg/ml IL–2, 10 mmol/l nátrium-citrát, pH=6,5 és 200 mmol/l nátrium-klorid.

9. ábra – Az oldható TFPI felezési ideje ($t_{1/2}$, napokban kifejezve) az argininkoncentráció függvényében az 50 °C hőmérsékleten tartott stabilitási mintákban. A TFPI mennyiségét IEX-HPLC (ioncserélő gyantán) módszerrel határoztuk meg. Valamennyi készítmény 0,15 mg/ml TFPI-t tartalmazott L-arginin-bázis vagy L-arginin-hidroklorid jelenlétében, a kémhatást citromsavval vagy 10 mmol/l citromsav és nátrium-citrát keverékével pH=5,5 értékre beállítva. Az egyes készítmények összetétele: a TFPI mellett: (a) 20–150 mmol/l L-arginin-HCl, 10 mmol/l citromsavval és nátrium-citráttal pufferolva; (b) 20–150 mmol/l L-arginin-bázis, citromsavval pufferolva; (c) 100–300 mmol/l L-arginin-HCl, 10 mmol/l citromsavval és nátrium-citráttal pufferolva; (d) 100–300 mmol/l L-arginin citromsavval pufferolva.

10. ábra – Az oldható TFPI felezési ideje ($t_{1/2}$, napokban kifejezve) az argininkoncentráció függvényében az 50 °C hőmérsékleten tartott stabilitási mintákban. A TFPI mennyiségét IEX-HPLC módszerrel határoztuk meg. Valamennyi készítmény 0,15 mg/ml TFPI-t tartalmazott L-arginin-bázis vagy L-arginin-HCl jelenlétében, a kémhatást borostyánkőssavval vagy 10 mmol/l borostyánkőssav és nátrium-szukcinát keverékével pH=5,5 értékre beállítva. Az egyes készítmények összetétele a TFPI mellett: (a) 20–150 mmol/l L-arginin-HCl, 10 mmol/l borostyánkőssavval és nátrium-szukcináttal pufferolva; (b) 20–050 mmol/l L-arginin-bázis borostyánkőssavval pufferolva; (c) 100–300 mmol/l L-arginin-HCl, 10 mmol borostyánkőssavval és nátrium-szukcináttal pufferolva; (d) 100–300 mmol L-arginin-bázis borostyánkőssavval pufferolva.

11. ábra – Az oldható TFPI felezési ideje ($t_{1/2}$, napokban kifejezve) az argininkoncentráció függvényében az 50 °C hőmérsék-

leten tartott stabilitási mintákban. A TFPI mennyiségét IEX-HPLC módszerrel határoztuk meg. Valamennyi készítmény 0,15 mg/ml TFPI-t tartalmazott L-arginin-bázis jelenlétében, a kémhatás borostyánkőssavval vagy citromsavval pH=5,5 értékre beállítva. Az egyes készítmények összetétele a TFPI mellett: (a) 20–150 mmol/l L-arginin-bázis citromsavval pufferolva; (b) 20–150 mmol/l L-arginin-bázis, borostyánkőssavval pufferolva; (c) 100–300 mmol/l L-arginin-bázis citromsavval pufferolva; (d) 100–300 mmol/l L-arginin-bázis borostyánkőssavval pufferolva.

A jelen találmány terápiás hatóanyagként polipeptidet tartalmazó folyékony gyógyszerkészítményekkel és előállítási eljárásaikkal foglalkozik. A gyógyszerkészítményekre vonatkozó „folyékony” kifejezés magában foglalja a „vízes” kifejezést.

Közelebbről, a találmány szerinti készítmények olyan stabilizált folyékony gyógyszerkészítmények, melyek terápiás hatóanyaga egy olyan polipeptid, mely a szokásos körülmények között a folyékony gyógyszerkészítmény tárolása alatt aggregátumot képez. Az „aggregátumképzésen” a polipeptidmolekulák közötti fizikai kölcsönhatást értjük, melynek következtében oligomerek – melyek maradhatnak oldott állapotban – vagy az oldatból kicsapódó, látható nagy aggregátumok keletkeznek. A „tárolás” alatt azt értjük, hogy az elkészített folyékony gyógyszerkészítményt vagy formátumot nem azonnal adjuk be a betegnek, hanem az elkészülte után folyadék alakjában, fagyaszott állapotban, szárított alakban való tároláshoz csomagoljuk. A „szárított alak” kifejezés azt jelenti, hogy a folyékony készítmény későbbi rekonstruáláshoz a folyékony készítményt vagy formátumot fagyaszta szárítással (azaz liofilizálással) [például Williams és Polli, J. Parenteral Sci. Technol., 38:48–59 (1984)], permetezéssel szárítással [Masters, „Spray-Drying Handbook” 5. kiadás, (1991), Longman Scientific and Technical, Essex, U. K., 491–676. oldal; Broadhead és munkatársai, Drug Devel. Ind. Pharm., 18:1169–1206 (1992); Mumenthaler és munkatársai, Pharm. Res., 11:12–20 (1994)] vagy légszáritással [Carpenter és Crowe, Cryobiology, 25:459–470 (1988); Roser, Biopharm. 4:47–53 (1991)] megszáritjuk. A polipeptidnek a folyékony gyógyszerkészítmény tárolása alatt bekövetkező aggregálódása kedvezőtlenül befolyásolja a biológiai aktivitását, a gyógyszerkészítmény hatásának elvesztését eredményezve. Az aggregátumképződés más problémákat is okozhat, például a polipeptidtartalmú gyógyszerkészítmény infúziós rendszereken keresztüli bevitelkor a csövek, membránok vagy pumpák eltömődését.

A találmány szerinti stabilizált folyékony gyógyszerkészítmények aminosavbázist tartalmaznak a polipeptid tárolás alatti aggregálódását csökkentő mennyiségben. Az „aminosavbázis” egy aminosav vagy aminosav

vak kombinációja, ahol bármelyik aminosav szabad bázis vagy sója alakjában van jelen. Ahol az aminosavak kombinációját használjuk, valamennyi aminosav lehet szabad bázis alakjában, sója alakjában vagy némelyek lehetnek szabad bázis, a többi só alakjában. A találmány szerinti készítmények elkészítése szempontjából előnyösek a töltéssel rendelkező oldalláncú aminosavak, mint amilyen az arginin, lizin, aszparaginsav és glutaminsav. A találmány szerinti készítményekhez az adott aminosavnak bármelyik sztereoizomerje (azaz L-, D- vagy DL-izomer) vagy a sztereoizomerek kombinációja felhasználható, amíg az aminosav szabad bázis vagy sója alakjában van jelen. Előnyös az L sztereoizomereket alkalmazni. A találmány szerinti készítményeknek alkalmazhatjuk ezeknek az előnyös aminosavaknak az analógjait is. Az „aminosavanalóg” kifejezésen a természetben előforduló aminosavaknak a származékait értjük, melyek kifejtik a kívánt csökkentő hatást a polipeptidnek a folyékony gyógyszerkészítmény tárolás alatti aggregálódására. Alkalmasság argininalóg például az N-monoetil-L-arginin és az amino-guanidin. Akárcsak az előnyös aminosavak, az aminosavanalógok is szabad bázis vagy só alakjában lehetnek jelen a készítményben.

A találmány szerinti folyékony gyógyszerkészítmények az itt meghatározott aminosavbázissal kombinálva, az oldat kémhatásának fenntartására tartalmaznak még egy lényegében a sójától mentes savat vagy egy só alakjában lévő savat vagy egy savat és sójának keverékét. A pH-érték beállításához előnyösen az aminosavbázist egy lényegében sójától mentes savval kombinálva használjuk. Az ilyen kombináció egy alacsonyabb ozmolaritású oldatot eredményez, mintha a savat és sóját alkalmaznánk pufferként az aminosavbázist tartalmazó stabilizált gyógyszerkészítményben. Ennek a kombinációnak az az előnye, hogy a stabilizálószer, azaz az aminosavbázis nagyobb koncentrációjának alkalmazását teszi lehetővé a készítményben anélkül, hogy az oldat izotonicitását túllépnénk. A „lényegében sójától mentes sav” kifejezés azt jelenti, hogy a pufferként működő sav a folyékony gyógyszerkészítményben bármilyen sója nélkül van jelen. Amikor savat tartalmazó puffert alkalmazunk a folyékony gyógyszerkészítményben, azt általában sója alakjában vagy a sav és sója keveréként használjuk. Például a puffer elkészítéséhez a savat egy ellenionjával használjuk, ami lehet például nátrium-, kálium-, ammónium-, kalcium- vagy magnéziumion. Ezek szerint a szukcinátpuffer általában a borostyánkőssav egy sóját, például nátrium-szukcinátot vagy a borostyánkőssav és a nátrium-szukcinát keverékét tartalmazza. A találmány szerinti polipeptidtartalmú stabilizált folyékony készítményhez alkalmazott megfelelő sav lehet – a korlátozás szándéka nélkül – borostyánkőssav, citromsav, foszforsav, glutaminsav, maleinsav, almasav, ecetsav, borkőssav és aszparaginsav, előnyösen borostyánkőssav vagy citromsav, ezek közül is főként borostyánkőssav.

A találmány szerinti folyékony, polipeptidtartalmú gyógyszerkészítmények „stabilizáltak”. A „stabilizált” ki-

fejezés azt jelenti, hogy a folyékony készítménynek nagyobb a tárolási stabilitása azokhoz a készítményekhez képest, melyek az itt tárgyalt módon nem tartalmazzák egy aminosavbázis és egy puffer kombinációját. Ez a nagyobb tárolási stabilitás a folyékony készítményeknél megfigyelhető, akár folyékony készítményként tároljuk azokat a későbbi felhasználásig, akár lefagyasztott készítményként, melyet a felhasználáskor olvasztunk fel, akár liofilizálással, légszárítással, permet alakjában történő szárítással nyert szárított készítményként, melyből a felhasználás előtt rekonstruáljuk a folyékony készítményt vagy más alakot. Előnyösen a találmány szerinti készítményt közvetlenül folyékony alakban tároljuk, hogy kihasználjuk a találmány nyújtotta teljes előnyt, a készítmény rekonstruálása nélküli, könnyű alkalmazhatóságot és annak lehetőségét, hogy fiolákba előre szétmért, az alkalmazáshoz kész dóziskat vagy – amennyiben a készítmény bakteriosztatikus ágensekkel kompatibilis – több dózisból álló preparátumokat kaphassunk.

A találmány szerinti készítmények azzal a felfedezéssel kapcsolatosak, hogy az arginin, lizin, aszparaginsav vagy glutaminsav aminosavaknak szabad bázis vagy só alakjában történő, egy lényegében a sójától mentes savval kombinált hozzáadása a készítményhez növeli a polipeptidtartalmú, folyékony gyógyszerkészítmények tárolási stabilitását azokhoz a készítményekhez képest, melyek a két említett komponenst nem tartalmazzák. A készítmény megnövekedett tárolási stabilitása az aminosavnak a terápiásan aktív polipeptidre gyakorolt hatásán, közelebbről a polipeptid tárolás alatti aggregálódásának befolyásolásán keresztül érhető el. Továbbá, az itt meghatározott aminosavbázisnak és egy lényegében a sójától mentes savnak a folyékony, polipeptidtartalmú készítményekhez való hozzáadásával közel izotóniás folyékony gyógyszerkészítményeket nyerünk anélkül, hogy további izotonizáló anyagot, például nátrium-kloridot kellene alkalmaznunk. A „közel izotóniás” kifejezést azt jelenti, hogy a folyékony készítmény ozmolaritása 240–360 mmol/kg, előnyösen 240–340 mmol/kg, előnyösebben 250–330 mmol/kg, még előnyösebben 260–320 mmol/kg, legelőnyösebben 270–310 mmol/kg tartományba esik.

A találmány szerinti stabilizált folyékony gyógyszerkészítményekhez felhasznált aminosavbázisok megvédi a terápiásan ható polipeptideket az aggregálódástól, növelve ezáltal a polipeptidnek a készítmény tárolása alatti stabilitását. A „megnövelt stabilitás” alatt azt értjük, hogy a folyékony gyógyszerkészítmény tárolása alatt a polipeptid aggregátumképzése csökken ahhoz az aggregátumképződéshez viszonyítva, amit az adott stabilizálószer nem tartalmazó készítmény tárolása alatt a polipeptid mutat. Az aminosavbázis hozzáadásából adódó csökkent aggregátumképzés koncentrációfüggő, azaz az aminosavbázis koncentrációjának növelése a folyékony gyógyszerkészítményben lévő polipeptid stabilitásának fokozódásához vezet. Az adott aminosavbázisnak a folyékony gyógyszerkészítményekhez adandó, az aggregátumképződés csökkentésével a polipeptid stabilitását és ezáltal a készí-

mény tárolási stabilitását növelő mennyiségét jól ismert módszerekkel, különösebb kísérletezés nélkül meghatározhatjuk.

Az adott aminosavbázisnak a folyékony készítményben lévő polipeptid tárolás alatti aggregálódására gyakorolt hatását például könnyen meghatározhatjuk az oldható polipeptid időbeli változásainak mérésével. Az oldatban lévő oldható polipeptid mennyiségének meghatározására számos, a kérdéses polipeptidhez adaptált analitikai eljárás áll rendelkezésünkre. Ilyen módszer például a fordított fázisú (RP)-HPLC, a méretkizárásos (SEC)-HPLC és az UV-elnyelésen alapuló eljárások, amint azokat a példánál az alábbiakban leírjuk. Ahol a kérdéses polipeptid a folyékony készítményben oldható és oldhatatlan aggregátumot is képez a tárolás alatt, RP-HPLC és SEC-HPLC módszerekkel tudjuk megkülönböztetni az oldható polipeptidben az oldható aggregátum és a nem aggregálódott, biológiailag aktív alakban lévő polipeptid arányát, amint azt az 1. példában leírjuk.

Aggregáció esetében a polipeptidtartalmú folyékony gyógyszerkészítménybe viendő aminosavbázis hatásos mennyiségének azt a mennyiséget tekintjük, ami csökkenti az idő előrehaladtával lezajló aggregátumképződést, és ezáltal elősegíti, hogy az oldatban a polipeptid nem aggregálódott, biológiailag aktív alakban maradjon meg. Ahol például a polipeptid egy monomer protein, mint amilyen az interleukin-2 (IL-2) vagy a szöveti faktor út inhibitor (TFPI), a találmány szerinti stabilizált készítmény előállításához a stabilizálószer hatásos mennyiségének azt a mennyiséget tekintjük, ami az IL-2 vagy TFPI monomer alakban való nagyobb mértékű megtartását eredményezi.

A találmány szerinti stabilizált folyékony peptidtartalmú készítmények megnövekedett tárolási stabilitása azzal is összefüggésben lehet, hogy az aminosavbázis gátlóhatást gyakorol a terápiásan aktív polipeptidmolekulában jelen lévő glutamin- és/vagy aszparaginkomponensek tárolás alatti deaminálódására. Az adott aminosavbázisnak az említett komponensek deaminálódására gyakorolt hatását könnyen megállapíthatjuk, ha nyomon követjük a deaminált alakban lévő polipeptid mennyiségének időbeli változását. Az oldatban lévő adott polipeptid molekuláris alakjainak, azaz a natív és deaminált állapotban lévő alakjainak a mérésére szolgáló módszerek általánosan ismertek a szakterületen. Ilyen módszer az említett alakok kromatográfiás elválasztása, például RP-HPLC módszerrel, és az elválasztott alakok ismert molekulatömegű polipeptid standardnak az alkalmazásával történő azonosítása, amint azt a példákban leírjuk.

A sójától lényegében mentes savval pufferolt aminosavbázis új kombinációinak a polipeptidstabilitás növelésére történő alkalmazása előnnyel jár, például a borostyánkősav/nátrium-szukcinát pufferben lévő aminosavbázis kombinációival szemben. Ez az új kombináció közel izotóniás készítmények összeállítását teszi lehetővé, melyekben a stabilizáló aminosav nagyobb koncentrációban szerepelhet, mint a pufferként egy sav és sója keverékét alkalmazó rendszerek-

ben. A stabilizáló aminosav nagyobb koncentrációja a polipeptid stabilitásának és ezáltal a készítmény tárolási stabilitásának még fokozottabb növelését teszi lehetővé.

Például ha borostyánkőssavval pufferolt argininbázist adunk az interleukin-2 (IL-2) proteint tartalmazó, az adott protein optimális kémhatásával (pH=5,8) rendelkező folyékony készítményhez, az arginin koncentrációja 230 mmol/l értékre növelhető, mialatt a készítmény izotonicitása még megmarad. Ez megkettőzi az IL-2 50 °C hőmérsékleten mért tárolhatósági időtartamát, ami a protein stabilitásának mértéke.

Noha az IL-2 hasonló tárolhatósági időtartamát érhetjük el ugyanilyen argininkoncentráció mellett borostyánkőssav/nátrium-szukcinát puffer alkalmazásával is, az arginint ez esetben sav alakjában kell a készítményhez adjuk, hogy ugyanazt a pH-értéket érthessük el, és a nyert készítmény hipertóniás (1. példa 1. táblázat).

Hasonlóképpen, ha citromsavval pufferolt argininbázist adunk a szöveti faktor út inhibitor (TFPI) proteint tartalmazó, az adott fehérje optimális kémhatásával (pH=5,5) rendelkező folyékony készítményhez, az arginin koncentrációja 300 mmol/l értékre növelhető, mialatt a készítmény izotonicitása még megmarad. Ez a TFPU 50 °C hőmérsékleten mért tárolhatósági időtartamát közel 50%-kal megnöveli. Noha a TFPI hasonló tárolhatósági időtartamát érhetjük el ugyanilyen argininkoncentráció mellett citromsav/nátrium-citrát puffer alkalmazásával is, az arginint ez esetben sav alakjában kell a készítményhez adjuk, hogy ugyanazt a pH-értéket érthessük el, és a nyert készítmény hipertóniás (8. példa 18. táblázat).

A primer stabilizátorként alkalmazott aminosav magasabb koncentrációja lehetővé teszi, hogy ne legyen szükség a hagyományos polipeptidstabilizálók, például a szarvasmarha-szérumalbumin vagy a humán szérumalbumin alkalmazására, melyek a potenciális vírusos szennyezettségük miatt kevésbé kívánatosak.

Továbbá kívánatos a folyékony gyógyszerkészítmények izotóniás volta, mert így csökken a bevitelkor okozott fájdalom és minimalizálódik a hipertóniás vagy hipotóniás készítménnyel járó potenciális hemolitikus hatás. Ezek szerint a találmány szerinti stabilizált készítményeknek nemcsak hogy nagyobb a tárolási stabilitása, de azzal az előnnyel is járnak, hogy lényegesen kisebb fájdalmat okoz a bevitelük azokhoz a készítményekhez képest, melyek egy savból és sójából álló hagyományos pufferrendszert alkalmaznak. Például a találmány egyik megvalósítási módjánál a stabilizált folyékony gyógyszerkészítmény injektlása kevésbé okoz égető és csípős fájdalmat, mint a normál sóoldat (7. példa).

A szakember különösebb kísérletezgetések nélkül meg tudja állapítani a szóban forgó terápiásan aktív polipeptidet tartalmazó folyékony gyógyszerkészítmény komponenseinek, nevezetesen a primer stabilizálószerként alkalmazott aminosavbázisnak és a pufferként használt, lényegében a sójától mentes savnak az előnyös koncentrációit, melyekkel elérhető a fokozott polipeptidstabilitás a készítmény tárolása alatt.

Követve az itt – például az 1. példában – tárgyalt protokollt, a szakember meg tudja állapítani a folyékony gyógyszerkészítményekhez használt aminosavbázis és a különféle pufferolósavak kívánt koncentrációinak tartományát. A készítményben szereplő polipeptidtől függően az aminosavbázis előnyös koncentrációja a 100–400 mmol/l, előnyösen a 130–375 mmol/l, még előnyösebben a 150–350 mmol/l, ennél is előnyösebben a 175–325 mmol/l, ennél is előnyösebben a 180–300 mmol/l, ennél is előnyösebben a 190–280 mmol/l, legelőnyösebben a 200–260 mmol/l tartományba esik.

A pufferként használt savtól és az aggregátumképzéssel szemben stabilizálandó polipeptid pH-optimumától függően a savat 40–250 mmol/l, 50–240 mmol/l, 60–230 mmol/l, 70–220 mmol/l, előnyösebben 80–120 mmol/l, legelőnyösebben 90–200 mmol/l koncentrációtartományban alkalmazzuk.

Az egyik megvalósítási módnál az aminosavbázis a 230 mmol/l koncentrációban lévő argininbázis és a pufferolósav a 128 mmol/l koncentrációban lévő borostyánkőssav. Ez lehetővé teszi egy közel izotóniás ozmolaritású és pH=5,8 kémhatású folyékony, polipeptidtartalmú gyógyszerkészítmény előállítását. Egy másik megvalósítási módnál az aminosavbázis a 300 mmol/l koncentrációban lévő argininbázis, és a pufferolósav a 120 mmol/l koncentrációban lévő citromsav. Ez lehetővé teszi egy közel izotóniás ozmolaritású és pH=5,5 kémhatású folyékony, polipeptidtartalmú gyógyszerkészítmény előállítását. Egy másik megvalósítási módnál az aminosavbázis a 200–300 mmol/l koncentrációban lévő argininbázis, és a pufferolósav a 120–180 mmol/l koncentrációban lévő borostyánkőssav. Ez lehetővé teszi egy 256–363 mmol/kg ozmolaritású és pH=5,5 kémhatású folyékony, polipeptidtartalmú gyógyszerkészítmény előállítását.

A találmány egy másik megvalósítási módjánál a stabilizált folyékony gyógyszerkészítmény polipeptidként IL-2-t vagy változatait, 150–350 mmol/l koncentrációban lévő argininbázist és 80–190 mmol/l koncentrációban lévő borostyánkőssavat tartalmaz. Egy előnyös megvalósítási módnál az IL-2-t tartalmazó folyékony gyógyszerkészítményben az argininbázis 230 mmol/l koncentrációban, a borostyánkőssav 128 mmol/l koncentrációban van jelen. Ennek az előnyös IL-2-készítménynek a kémhatása pH=5,8, az ozmolaritása 250–330 mmol/kg. Az IL-2-nek vagy változatainak a koncentrációja ezekben a készítményekben 0,01–2,0 mg/ml, előnyösen 0,02–1,0 mg/ml, még előnyösebben 0,03–0,8 mg/ml, legelőnyösebben 0,03–0,5 mg/ml.

A találmány egy másik megvalósítási módjánál a stabilizált folyékony gyógyszerkészítmény polipeptidként TFPI-t vagy változatait, 100–400 mmol/l koncentrációban lévő argininbázist és 80–190 mmol/l koncentrációban lévő borostyánkőssavat tartalmaz. Egy előnyös megvalósítási módnál a TFPI-t tartalmazó folyékony gyógyszerkészítményben az argininbázis 200–300 mmol/l koncentrációban, a borostyánkőssav 120–180 mmol/l koncentrációban van jelen. Ennek az

előnyös TFPI készítménynek a kémhatása pH=5,5, az ozmolaritása 240–360 mmol/kg. A TFPI-nek vagy változatainak a koncentrációja ezekben a készítményekben 0,01–5,0 mg/ml, előnyösen 0,05–2,0 mg/ml, még előnyösebben 0,10–1,0 mg/ml, legelőnyösebben 0,10–0,60 mg/ml.

A találmány egy másik megvalósítási módjánál a stabilizált folyékony gyógyszerkészítmény polipeptidként TFPI-t vagy változatait, 175–400 mmol/l koncentrációban lévő citromsavat tartalmaz. Egy előnyös megvalósítási módnál a TFPI-t tartalmazó folyékony gyógyszerkészítményben az argininbázis 250–350 mmol/l koncentrációban, a citromsav 100–150 mmol/l koncentrációban van jelen. Ennek az előnyös TFPI készítménynek a kémhatása pH=5,0–6,5, az ozmolaritása 240–360 mmol/kg. Egy még előnyösebb megvalósítási módnál az argininbázis koncentrációja 300 mmol/l, a citromsav koncentrációja 120 mmol/l. Ennek a TFPI készítménynek a kémhatása pH=5,5, az ozmolaritása 240–360 mmol/kg. A TFPI-nek vagy változatainak a koncentrációja ezekben a készítményekben 0,01–5,0 mg/ml, előnyösen 0,05–2,0 mg/ml, még előnyösebben 0,10–1,0 mg/ml, legelőnyösebben 0,10–0,60 mg/ml.

Amint azt az alábbiakban tárgyalásra kerülő példák mutatják, a polipeptidet tartalmazó folyékony gyógyszerkészítmények kémhatása, főként az aggregátumképződésre gyakorolt hatáson keresztül, befolyásolja a készítményben lévő polipeptid stabilitását. Ezért a találmány szerinti gyógyszerkészítményekben lévő pufferolósav mennyisége az adott polipeptid stabilitása szempontjából az optimális pH-értéktől függően változik. A pH-optimum meghatározására a szakterületen általánosan használt módszerek szolgálhatnak, ezeket a példákban szemléltetjük. A találmány szerinti készítményekre vonatkozóan előnyös a 4,0–9,0, még előnyösebb az 5,0–6,5 pH-tartomány az adott polipeptid-től függően, így amikor a polipeptid az IL–2 vagy annak változata, az optimális kémhatás pH=5,8. Egy másik megvalósítási módnál, ahol a polipeptid a TFPI vagy változata, ez az érték pH=5,5.

A lényegében a sójától mentes savval pufferolt, aminosavbázist tartalmazó stabilizált gyógyszerkészítmény további stabilizálószerket is tartalmazhat, melyek tovább fokozzák a terápiásan aktív polipeptid stabilitását. A jelen találmány szempontjából különösen jelentős ilyen stabilizálószer lehet a metionin és az EDTA – nem korlátozva csak az említettek –, melyek a polipeptidet a metionin oxidálódásával szemben védik, továbbá a nemionos felületaktív anyagok, melyek a polipeptidet a lefagyasztás/felolvasztás alatti vagy a mechanikai nyíróerőkkel kapcsolatos aggregálódástól védik a polipeptidet.

Amikor a terápiás hatóanyagként alkalmazott polipeptid legalább egy oxidációra érzékeny metionin részt tartalmaz, metionin aminosavat adhatunk a készítményhez, hogy megakadályozzuk a metionin rész metionin-szulfoxiddá történő oxidálódását. A „megakadályozzuk” kifejezés azt jelenti, hogy minimalizáljuk az

oxidált metionin időbeli felgyűlését. A metionin oxidálódásának gátlása a polipeptid megfelelő molekulaalakjának a fokozottabb megőrzését eredményezi. A metioninnak bármelyik sztereoizomerje (L, D vagy DL) vagy ezek kombinációi alkalmazhatók. A hozzáadandó mennyiségnek elegendőnek kell lennie a metioninrész oxidációjának olyan mértékű gátlására, hogy a metionin-szulfoxid mennyisége a szabályozó működés szempontjából még elfogadható legyen. Általában ez azt jelenti, hogy a készítmény 10–30% metionin-szulfoxidnál nem tartalmazhat többet. Ez általában úgy érhető el, hogy a hozzáadott metionin és a metioninrészek aránya 1:1 és 1000:1 közötti, legelőnyösebben 10:1 és 100:1 közötti tartományba esik.

A hozzáadandó metionin előnyös mennyisége könnyen meghatározható kísérletileg oly módon, hogy a kérdéses polipeptidet tartalmazó készítményt különböző metioninkoncentrációkkal állítjuk össze, és vizsgáljuk ezek hatását a polipeptid oxidálódására. Ehhez például kromatográfiás elválasztást (RP-HPLC) és különböző ismert molekulatömegű polipeptidekkel történő összehasonlítást használhatunk, amint azt a 2. példában leírjuk. A készítmény polipeptid stabilitásának javítására azt a metioninkoncentrációt tekintjük előnyösnek, mely maximálisan gátolja a metioninrészek oxidációját anélkül, hogy hátrányosan befolyásolná a polipeptidaggregálódás aminosavval történő gátlását.

A jelen találmány szerinti folyékony készítmény felhasználása alatti, a lefagyasztás/felolvasztás és a mechanikai nyíróerők okozta polipeptidkárosodást a készítményhez adott felületaktív anyagokkal akadályozhatjuk meg. Ezek az anyagok csökkentik a felületi feszültséget az oldat/levegő határfelületeken. Tipikus felületaktív anyagként alkalmazzuk a nemionos felületaktív anyagokat, mint amilyenek a poli(oxi-etilén)-szorbit-észterek, például a poliszorbát 80 (Tween 80) és a poliszorbát 20 (Tween 20); a polioxi-propilén-polioxi-etilén-észtereket, mint amilyen Pluronic F68; a polioxi-etilén-alkoholokat, mint amilyen a Brij 35; a szimetikont; a polietilénlikolt, mint amilyen a PEG 400; a lizofoszfatidil-kolint és a polioxi-etilén-p-terc-oktil-fenolt, mint amilyen a Triton X–100. A gyógyszerek felületaktív anyagokkal történő klasszikus stabilizálását írják le például Levine és munkatársai [J. Parenteral Sci. Technol., 45(3): 160–165 (1991); referenciaként itt beépítve]. A jelen találmány gyakorlatában az előnyösen alkalmazott felületaktív anyag a poliszorbát 80.

A fent említett komponensek mellett további stabilizálóanyagok is adhatók a készítményhez, például albumin, etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) vagy ennek sói, például nátrium-EDTA. Az albumint 1,0%-os (tömeg/térfogat) vagy ez alatti koncentrációban használhatjuk. Az EDTA sok oxidációs reakciót katalizáló fém-ion megkötésére szolgál, és ezáltal működik stabilizálószerként.

A találmány egyik megvalósulási módjánál a stabilizált gyógyszerkészítmény polipeptidként IL–2-t vagy változatát, 150–350 mmol/l argininbázist, 80–190 mmol/l borostyánkősavat, 0,5–10 mmol/l metionint, 0,1–5,0 mmol/l EDTA-t, 0,001–0,2% poliszorbát

80-at tartalmaz. Az egyik előnyös megvalósítási módnál az IL-2-t tartalmazó folyékony gyógyszerkészítményben az argininbázis 230 mmol/l koncentrációban, a borostyánkősav 128 mmol/l koncentrációban van jelen. Ennek az előnyös IL-2-készítménynek a kémhatása pH=5,8, az ozmolaritása 250–330 mmol/kg. Az IL-2-nek vagy változatának a koncentrációja ezekben a készítményekben 0,01–2,0 mg/ml, előnyösen 0,02–1,0 mg/ml, még előnyösebben 0,03–0,8 mg/ml, legelőnyösebben 0,03–0,5 mg/ml.

Ahol kívánatos, a jelen találmány szerinti stabilizált, folyékony, polipeptidtartalmú gyógyszerkészítmények cukrokat vagy cukoralkoholokat is tartalmazhatnak. Bármelyik mono-, di- vagy poliszacharid vagy vízdoldható glükán alkalmazható, például fruktóz, glükóz, manóz, szorbóz, xilóz, maltóz, laktóz, szacharóz, dextrán, pullulán, dextrin, ciklodextrin, oldható keményítő, hidroxietil-keményítő vagy karboxi-metil-cellulóz-nátrium, ezek közül is legelőnyösebb a szacharóz. A cukoralkoholokat 4–8 szénatomos, hidroxilcsoporttal rendelkező szénhidrátokként definiáljuk, ilyen például a mannit, szorbit, inozit, galacit, dulcit, xilit és arabit, melyek közül legelőnyösebb cukoralkohol a mannit. A fent említett cukrok vagy cukoralkoholok alkalmazhatók önmagukban vagy kombinációikként. Az alkalmazott mennyiségnek nincs meghatározott korlátja, mindaz a mennyiség használható, ami még oldódik a folyékony készítményben, és hátrányosan nem befolyásolja a találmány szerinti módszerrel elért stabilizálhatóságot. A cukor vagy cukoralkohol előnyös koncentrációja 1,0 és 15,0%, még előnyösebben 2,0 és 10,0% (tömeg/térfogat) közé esik.

A találmány szerinti stabilizált gyógyszerkészítmény más olyan alkotórészeket is tartalmazhat, melyek a terápiás hatóanyagként használt polipeptidnek fokozzák a hatékonyságát és elősegítik a kívánt minőséget mindaddig, amíg az aminosavbázissal elért primer stabilizálhatóságra nincsenek hátrányos befolyással. A készítménynek a megválasztott beviteli úton biztonságosnak kell lennie, steril kell legyen és meg kell tartania a kívánt terápiás aktivitását.

A találmány szerinti készítményt előnyösen úgy állítjuk össze, hogy először összekeverjük a stabilizálószerrel és a puffert, valamint bármely más adalékanyagot, és a keverékhez adjuk hozzá az adott polipeptidet. Az itt tárgyalt új készítmények bármely más további adalékanyagának olyannak kell lennie, hogy hátrányosan ne befolyásolja a primer stabilizálóanyag, azaz a pufferral – ami egy, a sójától lényegében mentes sav – kombinált aminosavbázis stabilizálhatóságát. Az aminosavbázis kívánt mennyiségét tartalmazó oldat kémhatását a pufferral olyan pH-értékre állítjuk be, ami belesik az itt említett tartományokba, vagy még előnyösebben, megegyezik az adott polipeptidre vonatkozó pH-optimummal. Noha a pH-érték a szóban forgó polipeptid hozzáadása után is beállítható, előnyösebb ezt a polipeptid adagolása előtt megtenni, minthogy ezzel csökkentjük a polipeptid denaturálódásának veszélyét. Ezután megfelelő mechanikai eszközzel összekeverjük a komponenseket.

Noha a találmányban szereplő megvalósítási formák példaként az aggregátumképződéssel a degradációra különösen hajlamos interleukin-2-t (IL-2) vagy változatát vagy a szöveti faktor út inhibitor (TFPI) vagy változatát tartalmazó stabilizált készítményekre irányulnak, a találmány szerinti módszer általánosságban kiterjed minden olyan gyógyszerkészítményre, mely a folyékony készítmény tárolása alatt bekövetkező aggregátumképződést mutató polipeptidet vagy változatát tartalmazza. Ilyen polipeptid vagy biológiai-
5
10
15
20

lag aktív változata lehet például: valamelyik interleukin (például IL-2), valamelyik interferon, például a β -interferon (IFN- β és mutánsai, mint amilyen az IFN- β_{Ser17} (leírva a 185459B1 számú európai szabadalmi beadványban és a 4 588 585 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban; referenciaként itt beépítettek), a szöveti faktor út inhibitor (TFPI), a humán növekedési faktor (hGH), az inzulin vagy más hasonló polipeptid, mely a folyékony készítményben aggregátumot képez.

A találmány szerinti stabilizált folyékony gyógyszerkészítményekben lévő polipeptidek lehetnek nativak vagy készülhetnek rekombináns technikával; lehetnek bármilyen eredetűek, így származhatnak emlősből, például egérből, patkányból, nyúlból, sertésből, főemlősből vagy emberből, feltéve, hogy az itt tárgyalt tulajdonságokat mutatják, azaz a folyékony készítmény tárolása alatt aggregátumot képezhetnek. Ezek a polipeptidek előnyösen az emberből származnak, még előnyösebb, ha mikroorganizmusok által előállított rekombináns humán fehérjék.

A találmány szerinti gyógyszerkészítményekben terápiás hatóanyagként szereplő, szóban forgó polipeptidek biológiai-
35
40
45
50
55

lag aktív változatai szintén beletartoznak az itt használt „polipeptid” fogalomba. Ezeknek a változatoknak meg kell őrizniük a natív polipeptid kívánt biológiai hatását, azaz a polipeptid változatát tartalmazó gyógyszerkészítménynek ugyanazt a terápiás hatást kell kiváltani a betegnek beadva, mint a natív polipeptidet tartalmazónak. Ezek szerint a polipeptidváltozat hasonló módon szolgál terápiás hatóanyagként a gyógyszerkészítményben, mint a natív polipeptid. A rendelkezésre álló módszerekkel meghatározhatjuk, hogy a polipeptidváltozat megőrizte-e a kívánt biológiai aktivitást, és ezáltal szolgálhat-e terápiás hatóanyagként a gyógyszerkészítményben. A biológiai aktivitás méréséhez a natív polipeptidek vagy fehérjék aktivitásának mérésére szolgáló specifikus vizsgálati eljárásokat használhatjuk, beleértve a jelen találmányban leírt vizsgálatokat is. Továbbá, a biológiai-
50
55

lag aktív változatai szintén beletartoznak az itt használt „polipeptid” fogalomba. Ezeknek a változatoknak meg kell őrizniük a natív polipeptid kívánt biológiai hatását, azaz a polipeptid változatát tartalmazó gyógyszerkészítménynek ugyanazt a terápiás hatást kell kiváltani a betegnek beadva, mint a natív polipeptidet tartalmazónak. Ezek szerint a polipeptidváltozat hasonló módon szolgál terápiás hatóanyagként a gyógyszerkészítményben, mint a natív polipeptid. A rendelkezésre álló módszerekkel meghatározhatjuk, hogy a polipeptidváltozat megőrizte-e a kívánt biológiai aktivitást, és ezáltal szolgálhat-e terápiás hatóanyagként a gyógyszerkészítményben. A biológiai aktivitás méréséhez a natív polipeptidek vagy fehérjék aktivitásának mérésére szolgáló specifikus vizsgálati eljárásokat használhatjuk, beleértve a jelen találmányban leírt vizsgálatokat is. Továbbá, a biológiai-
50
55

C-terminális vagy N-terminális deléciója. Az „analóg” lehet a natív polipeptidnek vagy a natív polipeptid egy fragmensének az analógja, ahol az analóg abban tér el a natív polipeptidszekvenciától vagy -szerkezettől, hogy egy vagy több aminosav kicserélt, beszűrt vagy kiejtett. Az analóg kifejezésbe beletartoznak a „muteinek” (mutáns proteinek) – ahogyan azok itt leírtak – és az egy vagy több peptidot (peptidet utánzó) tartalmazó peptidok is (lásd: WO 91/04282 számú nemzetközi szabadalmi közlemény). A „származék” az adott natív polipeptidnek, polipeptidfragmensnek vagy analógjának bármilyen megfelelő módosulását jelenti, ahol a módosítás jelenthet glikozilálást, foszforilálást vagy más idegen molekulareszt hozzáadását mindaddig, amíg a natív polipeptid kívánt biológiai aktivitása megmarad. A polipeptidfragmensek, -analógok vagy -származékok előállítására a szakterületen rendelkezésre állnak a módszerek.

Például, a polipeptidszekvencia variánsait a kérdéses natív polipeptidet kódoló klónozott DNS-szekvencia mutációjával hozhatjuk létre. A mutagenézis és a nukleotidszekvencia megváltoztatásának módszerei jól ismertek a szakterületen; lásd például: Walker és Gastra (szerkesztők), „Techniques in Molecular Biology” (MacMillan Publishing Company, New York, 1983); Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488–492 (1985); Kunkel és munkatársai, Methods Enzymol., 154:367–382 (1987); Sambrook és munkatársai, „Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (Cold Spring Harbor, New York, 1989); a 4 873 192 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom és az ott szereplő irodalom; valamennyi referenciaként itt beépítve. A megfelelő aminosavnak a polipeptid biológiai aktivitását nem befolyásoló kicserélésére eligazítást a Dayhoff és munkatársai modelljénél találunk: „Atlas of Protein Sequence and Structure” (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C., 1978; referenciaként itt beépítve). Előnyös a konzervatív szubsztitúció, vagyis egy aminosavnak egy hasonló tulajdonságú aminosavval való cseréje. Konzervatív helyettesítésről beszélünk például a Gly $\leftrightarrow$ Ala, Val $\leftrightarrow$ Ile $\leftrightarrow$ Leu, Asp $\leftrightarrow$ Glu, Lys $\leftrightarrow$ Arg, Asn $\leftrightarrow$ Gln és Phe $\leftrightarrow$ Trp $\leftrightarrow$ Tyr cserék esetében, nem korlátozva csak a felsoroltakra.

Az adott polipeptid szerkezetbeli változataiban a módosításokat elvégezhetjük oly módon, hogy a változat továbbra is rendelkezzen a kívánt aktivitással. Nyilvánvaló, hogy a polipeptidvariánst kódoló DNS-ben végzett bármilyen mutáció nem helyezheti a szekvenciát a reading framen kívülre, és előnyösen nem hoz létre komplementer régiókat, amik szekunder mRNS-szerkezetet képezhetnek; lásd a 75444 számú európai szabadalmi beadványt.

A polipeptid biológiailag aktív variánsainak az aminosavszekvenciája általában legalább 70%-ban, előnyösen legalább 80%-ban, még előnyösebben 90–95%-ban vagy nagyobb százalékban, legelőnyösebben 98 vagy nagyobb százalékban azonos a referens polipeptidmolekula szekvenciájával. A biológiailag aktív változat a natív polipeptidtől 1–15, 1–10, például 6–10, 5, 9, 3, 2 vagy 1 aminosavban különbözhet. Az

„azonos szekvencia” fogalmán azt értjük, hogy egy adott összefüggő szegmensben ugyanazt az aminosavsorrendet találjuk a polipeptidváltozatban és a referens polipeptidmolekulában. Két aminosavszekvencia közötti százalékos szekvenciaazonosságot úgy határozzuk meg, hogy az egymáshoz illesztett szekvenciáknál az azonos aminosavval kitöltött helyek számát elosztjuk az összehasonlított helyek összes számával és a kapott értéket megszorozzuk százszal.

A két szekvencia optimális felsorakoztatásánál figyelembe veendő, hogy a variáns aminosavszekvenciájának folytonos szegmense rendelkezhet hozzáadott vagy kiejtett aminosavakkal a referens molekulához képest. Az aminosavszekvenciák összehasonlításához használt folyamatos szegmens legalább 20 egymáshoz kapcsolódó aminosavból áll, de lehet ez a szám 30, 40, 50, 100 vagy nagyobb. A szekvenciaazonosság korrekciói a változat aminosavsorrendjében meglévő hézagok („gap”) figyelembevételével történik. A szekvenciák egymáshoz illesztésének módszerei ismertek a szakterületen úgy az aminosavsorrendre, mint az aminosavszekvenciát kódoló nukleotidsorrendre vonatkozólag.

Bármely két szekvencia közti százalékos azonoság meghatározásánál alkalmazhatunk matematikai algoritmust. A szekvenciák összehasonlítására használt matematikai algoritmus egyik előnyös példája a Myers- és Miller-féle algoritmus [CABIOS, 4:11–17 (1988)]. Ez az algoritmus az ALIGN programban (2,0 változat) alkalmazott, mely része a GCG szekvenciaillesztés szoftvercsomagnak. Az aminosavszekvenciák összehasonlításánál a PAM 120 tömegtáblázat, egy 12-es és egy 4-es „gape length penalty” használható az ALIGN programmal. Egy másik előnyös, nem limitáló példa a két szekvencia összehasonlításához használható matematikai algoritmusokra a Karlin- és Altschul-féle algoritmus [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264 (1990), módosítva Karlin és Altschul által, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873–5877 (1993)]. Ilyen algoritmus van beépítve Altschul és munkatársai NBLAST és az XBLAST programjába [J. Mol. Biol., 215:403 (1990)]. A BLAST nukleotid keresés az NBLAST programmal végezhető, pontszám=1000, szóhossz=12, megkapva az adott polipeptidet kódoló nukleotidszekvenciával homológ nukleotidszekvenciákat. A BLAST protein vizsgálat XBLAST programmal végezhető, pontszám=50, szóhossz=3, megkapva az adott polipeptiddel homológ aminosavszekvenciákat. Hogy összehasonlítási céllal megkapjuk a hézagokat figyelembe vevő illesztést, a Gapped BLAST használható, amint azt Altschul és munkatársai leírják [Nucleic Acids Res., 25:3389 (1997)]. Ettől eltérő módon, használhatjuk a PSI-Blast-ot egy megismételt kereséshez, hogy detektáljuk a molekulák közötti távoli rokonságokat [Altschul és munkatársai, fent]. A BLAST, Gapped BLAST és PSI-Blast programok alkalmazásánál az illető programok alapértelmezett (default) paramétereit használhatjuk, lásd: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; az ALIGN programot [Dayhoff (1978)] az Atlas of Protein Sequence and Structure 5:Suppl. 3-ban (National Biomedical Re-

search Foundation, Washington, D. C.) és a Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8-ban (beszereshető a Genetics Computer Grouptól, Madison, Wisconsin) lévő programokat, például a GAP programot, ahol a program alapértelmezett (default) paramétereit alkalmazzák.

Az aminosavszekvencia százalékos homogenitásának megállapításánál figyelembe veendő, hogy néhány helyen az aminosavak a konzervatív aminosavak cseréje eredményeként különbözhetnek egymástól, ami nem befolyásolja a protein funkciós tulajdonságait. Ezekben az esetekben a százalékos szekvenciaazonosság felfelé módosítható, tekintettel a konzervatív cserélt aminosavak hasonlóságára. Az ilyen módosítás jól ismert a szakterületen, lásd például Myers és Miller [Computer Applic. Biol. Sci., 4:11–17 (1988)] cikkét.

A polipeptid pontos kémiai szerkezete számos tényezőtől függ. Minthogy a molekula ionizálható aminosav és karboxilcsoportokat tartalmaz, az adott polipeptid lehet savas vagy bázikus só formájában vagy semleges alakban. Valamennyi készítmény, mely megfelelő környezeti állapotok közé helyezve megtartja biológiai aktivitását, beletartozik a polipeptidok itt használt meghatározásába. Továbbá, a polipeptid primer aminosavszekvenciája megnövelhető származékképzéssel, aminek cukormolekulát (glükózilálás) vagy más kiegészítő molekulát, például lipidet, foszfát-, acetilcsoportot vagy hasonlót használunk. Ugyancsak kiegészíthető szacharidokkal konjugálva. Némelyik származék a termelő gazdaszervezetben lezajló transzlációs folyamatokon keresztül képződik, mások in vitro állíthatók elő. Ezek a módosulatok bármelyik esetben beletartoznak a polipeptid itt használt definíciójába mindaddig, amíg a polipeptid aktivitása nem sérül. Várható, hogy a különféle vizsgálati eljárásoknál ezek a módosítások mennyiségi vagy minőségi befolyással lehetnek az aktivitásra, fokozva vagy csökkentve azt. Továbbá, a láncban lévő egyes aminosavrészek módosíthatók oxidálással, redukcióval vagy más származékképzéssel, és a polipeptid az aktivitást megőrző fragmensekre hasítható. Az aktivitást nem károsító ilyen változtatások után a polipeptid továbbra is eleget tesz az itt leírt definíciónak.

A szakterületen hasznos eligazításokat találunk a polipeptidváltozatok előállítására és alkalmazására vonatkozóan. A polipeptidváltozatok elkészítésénél a szakember könnyen meghatározza, a natív fehérje nukleotid- vagy aminosavszekvenciájának mely módosításai azok, melyek eredményeként nyert változatok alkalmasak arra, hogy a jelen találmány szerinti készítményben terápiásan aktív komponensként alkalmazhatók legyenek, és amelyek aggregátumképzése a lényegében sójától mentes savval pufferolt aminosavbázissal az itt leírtak szerint csökkenthető.

A találmány egyik megvalósítási módjánál a folyékony gyógyszerkészítményben terápiásan aktív komponensként jelen lévő polipeptid az interleukin-2 (IL-2) vagy annak változata, előnyösen a rekombináns IL-2. Az interleukin-2 a normál perifériális vér limfociták által termelt limfokin, mely alacsony koncentráció-

ban található a szervezetben. Ez a fehérje serkenti a növényi lektineknek, antigéneknek vagy más stimulánsoknak való kitettség után az antigén vagy mitogén stimulálta T-sejtek osztódását. Az IL-2-t először Morgan és munkatársai írták le [Science, 193:1007–1008 (1976)] és eredetileg „T-sejt növekedési faktor” néven nevezték, minthogy képes indukálni a stimulált T-limfociták szaporodását. Ez egy 13 000–17 000 molekulatömegű fehérje [Gillis és Watson, J. Exp. Med., 159:1709 (1980)], melynek izoelektromos pontja pH=6–8,5 tartományban van. Ma már tudjuk, hogy nemcsak növekedési faktor, hanem az immunrendszer különféle in vitro és in vivo funkcióit is befolyásolni képes. Az IL-2 egyike azoknak a limfociták által termelt messzendezőszabályozó molekuláknak, melyek a celluláris kölcsönhatásokat és funkciókat közvetítik. Erről a természetben előforduló limfokinnról kimutatták, hogy akár önmagában, akár limfokinaktivált „killer” sejtekkel (LAK) vagy tumorinfiltráló limfocitákkal kombinálva tumorellenes hatása van különféle rosszindulatú daganatokkal szemben [például: Rosenberg és munkatársai, N. Engl. J. Med., 316:889–897 (1987); Rosenberg, Ann. Surg., 208:121–135 (1988); Topalian és munkatársai, J. Clin. Oncol., 6:839–853 (1988); Rosenberg és munkatársai, N. Engl. J. Med., 319:1676–1680 (1988); Weber és munkatársai, J. Clin. Oncol., 10:33–40 (1992)]. Noha az IL-2 tumorellenes hatását áttétes melanománál és vesesejt-karcinómánál írták le, más betegségek, nevezetesen a limfóma is, reagálni látszik az IL-2-kezelésre.

A „rekombináns IL-2” kifejezésen azt a natív IL-2 szekvenciával összemérhető biológiai aktivitással rendelkező interleukin-2-t értjük, melyet rekombináns technikával állítottak elő [például: Taniguchi és munkatársai, Nature, 302:305–310 (1983); Devos, Nucleic Acids Research, 11:4307–4323 (1983)] vagy mutációval változtattak meg [Wang és munkatársai, Science, 224:1431–1433 (1984)]. Ez általánosságban leírva úgy történik, hogy az IL-2-t kódoló gént klónozzák, majd a transzformált gazdaszervezetben, előnyösen egy mikroorganizmusban, legelőnyösebben E. coliban expresszálják. Az expresszási körülmények között a gazdaszervezet kifejezi az idegen gént, IL-2-t termelve. A szintetikus rekombináns IL-2 eukariótákkal is előállítható, például élesztővel vagy emberi sejttel. A sejtek tenyésztését, összegyűjtését, feltárását és az IL-2 kinyerését például a 4 604 377, 4 738 927, 4 656 132, 4 569 790, 4 748 234, 4 530 787, 4 575 298 és a 4 931 543 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmak írják le, ezek referenciaként itt beépítettek.

Az IL-2-változatokra például találunk a 136489 számú, a 83101035.0 számú (benyújtva: 1983. február 3-án, közzétéve: 1983. október 19-én 91598 számon), a 82307036.2 számú (benyújtva: 1982. december 22-én, közzétéve: 1983. szeptember 14-én, 88195 számon) európai szabadalmi beadványban; rekombináns IL-2-mutánsokat ír le a 83306221.9 (benyújtva: 1983. október 13-án, közzétéve: 1984. május 30-án, 109748 számon) európai szabadalmi beadvány, mely megfelel a 893016 számú belga szabada-

lomnak, mely közösen birtokolt a 4 518 584 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom és a WO 99/60128 számú szabadalom által; az itteni példákban alkalmazott IL-2-mutánsokat a 4 931 543 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom írja le; valamennyi szabadalmi irat referenciaként itt beépítve. Továbbá, az IL-2 polietilénlikollal lehet módosított, amivel növelhető az oldékonyosság, és módosítható a farmakokinetikai profil (lásd a 4 766 106 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmat; referenciaként itt beépítve).

A találmány egy másik megvalósítási módjánál a folyékony gyógyszerkészítményben terápiásan aktív komponensként jelen lévő polipeptid az interferon, közelebről a fibroepiteliális β -interferon (IFN- β) vagy annak változata, előnyösen a rekombináns DNS-technikával előállított rekombináns IFN- β . Az interferonokat az emlőssejtek termelik válaszul a különböző inducerekre, például mitogénekre, polipeptidekre, vírusoknak és hasonlóknak való kitettségre. Ezek a viszonylag kicsi, fajspecifikus, egyetlen láncból felépülő polipeptidek immunregulátor, vírusellenes és antiproliferatív tulajdonságokkal rendelkeznek. Az interferonok jelentőséggel bírnak mint terápiás hatóanyagok a vírusos betegségek és a rák kezelésében.

A humán IFN- β -t kódoló DNS-szekvencia a szakterületen rendelkezésre áll [Goeddel és munkatársai, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); Taniguchi és munkatársai, *Proc. Japan Acad. Sci.*, 855:464 (1979)], és a gén kifejeződik *E. coliban* [Taniguchi és munkatársai, *Gene* 10:11–15 (1980)] és kínai hőrsög petesejtjeiben (például a 4 966 843 és az 5 376 567 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom). Az IFN- β változatait írja le a 185459B1 számú európai szabadalmi bejelentés és a 4 518 584, valamint a 4 588 585 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom. IFN- β_{Ser17} mutáns *E. coliban* történő expresszálasát írja le a 4 737 462 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom; valamennyi itt referenciaként beépítve.

A találmány egy másik megvalósítási módjánál a folyékony gyógyszerkészítményben terápiásan aktív komponensként jelen lévő polipeptid a szöveti faktor út inhibitor (TFPI) vagy annak változata, mely a véralvadási kaskádot gátolja. Ez a fehérje lipoproteinkapcsolt koagulációs inhibitor (LACI), szöveti faktor inhibitor (TFI) és extrinszik út inhibitor (EPI) néven is ismert. A TFPI-t először a Hep G2 humán hepatomasejtből [Broze és Miletich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1886–1890 (1987), majd humán plazmából [Novotny és munkatársai, *J. Biol. Chem.*, 264:18 832–18 837 (1989)], Chang májsejtből és SK hepatomasejtből [Wun és munkatársai, *J. Biol. Chem.*, 265:16 096–16 101 (1990)] nyerték ki. A TFPI cDNS-t méhlepény és endotél cDNS-könyvtárból izolálták [Wun és munkatársai, *J. Biol. Chem.*, 263:6001–6004 (1988); Girard és munkatársai, *Thromb. Res.*, 55:37–50 (1989)]. Áttekintést ad Rapaport, *Blood*, 73:359–365 (1989); Broze és munkatársai, *Biochemistry*, 29:7539–7546 (1990)]. A TFPI 276 aminosav-részből álló fehérjemolekuláját kódoló TFPI cDNS-kló-

nozását továbbá a 4 966 852, 5 773 251 és az 5 849 875 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmak írják le; referenciaként itt mindegyik beépítve.

A TFPI változatai ismertek, például az 5 212 091 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom nem glükozilált rekombináns TFPI *E. colival* történő termelését és kinyerését írja le; az 5 105 833 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom analógokat és fragmenseket tárgyal; az 5 378 614 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom TFPI analógok élesztőben történő előállításával foglalkozik; valamennyi referenciaként itt beépítve.

A találmány szerinti stabilizált polipeptidtartalmú folyékony gyógyszerkészítmény gyógyászati lagon hatásos mennyiségét alkalmazzuk a betegnél. A „gyógyászati lagon hatásos mennyiségen” azt a mennyiséget értjük, mely a betegség vagy állapot kezelésére, megelőzésére vagy diagnosztizálására alkalmas. A bevitel történhet például szájon keresztül vagy parenterálisan, azaz intravénás, intramuszkuláris, szubkután, intraarteriális és intraperitoneális injekcióval vagy infúzióval. Az egyik ilyen megvalósítási mód az injekcióként való bevitel, ami előnyösen szubkután történik. A találmány szerinti készítmény injektálható alakja lehet oldat, szuszpenzió vagy emulzió, nem korlátozva csak a felsoroltakra.

Egy adott polipeptidet tartalmazó stabilizált folyékony gyógyszerkészítmény készíthet egységnyi dózisalakban, és lehet injektálható vagy infuzionálható alakban, például oldatként, emulzióként vagy szuszpenzióként. Továbbá tárolható lefagyasztott állapotban vagy előállítható szárított alakban, mint amilyen a liofilizált por, melyből a bevitel előtt visszaállíthatjuk az oldatot, szuszpenziót vagy emulziót, majd a bevitelhez bármelyik orális vagy parenterális módot alkalmazhatjuk. Előnyös a készítményt folyékony formában tárolni, kihasználva a jelen találmány megnövekedett tárolási stabilitást nyújtó módszerének előnyét. A stabilizált gyógyszerkészítményt előnyösen membránon való szűréssel sterilizáljuk és egységnyi vagy több egységnyi dózist tartalmazó tárolókban tartjuk, mint amilyen a lezárt flóla vagy ampulla. A gyógyszerkészítmény formálásánál további, a szakterületen általánosan alkalmazott módszerek is használhatók a folyékony gyógyszerkészítmény stabilitásának fokozására, feltéve, hogy a találmány szerinti hatásra nincsenek kedvezőtlen befolyással. A készítményekre, a megfelelő vívőanyagok, stabilizálószerke stb. kiválasztására alapos áttekintést találunk a Remington's Pharmaceutical Sciences (18. kiadás, Mack Pub. Co., Eaton, Pennsylvania, 1990) kézikönyvben, mely referenciaként itt beépített.

A „beteg” fogalmába beletartozik legelőnyösebben az ember, de az állatok is, főképpen az emlősök, nevezetesen a kutya, macska, szarvasmarha, ló, juh és sertés, nem korlátozva csak a felsoroltakra. A kezelés lehet megelőző és gyógyító célú. Amikor megelőző céllal használjuk a kezelést, a hatóanyagot még a tüneteket megelőzően adjuk be. A megelőző kezelés a tünetek megjelenését hivatott megakadályozni vagy enyhíteni. Gyógyító kezelésnél a hatóanyagot a tünetek, feltehetően (vagy röviddel azután) adjuk. A hatóanyag te-

rapiás alkalmazása az aktuális tünet enyhítésére szolgál.

Például a natív szekvenciájú IL-2-t vagy változatát tartalmazó, a találmány szerinti gyógyszerkészítmény hatásos mennyiségét jelentő formátumokat számos, erre a polipeptidre terápiásan reagáló klinikai indikáció kezelésére, megelőzésére vagy diagnosztizálására használhatjuk. A natív szekvenciájú IL-2 biológiaiilag aktív változatait, például az IL-2 aktivitását megőrző mutánsokat, különösen az IL-2.sub.ser 125 és más mutánsokat, melyekben a 125-ös helyen a cisztein más aminosavakkal helyettesített, a natív IL-2-höz hasonló módon formálhatjuk. Következésképpen, a natív IL-2-t vagy változatait felhasználhatjuk bakteriális, vírusos, parazitás és gombás fertőzések diagnosztizálására, megelőzésére vagy (helyi vagy szisztémás) kezelésére; sejtközvetítette citotoxicitás növelésére; a limfokin által aktivált „gyilkos” (killer) sejtek aktivitásának serkentésére; limfociták immunműködésének helyreállításához; a szerzett immunhiány betegségénél (AIDS) az immunfunkció helyreállításának elősegítésére; idős emberek és állatok normális immunműködésének helyreállítására; kóros állapotoknál az IL-2-szintnek enzimamplifikációt, radiojelölést, radioleképzést és más ismert módszereket alkalmazó nyomon követésére; a terápiás vagy diagnosztikai céllal in vitro tenyésztett T-sejtek növekedésének serkentésére; limfokinek receptorhelyeinek gátlására és más különféle terápiás, diagnosztikai és kutatási alkalmazásra. A humán IL-2-nek és változatainak, például az IL-2-mutánsoknak, különféle terápiás és diagnosztikai alkalmazásait kutatták és írták le Rosenberg és munkatársai [N. Engl. J. Med., 316:889–897 (1987)], Rosenberg [Ann. Surg., 208:121–135 (1988)], Topalian és munkatársai [J. Clin. Oncol., 6:839–853 (1988)], Rosenberg és munkatársai [N. Engl. J. Med., 319:1676–1680 (1988)], Weber és munkatársai [J. Clin. Oncol., 10:33–40 (1992)], Grimm és munkatársai [Cell. Immunol., 70(2):248–259 (1982)], Mazumder [Cancer J. Sci. Am., 3(Suppl. 1):S 37–42 (1997)], Mazumder és Rosenberg [J. Exp. Med., 159(2):495–507 (1984)] és Mazumder és munkatársai [Cancer Immunol. Immunother. 15(1):1–10 (1983)]. Az IL-2-t vagy változatait tartalmazó, találmány szerinti formulák alkalmazhatók önálló ágenseként vagy kombinálhatók más immunológiaiilag fontos B- vagy T-sejtekkel vagy más terápiás ágensekkel. Fontos sejtek például a B- vagy T-sejtek, a természetes „gyilkos” sejtek, a LAK sejtek és hasonló; terápiás ágensekként használhatók például a különféle interferonok, különösen a gamma-interferon, a B-sejt növekedési faktor, az IL-1 és az antitestek, például az anti-HER2 vagy az anti-CD20 antitestek. Az IL-2-t vagy változatát tartalmazó találmány szerinti formátumok az emberek vagy az állatoknak beadhatók szájon át, intraperitoneálisan, intramuszkulárisan, szubkután, intravénásan, orron át vagy tüdőn keresztül, ahogyan azt az orvos jónak látja. Az IL-2 (akár a natív szekvenciájú, akár a biológiai aktivitását megőrző változata, például az itt tárgyalt mutánsok) mennyisége 0,1–15 mU/m² közötti mennyiségben vihető be. A vesesejt-karcinóma és az áttétes melanoma esetében az IL-2-nek vagy biológiai

giallag aktív változatának intravénás bóluszbán 300 000–800 000 IU/kg/8 óra nagyságú dózisa adható be.

A natív szekvenciájú szöveti faktor út inhibitor (TFPI) vagy változatát tartalmazó találmány szerinti gyógyszerkészítmény hatásos mennyiségét jelentő formátumokat számos, erre a polipeptidre terápiásan reagáló klinikai indikáció (helyi vagy szisztémás) kezelésére, megelőzésére vagy diagnosztizálására használhatjuk. Ezek közé a klinikai indikációk közé tartoznak például a neutrofil elasztáz fokozott szintézisével és felhasználásával kapcsolatos indikációk, mint amilyenek a gyulladásos betegségek, például a súlyos hasnyálmirigy-gyulladás (pancreatitis), tüdőtágulat (amphysema), reumaszerű ízületi gyulladás (rheumatoid arthritis), összetett szervelégtelenség, cisztás fibrózis, felnőttkori légzési distressz szindróma (ARDS) és szepszis; az IL-8 fokozott szintézisével és felhasználásával kapcsolatos betegségek, ideértve olyan gyulladásos betegségeket, mint az ARDS, reperfüziós bántalmak (ideértve a tüdő reperfüziós sérülését), szepszis és ízületi gyulladás (lásd: a referenciaként itt beépített WO 96/40224). Az IFN- β vagy mutánsai az embernek vagy állatnak beadható szájon át, intraperitoneálisan, intramuszkulárisan, szubkután, intravénásan, orron keresztül vagy a tüdőn át, ahogyan azt a kezelőorvos jónak látja.

A β -interferont (IFN- β) vagy változatát például az IFN- β _{Ser17}-et tartalmazó, találmány szerinti gyógyszerkészítmény hatásos mennyiségét jelentő formátumokat erre a polipeptidre terápiásan reagáló klinikai indikáció diagnosztizálására, megelőzésére vagy kezelésére (helyi vagy szisztémás) használhatjuk. Ezek közé a klinikai indikációk közé tartoznak például a központi idegrendszer (CNS), az agy és/vagy gerincagy rendellenességei és betegségei, ideértve az Alzheimer-kórt, a Parkinson-kórt, a Lewy-test demenciát, a sclerosis multiplexet, az epilepsziát, a kisagyi ataxiát, a progresszív szupranukleáris bénulást, az izomsorvadásos (amyotroph) laterális szklerózist, a affektív rendellenességeket, a szorongást, a rögeszmés kényszerbetegséget, a személyiségi zavarokat, a figyelemhiányt, a figyelemhiányos hiperaktivitást, a Tourette-szindrómát, a Tay Sachs-szindrómát, a Niemann–Pick-szindrómát és a skizofréniát; a cerebrovaszkuláris rendellenességből, például agyi vagy gerincagyi sztrókból, CNS-fertőzésből, ideértve az agyhártyagyulladást és HIV-et, az agy vagy gerincagy tumorából, priontól adódó idegkárosodások; az autoimmun betegségek, ideértve a szerzett immunitási elégtelenséget, a reumaszerű ízületi gyulladás, a pikkelysömört, a Crohn-féle betegséget, a Sjögren-szindrómát, az izomsorvadásos laterális szklerózist és a lupuszt; a rákbetegségek, ideértve az emlő-, prosztata-, hólyag-, vese- és végbélrákot. Az IFN- β -t vagy mutánsait az emberek vagy állatoknak beadhatjuk szájon át, intraperitoneálisan, intramuszkulárisan, szubkután, intravénásan, orron át vagy tüdőn át, amint azt az orvos jónak látja.

A jelen találmány továbbá eljárást nyújt a folyékony gyógyszerkészítményben lévő polipeptid stabilitásának

növelésére, ahol a terápiás hatóanyagként szolgáló polipeptid a folyékony készítmény tárolása alatt aggregátumképződést mutat. Az eljárás abból áll, hogy a készítményhez egy aminosavbázisnak a polipeptidtárolás alatti aggregálódását csökkentő mennyiségét adjuk a folyékony készítmény megfelelő pH-tartományát biztosító puffer – ami egy, a sójától lényegében mentes savból áll – kíséretében.

A polipeptidnek vagy származékainak az aminosavbázissal vagy az aminosavbázis és egy vagy több további stabilizálószer kombinációjával a fentiekben tárgyalt puffer kíséretében történő stabilizálásával elérjük a polipeptidet tartalmazó folyékony gyógyszerkészítmény tárolás alatti stabilitásának növekedését. Ezek szerint a találmány eljárást nyújt az olyan folyékony gyógyszerkészítmény tárolás alatti stabilitásának növelésére, mely a tárolás alatt aggregátumot képző polipeptidet tartalmaz. A „megnövekedett tárolási stabilitás” fogalmán azt értjük, hogy a gyógyszerkészítményben lévő polipeptid vagy változata fokozottabb mértékben őrzi meg tulajdonságait, biológiailag aktív, nem aggregálódott konformációját a tárolás alatt, ezáltal kevésbé csökken terápiás hatékonysága azokhoz a folyékony készítményekhez képest, melyek az aminosavbázist vagy aminosavbázis és egy vagy több más stabilizálószer kombinációját és az itt tárgyalt puffert nem tartalmazzák.

A találmány módszere szerint elkészített polipeptid-tartalmú gyógyszerkészítmények tárolási stabilitásának megállapítására a szakterületen jól ismert módszereket használhatjuk. Az ilyen készítmények tárolási stabilitásának értékelésére általában a tárolási stabilitási profilokat használjuk. Ezekhez a profilokhoz úgy jutunk, hogy nyomon követjük a nem aggregálódott, biológiailag aktív molekulaformákban lévő polipeptid mennyiségének időbeli változását a változó tényezők, például kémhatás, stabilizálószer, a stabilizálószer koncentrációja függvényében, ahogyan azt az alábbi példákban szemléltetjük. Ezeket a stabilizációs profilokat különféle hőmérsékleti körülmények között vehetjük fel, például a fagyponton, hűtött körülmények között, szobahőmérsékleten vagy magasabb hőmérsékleten, például 40–50 °C-on. A tárolási stabilitást például a polipeptidek felezési idejére vonatkozó profilok összehasonlításával határozzuk meg. A „felezési idő” azt az időperiódust jelenti, mely alatt a nem aggregálódott, biológiailag aktív alakban lévő polipeptid mennyisége 50%-kal csökken. A jelen találmány módszere szerint elkészített, argininbázist és egy, a sójától lényegében mentes savat tartalmazó készítmények felezési ideje legalább 2–10-szer, előnyösen legalább 3–10-szer, még előnyösebben legalább 4–10-szer, legelőnyösebben legalább 5–10-szer hosszabb, mint azoké a készítményeké, melyek az aminosavbázist, az aminosavbázis és egy vagy több más stabilizálószer kombinációját és a sójától lényegében mentes savból, a savnak sójából vagy a sav és sója keverékéből álló puffert nem tartalmazzák. A jelen találmány célja a találmány szerinti előállítás eredményeként megnövekedett tárolási stabilitással rendelkező „stabilizált” gyógyszerké-

szítmény szolgáltatása. Az ilyen stabilizált készítménynek a felezési ideje 2–8 °C hőmérsékleten tartva legalább 18 hónap, előnyösebben 20 hónap, még előnyösebben 22 hónap, legelőnyösebben legalább 24 hónap.

Az elmondottak szemléltetésére az alábbiakban példákat adunk meg. A példák kizárólag illusztratív célzatúak, és a találmány oltalmi körét nem korlátozzák.

Példák

A konkrét példák tárgyalása előtt a kísérleti rész általános ismertetését adjuk meg az alábbiakban.

Az IL–2 egy potenciális mitogén, mely serkenti a T-sejt szaporodását. Széles körű gyógyászati alkalmazása van, mint a rákos áttétek kezelésének egyik hatóanyaga, a rákterápia egyik segédanyaga, mint a fertőzőes betegségek egyik összekötő ágense.

Az IL–2-terápiát alkalmazó különféle klinikai vizsgálatok előrehaladtával nyilvánvalóvá vált, hogy a szóban forgó fehérjét tartalmazó stabil folyékony készítmények kifejlesztésére nagy igény van. Az ilyen készítménynek a hagyományos liofilizált formátumoknál sokoldalúbbnak kell lennie, minthogy változó dozírozási rendeknek kell megfeleljen. A folyékony készítmény azért alkalmasabb, mert nincs szükség a rekonstrukcióra. Ezek a formátumok előre megtöltött, használatra kész fecskendők vagy – ha bakteriosztatikus ágensekkel összeférhetők – többdózisú készítmények lehetnek.

Leírták, hogy a folyékony készítményben lévő IL–2 tárolás alatti degradálódása legalább három úton történhet: aggregálódással, a metionin oxidációjával és deaminálással [Kunitani és munkatársai, J. Chromatography 359:391–401 (1986); Kenney és munkatársai, Lymphokine Res., 5:523–527 (1986)]. Továbbá az IL–2 érzékeny a lefagyasztás és a mechanikai nyíróerők okozta akut károsításra, ezért olyan IL–2-formátumokat kell kifejleszteni, melynél figyelembe vesszük úgy az akut károsodás, mint a krónikus degradáció veszélyét. Ebből következően, egy új, stabil, monomer rhIL–2-készítményt fejlesztettünk ki. Ezekben a készítményekben a fehérjemolekulák monomer, nem aggregált alakjukban vannak az oldatban, vagyis nincsenek az oldatban kovalens vagy hidrofób rhIL–2 oligomerek vagy aggregátumok. A készítmény néhány stabilizáló-ágenst tartalmaz, a legfontosabbként arginint és metionint, hogy stabilizálják a fehérjét a fizikai és kémiai károsítással, elsősorban a hosszas tárolás alatt bekövetkező aggregálódással, a metionin oxidálódásával és a deaminációval szemben. Emellett nemionos felületaktív anyag, poliszorbát 80 van a készítményben, hogy a fehérjét megvédje a lefagyasztás/felolvasztás és a mechanikai nyíróerők okozta akut károsodástól. Amint az alábbi példák mutatják, a találmány szerinti stabilizálószereknek rhIL–2-készítményhez adásával növeljük a tárolási stabilitást.

A példákban alkalmazott IL–2-molekula egy rekombináns humán IL–2-mutáns, aldezeleukin, melyben a cisztein-125 szerinrel helyettesített (dez-alanil-1, szerin-125 humán interleukin-2). Ezt a fehérjét E. coliban fejezzük ki, majd diafiltrációval és kationcserélő kroma-

tográfiaival tisztítjuk, amint azt a 4 931 543 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom leírja. A kiindulásként használt tisztított preparátum 3 mg/ml IL–2-t tartalmaz, és a formulálás vagy 200–250 mmol/l nátrium-kloridot tartalmazó 10 mmol/l koncentrációjú nátrium-citrát-pufferben, pH=6 (CM „pool” puffer), vagy 10 mmol/l nátrium-szukcinátot és 150 mmol/l L-arginint tartalmazó pufferben, pH=6, történik.

A szöveti faktor út inhibitor (TFPI) egy másik olyan fehérje, mely aggregálódik a folyékony készítmény tárolása alatt [Chen és munkatársai, J. Pharm. Sci., 88:881–888 (1999)]. A 8. példában olyan készítménnyel foglalkozunk, mely azt szemlélteti, hogy a szabad bázis alakjában lévő aminosav és a sójától lényegében mentes savból álló pufferrendszer milyen mérséklő hatással van a polipeptid aggregálódására.

Az alábbiakban ismertetésre kerülő eljárásokat használjuk az adott stabilizálószer IL–2 vagy TFPI degradációjára kifejtett hatásának meghatározására, vagyis az adott fehérjék folyékony készítmények tárolás alatti stabilitásának értékelésére.

UV-elnyelés mérésén alapuló módszer

A fehérjeoldat UV abszorbanciájának méréséhez Hewlett Packard Diode Array spektrométert (Model 8452) használunk. Vakként a megfelelő puffert használjuk. Az abszorbanciát 1,0 cm-es kvarcküvetében mérjük 280 nm-en. Az IL–2 mg/ml-ben megadott koncentrációjának a kiszámításához a $0,70 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{cm}^{-1}$ extinkciós koefficienszt használjuk.

RP-HPLC módszer

A fordított fázisú HPLC vizsgálatokat 717 típusú Waters automata mintavevővel (Waters Corporation, Milford, Maine) ellátott Waters 626 LC rendszerrel végezzük Vydac 214BTP54 C₄ oszlopon és Vydac 214GCC54 előoszlopon (Seponations Group, Hesperia, California). Az oszlopokat előzetesen az „A” mozgófázissal (10%-os acetonitril, 0,1% TFA) egyensúlyozzuk ki, majd ráviszunk 20 µg IL–2-mintát, és a fehérjét a „B” mozgófázissal (100% acetonitril, 0,1% trifluor-ecetsav, TFA) eluáljuk, a gradienelúcióhoz az arányát 50 perc alatt 1,0 ml/perc átfolyási sebesség mellett 5%-ról 100%-ra emelve. Az oldható IL–2 fő tömege a 32. perc környékén jön le. A detektálást 214 nm-en végezzük, Waters 486 detektort használva. Az adatok összegyűjtése és feldolgozása Perkins–Elmer Turbochrom rendszerrel történik (PE Nelson, Cupertino, California).

Az RP-HPLC módszerrel nyert csúcsok: B csúcs, a fő monomer IL–2; A csúcs az oxidált metionin fehérje (főként oxidált Met¹⁰⁴); B1 csúcs deaminált fehérje (feltehetően Asn⁸⁸); ezek előtt és után más ismeretlen molekulák csúcsai is eluálódnak.

SEC–HPLC módszer

A méretkizárásos HPLC-t (SEC–HPLC) TSK SWx1 védőoszloppal ellátott TOSOHAAS G2000SWx1 oszlopon végezzük (TOSOHAAS, Montgomeryville, Pennsylvania). A 10 mmol/l nátrium-foszfátot, pH=7 és

200 mmol/l ammónium-szulfátot tartalmazó mozgófázist 1,0 ml/perc átfolyási sebességgel visszük az oszlopra. A monomer IL–2 kb. a 14. percben eluálódik. A detektálást 214 nm-en végezzük Waters 486 detektorttal. Az adatok összegyűjtéséhez és feldolgozásához Perkin–Elmer Turbochrom rendszert használunk.

Az eredeti SEC–HPLC protokoll IL–2 monitorozására kifejlesztett módosítását használva, az rhIL–2 nagy része egyetlen csúcsban eluálódik, valószínűleg monomer alakban, minthogy az aggregátumot disszociáló ágensek, például az SDS, karbamid és DTT hozzáadása az elúcióra nincs hatással.

IEX-HPLC

Az ioncserélő-HPLC (IEX-HPLC) vizsgálatot Pharmacia Mono-S HR 5/5 üvegoszlopon végezzük Waters 626 LC rendszert alkalmazva, amit egy 717 fűtött/hűtött automata mintavevővel egészítünk ki, ahogyan azt Chen és munkatársai leírják [J. Pharm. Sci., 88:881–888 (1999)]. Az oszlopot 80% „A” mozgófázisból [20 mmol/l nátrium-acetátot tartalmazó oldat: acetonitril, 70:30 (térfogat/térfogat), pH=5,4] és 20% „B” mozgófázisból [20 mmol/l nátrium-acetát és 1 mol ammónium-kloridot tartalmazó oldat: acetonitril, 70:30, pH=5,4] álló eleggyel ekvilibráljuk. A minta injektálása után a rekombináns humán (rh) TFPI-t gradienelúcióval oldjuk le, a „B” komponens arányát 21 perc alatt, 0,7 ml/perc átfolyási sebesség mellett 85%-ra emelve. Az rhTFPI kb. a 16,5. percnél jön le egyetlen csúcsként. A detektálást 280 nm-en végezzük Waters 486 abszorpciós detektort használva. Az adatok összegyűjtéséhez és feldolgozásához Perkin–Elmer Turbochrom rendszert használunk. A fehérjekoncentráció meghatározásához az integrált csúcs alatti területet standard koncentrációgörbéhez viszonyítjuk.

SDS-PAGE módszer

A nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamidgél-elektroforézist (SDS-PAGE) Laemmli protokollal hajtjuk végre. Az előre kiöntött 18%-os Norvex Trisz-glicines gél egyes pályáira kb. 5 µg IL–2-t viszunk fel, és az elektroforézist 100 V feszültségnél végezzük. A fehérjesávokat Coomassie-kékkel festjük, és Imagequant T rendszerrel ellátott Molecular Dynamics denzitóméterrel analizáljuk (Molecular Dynamics, Sunnyvale, California).

Az IL–2 bioaktivitásának vizsgálata a HT–2 sejtszaporodás és MTT festés alkalmazásával

Az IL–2 hatáserősségét in vitro végzett HT–2 sejtek szaporodásán és MTT festésen keresztül határozzuk meg [Gillis és munkatársai, J. Immunology, 120:2027–2032 (1978); Watson, J. Exp. Med., 150(6):1510 (1979)]. A szövettenyésztő lemez bemélyedéseibe 1×10^4 egérféle HT–2 sejtet helyezünk. Ezeknek a sejteknek a növekedése IL–2 függő. Standard anyaggal, kontrollal és a vizsgálati vegyülettel végzett párhuzamos tesztekkel állítunk össze. 22–26 óras, 37 °C hőmérsékleten történő inkubálás

után, minden tenyészethez MTT festéket adunk, és az inkubációt 37 °C hőmérsékleten folytatjuk 3-4 órán át. 20% SDS-t adunk a tenyészetekhez, és szobahőmérsékleten tartva egy éjszakán át, eltávolítjuk a festéket. Az abszorbananciát 570 nm-en mérjük és a nyert adatokból a WHO International standardok alapján meghatározzuk az IL-2 bioaktivitását.

A pH és az ozmolaritás mérése

Az egyes készítmények kémhatását Orin pH-mérővel (Modell 611, Orion Research Incorporated Laboratory Products Group, Boston, Massachusetts) mérjük. A pH-mérőt a gyártó által ajánlott kétpufferes kalibrációs eljárással kalibráljuk, pH=4 (Fisher Scientific, katalógusszám: SB101-500) és pH=7 Fisher Scientific, katalógusszám: SB107-500) standardokat használva.

A készítmények ozmolaritását a Wescor cég Vapor Pressure Osmometerével (Model 5500; Wescor Inc., Logan, Utah) mérjük. Az ozmometert a gyártó cég két standardjának – 290 mmol/kg standard (Wescor, rendelési szám: OA-010) és 1000 mmol/kg standard (Wescor, rendelési szám: OA-029) – felhasználásával kalibráljuk.

Ezek az eljárások felhasználhatók a különféle stabilizálószeres rhIL-2 aggregálódáson, a metionin oxidálódásán és deamidáláson keresztüli degradálódására gyakorolt hatásának mennyiségi értékelésére.

1. példa

A különféle stabilizálószeres hatás az rhIL-2 fehérje aggregálódására és tárolási stabilitására

Az enyhén savastól az alkalikus kémhatásig terjedő pH-tartományú folyékony készítményben az rhIL-2 fehérje fő degradálódási útja az aggregálódás. Az ilyen pH-tartományban lévő rhIL-2-oldatot magasabb hőmérsékleten tartva, a fehérje gyorsan aggregálódik, ami látható csapadékkiváláshoz vezet. A látható fehérjecsapadék 0,2 µm-es szűrőn kiszűrhető. Az oldatban maradó oldott fehérje mennyisége többféle analitikai eljárással meghatározható, így RP-HPLC-vel, SEC-HPLC-vel és UV-elnyelés méréssel. Az aggregálódás a biológiai aktivitás csökkenését is eredményezi, amit az itt leírt in vitro biológiai vizsgálattal határozhatunk meg.

Az itt leírt analitikai eljárásokkal nyomonkövetve az oldott rhIL-2 megemelt hőmérsékleten lezajló mennyiségi változását az inkubáció függvényében, meghatározzuk az rhIL-2 különféle körülmények között megnyilvánuló tárolási stabilitását.

1A) A cukrok és aminosavak hatása

A cukroknak az rhIL-2 tárolási stabilitására gyakorolt hatását szorbit, szacharóz és mannit esetében vizsgáljuk. A készítmény 0,2 mg/ml rhIL-2-t, 10 mmol/l nátrium-szukcinátot, pH=6 és 270 mmol/l adott cukrot tartalmaz. A mintákban maradó oldható rhIL-2 mennyiségét az inkubációs idő függvényében ábrázoljuk az 1. ábrán. A szacharóz és a mannit görbéje átfedi egymást, jelezve, hogy az IL-2 tárolási stabilitására gyakorolt hatásuk hasonló. A szorbit görbéje kissé magasabban helyezkedik el, mint a másik két cukoré, vagyis a stabilizáló hatása azokénál kissé erősebb.

Az aminosavaknak a tárolási stabilitásra gyakorolt hatását a 2. ábra mutatja. A készítmények 0,1 mg/ml IL-2-t, 10 mmol/l nátrium-szukcinátot, pH=6, és 150 mmol/l. adott aminosavat tartalmaznak. Amint a 2. ábráról leolvashatjuk, a stabilizálóhatás sorrendje: Arg Asp Lys Met Asn Leu=Ser=Pro=Gly.

A további vizsgálatok megerősítik a szorbit és az arginin stabilizálóhatását és megmutatják, hogy az rhIL-2 tárolási stabilitására gyakorolt hatásuk koncentrációfüggő. Az rhIL-2 tárolási stabilitása fokozódik, ha a szorbit koncentrációját 50 mmol/l értékről 150 mmol/l és végül 270 mmol/l értékre növeljük (3. ábra). Ugyancsak nő az rhIL-2 tárolási stabilitása a készítményben lévő arginin koncentrációjának megemelésével (4. ábra).

1B) A készítmény pH-értékének hatása

A készítmény kémhatásának az rhIL-2 tárolási stabilitására gyakorolt hatását nátrium-kloridot, szorbitot és arginint tartalmazó készítményekben vizsgáljuk. Az 50 °C hőmérsékleten tartott készítményekben oldva lévő IL-2 felezési idejét a pH-értékek függvényében ábrázoljuk az 5. ábrán. A felezési idő ($t_{1/2}$) fogalmán itt azt az időtartamot értjük, mely ahhoz szükséges, hogy a mintában oldott fehérje mennyisége 50%-kal csökkenjen. A magasabb felezési idő nagyobb tárolási stabilitást jelent.

Amint az 5. ábra mutatja, az rhIL-2 fehérje aggregálódással szemben stabilizáltságának pH-optimuma függ az oldatban lévő stabilizálószerrel. A nátrium-klorid esetében az rhIL-2 maximális tárolási stabilitása pH=4 értéken érhető el, ahol az 50 °C hőmérsékleten tartott rhIL-2 felezési ideje kb. 23 nap. A szorbitos készítményben az rhIL-2 növekvő stabilitást mutat, ahogy a pH-értéket növeljük, a maximális stabilitást pH=5 értéknél érve el, ahol az 50 °C hőmérsékleten tartott rhIL-2 felezési ideje 26 nap. A legnagyobb stabilitást (azaz a leghosszabb felezési időt) a stabilizálószerként használt argininnel érjük el a készítmény pH=6,0 értékénél, amikor az 50 °C hőmérsékleten tartott fehérje felezési ideje kb. 32 nap. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az arginin előnyösebb stabilizálószer, mint a szorbit vagy a nátrium-klorid, minthogy stabilizálóhatásának pH-optimuma közelebb áll a fiziológiai inkább elfogadható pH-értékhez.

1C) A pufferrendszer hatása

Általánosan szokásos a megfelelő pH-érték biztosítására a készítményben 10 mmol/l koncentrációjú pufferrendszert használni. Például egy 5,8 pH-értékű készítményhez a borostyánkősavnak és egy sójának, például a nátrium-szukcinátnak 10 mmol/l koncentrációjú keverékét használjuk. Ha ezt a pufferrendszert választjuk, a készítményben 150 mmol/l arginin-HCl-et alkalmazhatunk elsődleges stabilizálószerként, de 150 mmol/l argininbázist már nem, minthogy a 150 mmol/l koncentrációban lévő argininbázis már nem

teszi lehetővé, hogy 10 mmol/l koncentrációjú pufferrel a kémhatást levihezzük pH=5,8 értékre.

Az arginin-hidroklorid azonban magasabb ozmolaritást eredményez, mint az argininbázis. A 150 mmol/l arginin-HCl-ot tartalmazó, 10 mmol/l borostyánkősav/nátrium-szukcinát pufferrel pH=5,8 értékre beállított készítmény már közel izotóniás, minthogy az ozmolaritása 253 mmol/kg. Ennek a készítménynek a felezési ideje 50 °C hőmérsékleten 8 nap (1. táblázat). A készítményben azonban kívánatos, hogy nagyobb argininkoncentrációt alkalmazzunk, mert ezzel növelhetjük a tárolási stabilitását. Amikor az arginin koncentrációját arginin-HCl alakjában 230 mmol/l értékre növeljük, és a kémhatást 10 mmol/l borostyánkősav/nátrium-szukcinát pufferrel pH=5,8 értékre állítjuk be, az 50 °C hőmérsékleten mért felezési idő megduplázódik (kb. 17 nap), de az oldat hipertóniás lesz, az ozmolaritása kb. 372 mmol/kg.

Ha a készítményhez a pH=5,8 érték beállításánál borostyánkősavat, argininként argininbázist használunk, az argininbázis koncentrációjának 230 mmol/l értékre való növelésével az 50 °C hőmérsékleten mért felezési idő ugyancsak megduplázódik kb. 16 napra hosszabbodva. A tárolási stabilitásnak ezt a növekedését azonban úgy érzük el, hogy közben az oldat közel izotóniás marad, az ozmolaritása 271 mmol/kg (1. táblázat). Ily módon 230 mmol/l koncentrációban használható az argininbázis az rhIL-2 tárolási stabilitásának növeléséhez anélkül, hogy a készítmény túllépne az izotonitást.

1. táblázat

Az rhIL-2-készítmények ozmolaritása és tárolási stabilitása

A tárolási stabilitást a felezési idővel ($t_{1/2}$) fejezzük ki. Az oldatban megmaradó oldott rhIL-2 mennyiségét RP-HPLC analízissel mérjük. A tárolás 50 °C hőmérsékleten történik. Az arginin-HCl-ot tartalmazó készítmény összetétele: 0,5 mg/ml rhIL-2, 1 mmol/l EDTA és 150 vagy 230 mmol/l L-arginin-HCl, a kémhatás pH=5,8 értékre beállítva 10 mmol/l koncentrációjú borostyánkősav/nátrium-szukcinát pufferrel. Az argininbázist tartalmazó készítmény összetétele: 0,5 mg/ml rhIL-2, 1 mmol/l EDTA, 150 vagy 230 mmol/l L-argininbázis és 81 mmol/l vagy 128 mmol/l borostyánkősav a pH=5,8 érték beállításához.

Készítmény (valamennyiben 1 mmol/l EDTA; pH=5,8)	Ozmolaritás (mmol/kg)	$t_{1/2}$ 50 °C-on (nap)
150 mmol/l Arg HCl, 10 mmol/l Na-szukcinát/borostyánkősav	253	8,0
150 mmol/l Arg bázis, 81 mmol/l borostyánkősav	192	9,9
230 mmol/l Arg HCl, 10 mmol/l Na-szukcinát/borostyánkősav	372	16,9

5

Készítmény (valamennyiben 1 mmol/l EDTA; pH=5,8)	Ozmolaritás (mmol/kg)	$t_{1/2}$ 50 °C-on (nap)
230 mmol/l Arg bázis, 128 mmol/l borostyánkősav	271	16,0

Ezt a két pH-beállítási módszert más pufferrendszerekkel is vizsgáltuk. Amikor a készítményben 150 mmol/l arginin-HCl-ot használunk és a pH=5,8 értéket 10 mmol/l savval és nátriumsójjal állítjuk be, valamennyi készítmény az izotón ozmolaritás alatt van, kb. 290 mmol/kg. Az rhIL-2 50 °C hőmérsékleten mért felezési ideje ezeknél a készítményeknél 15–20 nap. Amikor 230 mmol/l argininbázist használunk és a pH-értéket a sójától lényegében mentes savval állítjuk be, a citromsavat vagy borostyánkősavat alkalmazó készítmények ozmolaritása még az izotonitás alatt marad; foszforsav esetében kissé az izotonitás felett van vagy például glutaminsav vagy ecetsav alkalmazásakor a készítmény már hipertóniás. Az 50 °C hőmérsékleten mért felezési idő azonban 30 nap fölé emelkedik. Így, pufferként citromsavat vagy borostyánkősavat, mindkettőt lényegében a sójától mentes állapotban használva, a bázis alakjában lévő arginin koncentrációját 230 mmol/l értékre növelhetjük, ami az rhIL-2 tárolási stabilitásának fokozódását eredményezi.

30

2. táblázat

Az rhIL-2-készítmények ozmolaritása és tárolási stabilitása

Készítmény	Ozmolaritás (mmol/kg)	$t_{1/2}$ (nap)
150 mmol/l Arg HCl, 10 mmol/l Na-citrát/citromsav	248	20,5
230 mmol/l Arg bázis, 86 mmol/l citromsav	228	36,1
150 mmol/l Arg HCl, 10 mmol/l Na-szukcinát/borostyánkősav	257	19,1
230 mmol/l Arg bázis, 128 mmol/l borostyánkősav	285	29,2
150 mmol/l Arg HCl, 10 mmol/l Na-foszfát/foszforsav	260	15,6
230 mmol/l Arg bázis, 193 mmol/l foszforsav	329	29,9
150 mmol/l Arg HCl, 10 mmol/l Na-glutamat/glutaminsav	264	14,6
230 mmol/l Arg bázis, 225 mmol/l glutaminsav	407	47,5
150 mmol/l Arg HCl, 10 mmol/l Na-ace-tát/ecetsav	259	20,8

2. táblázat (folytatás)

Készítmény	Ozmolaritás (mmol/kg)	$t_{1/2}$ (nap)
230 mmol/l Arg bázis, 250 mmol/l ecetsav	408	31,9

1D) A fehérjekoncentráció hatása

A fehérjekoncentráció hatását 10 mmol/l nátrium-szukcinátot, pH 6 és 150 mmol/l arginint tartalmazó készítményekkel vizsgáljuk. A 6. ábrán az oldható rhIL-2 50 °C hőmérsékleten mért felezési idejét a fehérjekoncentráció függvényében ábrázoljuk. Az rhIL-2 tárolási stabilitása nő, amint a fehérjekoncentráció csökken. Ez a felismerés összhangban van azzal a kísérleti megfigyeléssel, hogy az aggregálódás a folyékony készítményekben lévő rhIL-2 fő degradálódási útja.

1E) A nemionos felületaktív polisorbát 80 hatása

A polisorbát 80 (Tween 80 vagy Tw 80) rhIL-2 tárolási stabilitására gyakorolt hatását a következő összetételű készítményeken vizsgáljuk: 0,5 mg/ml IL-2, 230 mmol/l argininbázis, 128 mmol/l borostyánkősav, pH=5,8 értékre beállítva, 1 mmol/l EDTA és 0,02 vagy 0,1% polisorbát 80. Amint a 3. táblázatban összefoglalt adatok mutatják, a polisorbát 80-at tartalmazó mindkét készítménynél az oldott IL-2 50 °C hőmérsékleten mért felezési ideje 16 napról 9 napra csökken, amint az RP-HPLC vizsgálatok mutatják. Ezek szerint a polisorbát 80-nak a készítményben való jelenléte csak a proteinaggregációra gyakorolt hatása alapján kedvezőtlennek tekinthető. Ez az ágens azonban stabilizálódással rendelkezik a lefagyasztás/felolvasztás és a mechanikai nyíróerők által kiváltott fehérjekárosítással szemben, így az ilyen fehérjét tartalmazó készítmény feldolgozása alatt jelenléte jótékony hatással jár, amint azt az alábbi példák bizonyítják.

A szorbitalapú két készítmény tárolási stabilitását is vizsgáltuk. Noha az RP-HPLC analízissel kapott értékek összevethetők az arginines készítmények értékeivel, a SEC-HPLC analízissel megállapított felezési idők sokkal rövidebbeknek adódnak, arra utalva, hogy ezekben a készítményekben az oldott állapotban lévő rhIL-2 fehérje nagy része aggregálódott alakban van.

3. táblázat

Az 50 °C hőmérsékleten tartott készítményekben lévő rhIL-2 felezési ideje ($t_{1/2}$) az oldatban maradt rhIL-2 (B csúcs) RP-HPL C-vel és SEC-HPLC-vel mért és az in vitro biológiai vizsgálattal mért mennyisége alapján

Készítmény	$t_{1/2}$ 50 °C-on (nap)		
	RP	SEC	bioaktív-tás
230 mmol/l Arg bázis, 128 mmol/l borostyánkősav	16,0	21,3	25,6

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Készítmény	$t_{1/2}$ 50 °C-on (nap)		
	RP	SEC	bioaktív-tás
230 mmol/l Arg bázis, 128 mmol/l borostyánkősav 0,02% Tw 80, pH=5,8	9,7	12,4	NA
230 mmol/l Arg bázis, 128 mmol/l borostyánkősav, 0,1% Tw 80, pH=5,8	9,1	12,2	24,5
270 mmol/l szorbit, 10 mmol/l Na-szukcinát, 0,1% Tw 80, pH=4,5	31,7	3,6	NA
270 mmol/l szorbit, 10 mmol/l Na-szukcinát, 0,1% Tw 80, pH=5,0	14,4	2,4	21,3

NA=nincs adat

A 3. táblázatból kitűnik, hogy az argininbázis/borostyánkősav rhIL-2-készítmény esetében az RP-HPLC módszerrel meghatározott felezési idő kissé rövidebb, mint a SEC-HPLC analízissel és még rövidebb, mint az in vitro biológiai módszerrel kapott érték. A SEC-HPLC-vel nyert fő rhIL-2-frakciót tovább vizsgáltuk. Ezek a minták nem mutatnak az elúciós időben eltérést akár SDS, karbamid vagy DTT jelenlétében vagy távollétében vizsgáljuk őket, jelezve, hogy az rhIL-2 monomer alakban van jelen. Azonban SEC-HPLC módszerrel nem lehet megkülönböztetni az egyes monomer alakokat, például az oxidált metioninmonomereket (A csúcs) és az inaktív fő monomereket (B csúcs). Ezért várható egy kis eltérés a meghatározott felezési idők között.

A 3. táblázatban szereplő adatokat szolgáltató in vitro biológiai vizsgálatokat a közegben lévő 0,1% nátrium-dodecil-szulfát (SD) jelenlétében hajtjuk végre. Ugyanis mielőtt a vizsgálati mintát hozzáadnánk a tenyésztőlemezben lévő HT-2 sejtekhez, a mintákat 0,1% SDS-t tartalmazó hígítóval hígítjuk. Lehetséges, hogy az SDS-t tartalmazó hígítóval történő hígításkor valamennyi rhIL-2-aggregátum monomer alakba disszociálódik vissza, aminek következtében az adott készítmény biológiai aktivitását túlértékeljük, ezért a stabilitási vizsgálatokat SDS-t tartalmazó (+S) és SDS-t nem tartalmazó (-S) hígítókkal végezzük. A mintákat továbbá 0,2 µ-os szűrőn végzett szűrési kezelésnek (+F) vetjük alá vagy a szűrést elhagyjuk (-F). A szűrés ugyanis képes eltávolítani a nagy proteinaggregátumokat, amint az szemmel látható. A minták említett körülmények között mért biológiai aktivitásait a 4. táblázatban mutatjuk be, összehasonlítva az RP-HPLC eljárással kapott tárolási stabilitási értékekkel. Az értékeket a -70 °C hőmérsékleten tartott azonos mintáknál kapott biológiai aktivitási értékekhez viszonyított százalékokban adjuk meg.

Általában az SDS-t tartalmazó és nem szűrt minták magasabb biológiai aktivitást mutatnak, mint azok, melyek hígításánál SDS-t nem alkalmazunk, és amelyeket a HT-2 sejtekkel való kontaktusba hozás előtt leszűrünk. A szűrt, valamint hígításnál SDS-t nem tartalmazó hígítóval hígított mintáknál kapott biológiai aktivitási értékek általában jól megegyeznek az RP-HPLC módszerrel mért értékekkel. Ez a módszer tehát a monomer rhIL-2 valós bioaktivitásának mérésére javasolt.

4. táblázat

A 2 héten át 40 °C vagy 50 °C hőmérsékleten tartott mintákban az RP-HPLC analízissel mért oldható rhIL-2 értékeken alapuló és az in vitro bioaktivitási analízissel nyert értékeken alapuló adatok összehasonlítása

Valamennyi adatot a -70 °C hőmérsékleten tartott megfelelő mintánál kapott értékhez viszonyított százalékos értékben adjuk meg. A készítmények összetétele: 0,5 mg/ml rhIL-2, 230 mmol/l L-arginin-bázis, 128 mmol/l borostyánkősav, pH=5,8, 1 mmol/l EDTA, 0,1% poliszorbát 80-nal (#1) vagy anélkül (#2). A mintákat a 0,15 SDS-t tartalmazó vagy nem tartalmazó közeggel való hígítás előtt 0,22 µm-es szűrőn szűrjük vagy nem szűrjük (+F, illetve -F).

Minta	Bioaktivitás, %*				RP, %*
	-F, +S	+F, +S	-F, -S	+F, -S**	
#1, 40 °C	106	100	104	100	101
#1, 50 °C	92	79	60	53	58
#2, 40 °C	101	69	106	112	98
#2, 50 °C	60	38	62	47	42

* A -70 °C hőmérsékleten tartott hasonló mintáknál kapott értékekhez viszonyított százalékban kifejezett értékek.

** A monomer IL-2-vizsgálatára ajánlott eljárás.

1F) Tartósítószerrel való összeférhetőség

A tartósítószerrel való összeférhetőséget azért kell vizsgálnunk, mert szükség van a több dózist tartalmazó készítmények kifejlesztésére. A tartósítóknak az IL-2 stabilitására kifejtett hatását két gyorsított eljárással vizsgáljuk. Az 1. vizsgálatnál a benzil-alkohol, az m-krezol és a fenol szűrővizsgálatát az alábbi összetételű készítményekkel végzünk: 0,2 mg/ml IL-2, 10 mmol/l nátrium-szukcinát, pH=6 és 160 mmol/l arginin. A 2. vizsgálatnál a benzetónium-klorid, a benzalkónium-klorid, a metil-pargén/propil-parben és a klór-butanol szűrővizsgálatát végezzük az alábbi összetételű készítményekkel: 0,2 mg/ml IL-2, 230 mmol/l L-arginin-bázis, 128 mmol/l borostyánkősav, pH=5,8, 1 mmol/l EDTA-dinátrium, 0,1% poliszorbát 80. Az oldható IL-2 felezési idejét RP-HPLC analízissel állapítjuk meg a 40 °C hőmérsékleten tartott mintáknál. A kapott adatokat az 5. táblázatban foglaljuk össze.

Valamennyi megvizsgált tartósítószer csökkenti a megemelt hőmérsékleten tartott rhIL-2 stabilitását. Az

1. vizsgálatnál a tartósítószer nem tartalmazó, 40 °C hőmérsékleten tartott készítményekben az oldott rhIL-2 felezési ideje 74 nap. A hozzáadott benzil-alkohol, m-krezol vagy fenol 5–10-szeres mértékben csökkenti a felezési időt. A 2. vizsgálatnál a tartósítószer hatása kevésbé erős. A benzetónium-klorid kevesebb mint félszeresen, a többi tartósítószer több, mint kétszeresen csökkenti az oldható rhIL-2 felezési idejét. A megvizsgált tartósítószer között még a benzetónium-klorid csökkenti legkevésbé az rhIL-2 stabilitását.

5. táblázat

A tartósítószer tartalmazó, 40 °C hőmérsékleten tartott készítményekben lévő oldott rhIL-2 felezési ideje ($t_{1/2}$)

1. vizsgálat – a készítmény összetétele: 0,2 mg/ml rhIL-2, 10 mmol/l nátrium-szukcinát, pH=6, 150 mmol/l L-arginin-bázis és a tartósítószer.

2. vizsgálat – a készítmény összetétele: 0,2 mg/ml rhIL-2, 230 mmol/l L-arginin-bázis, 128 mmol/l borostyánkősav, pH=5,8, 1 mmol/l EDTA-dinátrium, 0,1% poliszorbát 80 és tartósítószer.

Tartósítószer	$t_{1/2}$ 40 °C-on (nap)
1. vizsgálat	
Tartósítószer nélkül	74,0
0,9% (tömeg/térfogat) benzil-alkohol	16,0
0,25% (tömeg/térfogat) m-krezol	7,5
0,5% (tömeg/térfogat) fenol	11,0
2. vizsgálat	
Tartósítószer nélkül	261,0
0,01% (tömeg/térfogat) benzetónium-klorid	185,0
0,01% (tömeg/térfogat) benzalkónium-klorid	67,0
0,18% (tömeg/térfogat) metil-parabén és 0,02% (tömeg/térfogat) propil-parabén	113,0
0,5% (tömeg/térfogat) klór-butanol	84,0

Noha a tartósítószernek megemelt hőmérsékleten kifejezett destabilizálóhatása van az rhIL-2-re, megvizsgáljuk a rövid időtartamú, 4 °C vagy 25 °C hőmérsékleten való tárolás alatti hatását is. A hat tartósítószer ugyanolyan összetételű készítményeken vizsgáljuk: 0,2 mg/ml rhIL-2, 230 mmol/l L-arginin-bázis, 128 mmol/l borostyánkősav, 1 mmol/l EDTA, 5 mmol/l metionon és 0,1% poliszorbát 80, pH=5,8. A 6. táblázatban megadjuk az egy év tárolás utáni megmaradt oldott rhIL-2 mennyiségeket. Úgy az RP-HPLC analízissel, mint az in vitro biológiai vizsgálatokkal nyert eredmények azt mutatják, hogy a 0,25%-os m-krezolt tartalmazó készítmény kivételével kimutatható veszteség nincs.

6. táblázat

A 4 °C vagy 25 °C hőmérsékleten tartott, tartósítószeret tartalmazó készítmények egyéves tárolási stabilitása az RP-HPLC kromatogram integrált csúcs alatt területeinek alapján meghatározott és százalékban kifejezett megmaradt oldott rhIL–2 mennyiségeivel és az in vitro bioaktivitási értékekkel szemlélítve

A kontrollminta összetétele: 0,2 mg/ml IL–2, 230 mmol/l L-arginin-bázis, 128 mol/l borostyánkősav, 1 mmol/l EDTA, 5 mmol/l metionin és 0,1% poliszorbát 80, pH=5,8.

Tartósítószer	RP-HPLC-vel meghatározott IL–2-mennyiség a kezdeti érték %-ában		In vitro bioaktivitás (×10° IU/ml)		
	4 °C	25 °C	t=0	1 év, 4 °C	1 év, 25 °C
Kontroll	102	93	3,8	3,3	2,5
0,9% benzil-alkohol	100	88	4,8	4,0	5,0
0,25% m-krezol	98	60	5,8	2,6	2,5
0,5% fenol	99	87	4,7	3,9	3,2
0,01% benzalkónium-klorid	102	93	5,5	3,9	4,4
0,01% benzetónium-klorid	98	89	5,4	3,2	4,7
0,5% klór-butanol	99	91	5,1	3,6	4,5

2. példa

A különféle tényezők hatása a metionin oxidációjára és az rhIL–2 tárolási stabilitására

Az IL–2-nél a metionin oxidációját előzőleg Kunitani és munkatársai [J. Chromatography, 359:391–402 (1986)] és Sasaoki és munkatársai [Chem. Pharm. Bull., 37(8): 2160–2164 (1989)] vizsgálták. Az IL–2 négy metioninrészt tartalmaz, melyek a polipeptidlánc 23., 39., 36. és 104. helyén találhatók. Ezek közül a fehérje felszínén elhelyezkedő Met¹⁰⁴ a legoxidatívabb. Az RP-HPLC kromatogramon az oxidált metioninú IL–2 (A csúcs) a nem oxidált IL–2-nél (B csúcs) korábban eluálódik, így a kettő elválasztható egymástól. A Met²³ és a Met³⁹ kevésbé hajlamos az oxidálódásra, csak rendkívüli oxidatív körülmények között oxidálódnak, feltehetően azért, mert a proteinmolekula belsejében vannak. Az ezeken a helyeken oxidálódott molekula azonos időben eluálódik, mint a Met¹⁰⁴ helyen oxidált. A Met⁴⁶ oly mélyen elrejtett a fehérje molekulában, hogy csak akkor oxidálódik, ha a protein teljesen kitekeredik.

Az IL–2-ben lévő metioninok oxidálódásának a tanulmányozása a Met¹⁰⁴ oxidálódására koncentrált, mert

minthogy ez a metioninrész a legérzékenyebb az oxidációra, és ennek az oxidálódásnak a megakadályozása a többi metionint is megvédi az oxidálódástól.

2A) A pH hatása

A metionin oxidálódását pH=3–9 tartományban vizsgáljuk a következő összetételű készítményekben: 0,2 mg/ml IL–2, 150 mmol/l nátrium-klorid és 10 mmol/l különféle puffer. A metionin oxidációját a t=0 és t=3 hónap tárolási idő után mért A csúcs százalékos arányának változásával (azaz a Met¹⁰⁴ oxidált molekula mennyiségével) jellemezzük. Amint a 7. táblázat adataiból kitűnik, a pH-érték a t=0 időben nincs hatással, kivéve a citrátpuffert a pH=6 értéknél, ahol az A csúcs 6%-ot tesz ki, míg az összes többi esetben 5%-ot.

Három hónapos (t=3) tárolás után az A csúcs aránya a pH-érték emelkedésével nő, jelezve, hogy a Met¹⁰⁴ metionin oxidálódása báziskatalizált. A pH=6 kémhatású szukcinátpuffer jobb, mint a citrátpuffer, minthogy a szukcinátos készítményekben az A csúcs aránya alacsonyabb.

7. táblázat

A metionin oxidálódásának analízise RP-HPLC módszerrel; az oxidált metioninú IL–2-t reprezentáló A csúcsnak az oldott IL–2 összmenyiségéhez (A+B csúcs) viszonyított százalékos aránya a pH=3–9 tartományban, t=0 és t=3 hónap időpontokban mérve

Puffer és pH	A csúcs százalékos aránya az oldott IL–2 összmenyiségéhez viszonyítva				
	t=0	t=3 hónap			
		–70 °C	4 °C	25 °C	40 °C
10 mmol/l glicin, pH=3	5	4	5	6	7
10 mmol/l acetát, pH=4	5	5	6	7	6
10 mmol/l acetát, pH=5	Na	7	8	9	9

7. táblázat (folytatás)

Puffer és pH	A csúcs százalékos aránya az oldott IL–2 összmennyiségéhez viszonyítva				
	t=0	t=3 hónap			
		–70 °C	4 °C	25 °C	40 °C
10 mmol/l citrát, pH=6	6	6	8	12	14
10 mmol/l szukcinát, pH=6	5	6	7	4	9
10 mmol/l foszfát, pH=7	5	7	8	11	5
10 mmol/l borát, pH=9	5	11	15	14	NA

2B) Az EDTA, a poliszorbát 20, a poliszorbát 80 és a magnézium-klorid hatása

Egy fémkatalizátor, két nemionos felületaktív anyag és egy kétértékű fémion metioninoxidációra gyakorolt hatását szemléltetjük a 8. táblázat adataival. A poli-

15 szorbát 20 és poliszorbát 80 jelenléte úgy a t=0, mint a t=1 hónap időpontokban fokozza a metionin oxidálódását, ezzel szemben az EDTA és a magnézium-klorid csökkenti az oxidált metioninú fehérje arányát az 1 hónapra át 40 °C és 50 °C hőmérsékleten tárolt készítményekben.

8. táblázat

Az oxidált metioninú fehérjét reprezentáló A csúcs aránya az oldott IL–2 összmennyiségéhez (A+B csúcs) viszonyítva a t=0 és t=1 hónap időpontokban

A kontroll készítmény összetétele: 0,2 mg/ml IL–2, 10 mmol/l nátrium-szukcinát, pH=6, 150 mmol/l arginin.

Készítmény	A csúcs százalékos aránya				
	t=0	t=3 hónap			
		–70 °C	4 °C	40 °C	50 °C
Kontroll	2,8	3,5	5,1	19,7	36,3
1 mmol/l EDTA	2,5	3,5	5,0	9,5	14,0
0,1% poliszorbát 80	5,8	4,3	6,9	21,5	41,4
1 mmol/l EDTA+0,1% poliszorbát 80	5,9	4,2	6,9	12,1	19,2
0,1% poliszorbát 20	4,1	5,4	9,6	25,3	42,8
5 mmol/l MgCl ₂	3,9	4,8	6,9	9,7	12,1

2C) A metionin hatása

Megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van a metionin az IL–2 metioninrészeinek oxidálódására. A 9. táblázatban megadott adatok azt bizonyítják, hogy a t=0 és t=2 hét időpontokban a növekvő metioninkoncentrációval szignifikánsan csökken az 50 °C hőmérsékleten tartott készítmények A csúcsának az oldható IL–2 összmennyi-

ségéhez (A+B csúcs) viszonyított százalékos aránya, míg a 2 hétnél hosszabb időtartamú tárolás után már nincs ilyen hatás. 5 mmol/l metioninkoncentrációnál a 2. hetes időpontban az A csúcs 3-szoros csökkentése figyelhető meg. A metioninnak a készítményhez adása tehát szignifikánsan csökkenti a fehérje metioninjának oxidálódását, és nincs hatással az IL–2 aggregálódására.

9. táblázat

Az A csúcs és az oldható IL–2 összmennyiségének változása az 50 °C hőmérsékleten tartott mintákban t=0 és t=2 hét időpontokban

A készítmények összetétele: 0,2 mg/ml IL–2, 230 mmol/l arginin, 128 mmol/l borostyánkősav, pH=5,8, 1 mmol/l EDTA, 0,1% poliszorbát és adott mennyiségű metionin.

Készítmény	A csúcs, % (metioninoxidáció)		Megmaradt IL–2, %
	t=0	t=2 hét	t=2 hét
Metionin nélkül	2,1	6,3	76
1 mmol/l metionin	1,4	2,7	77

9. táblázat (folytatás)

Készítmény	A csúcs, % (metioninoxidáció)		Megmaradt IL–2, %
	t=0	t=2 hét	t=2 hét
5 mmol/l metionin	1,2	2,1	77
10 mmol/l metionin	1,2	1,9	76

Ugyancsak megvizsgáltuk, hogy a 4 °C és 25 °C hőmérsékleten 3 hónapon át tárolt készítményeknél milyen hatással van az 5 mmol/l koncentrációban hozzáadott metionin. Amint a 10. táblázat adatai mutatják,

az 5 mmol/l koncentrációban lévő metionin harmadára csökkenti az A csúcsot úgy 4 °C, mint 25 °C hőmérsékleten. Az 5 mmol/l metionin adása tehát hatásosan megvédi a Met¹⁰⁴-et az oxidációtól.

10. táblázat

A metionin oxidációjának mértéke az oxidált metioninú IL–2-nek (A csúcs) az oldható IL–2 összmenyiségéhez (A+B csúcs) viszonyított százalékos arányával kifejezve, valamint az oldható IL–2 megmaradt mennyisége 3 hónapos 4 °C és 25 °C hőmérsékleten történt tárolás után

A készítmények összetétele: 0,2 mg/ml IL–2, 230 mmol/l arginin, 128 mmol/l borostyánkősav, pH=5,8, 1 mmol/l EDTA, 0,1% poliszorbát 80 és 5 mmol/l metionin vagy anélkül.

Készítmény	A csúcs, % az oldható IL–2 összmenyiségéhez viszonyítva		Megmaradt IL–2, % (főcsúcs)	
	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
Metionin nélkül	2,7	4,1	101	97
5 mmol/l metionin	0,8	1,4	101	100

2D) Az oxigén eltávolításának hatása

Megvizsgáltuk milyen hatással van a metionin oxidációjára, ha az IL–2-mintákat tartalmazó folákból eltávolítjuk az oxigént. Az 1 ml IL–2-készítményt tartalmazó, 3 ml térfogatú folák légterét nitrogéngázzal öblítjük át. Az oldott oxigént vákuumos gáztalanítással távolítjuk el. A 11. táblázatban bemutatjuk, hogy egyhetes 50 °C hőmérsékleten való tárolás alatt miként válto-

zik az A csúcs százalékos aránya és az oldott IL–2 összmenyisége (A+B csúcs). A nitrogéngázzal való átöblítés maga csak gyengén, 6,7%-ról 6,2%-ra csökkenti a metionin oxidálódását. Az oldat gáztalanításával kombinált nitrogéngázos átöblítés azonban 1 százalékponttal csökkenti az A csúcs értékét, ugyanakkor az oldott IL–2 összmenyisége mindkét esetben változatlan.

11. táblázat

Az oxidálódott metionin IL–2 (A csúcs) oldott IL–2 összmenyiségéhez (A+B csúcs) viszonyított százalékos arányának változása és a megmaradt oldott IL–2 összmenyisége a t=0 és t=1 hét időpontokban 50 °C hőmérsékleten való tárolás esetén

A készítmények összetétele: 0,3 mg/ml IL–2, 230 mmol/l arginin, 128 mmol/l borostyánkősav, 1 mmol/l EDTA, 0,1% poliszorbát 80.

Készítmény	A csúcs, % (oxidált metionin)		Megmaradt IL–2, %
	t=0	t=1 hét, 50 °C	t=1 hét, 50 °C
Kontroll	3,1	6,7	81
Nitrogéngázzal átöblítve	3,1	6,2	82
Nitrogéngázzal átöblítve és gáztalanítva	3,0	5,8	81

2E) A tartósítószer hatása

Tanulmányoztuk a tartósítószernek a metionin oxidálódására gyakorolt hatását. Hat különböző tartósítószer valamelyikének jelenlétében, illetve tartósítószer nélkül 4 °C és 25 °C hőmérsékleten tartjuk a készítményeket 6 és 12 hónapon át. A 12. táblázatban az A csúcs

százalékos arányának változását szemléltetjük. Valamennyi készítményben az A csúcs százalékos aránya a kontrolléhoz hasonló, jelezve, hogy a tartósítószernek nincs kimutatható hatása a metionin oxidálódására, kivéve azt a készítményt, mely 0,25% m-krezolt tartalmaz, melynél az A csúcs értéke szignifikánsan növekszik.

12. táblázat

Az oxidált metionin IL–2 (A csúcs) mennyiségének százalékos aránya az oldott IL–2 összmennyiségéhez (A+B csúcs) viszonyítva a különböző tartósítószeret tartalmazó, 4 °C és 25 °C hőmérsékleten 6, illetve 12 hónapig tárolt mintáknál

A kontrollkészítmény összetétele: 0,2 mg/ml IL–2, 230 mmol/l L-arginin-bázis, 128 mmol/l borostyánkősav, 1 mmol/l EDTA, 5 mmol/l metionin, 0,1% poliszorbát 80, pH=5,8.

Tartósítószer	A csúcs, % (oxidált metionin)				
	t=0	t=6 hónap		t=12 hónap	
		4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
Kontroll	1,5	1,6	1,9	1,8	2,6
0,9% benzil-alkohol	1,6	1,7	2,3	1,9	3,3
0,25% m-krezol	1,6	1,8	6,7	2,1	3,5
0,5% fenol	1,6	1,7	2,4	1,8	3,6
0,01% benzalkónium-klorid	1,5	1,6	2,0	1,0	3,0
0,01% benzetónium-klorid	1,5	1,7	2,0	1,8	2,8
0,5% klór-butanol	1,5	1,6	2,0	1,8	3,2

3. példa

Különböző tényezők hatása az IL–2 deaminálódására

Az IL–2 deaminálását korábban Kunitani és munkatársai [J. Chromatography, 359:391–402 (1986)] írták le. Az Asp⁸⁸-ról megállapították, hogy az IL–2 deaminálódásának elsődleges helye [Sasaoki és munkatársai, Chem. Pharm. Bull., 40(4):976–980 (1992)]. A deaminált származék az RP-HPLC kromatogramján vállként (B' csúcs)

jelenik meg a főcsúcson (B csúcs). Az IL–2 deaminálódását arginint, nátrium-kloridot és szorbitot tartalmazó készítményeken tanulmányoztuk. A 13. táblázat adatai mutatják, hogy a deaminált származék a szorbitot és nátrium-kloridot tartalmazó készítményekben kimutatható, de az arginint tartalmazóban nem, miután a mintákat 2 héten át megemelt hőmérsékleten tároltuk. Az argininnek tehát stabilizáló hatása van a lamináláson keresztül történő IL–2 degradálódásával szemben.

13. táblázat

Deamináció kimutatása RP-HPLC módszerrel a deaminált származék csúcsának (B' csúcs) százalékos arányában kifejezve

A készítmények összetétele: 0,2 mg/ml IL–2, 10 mmol/l nátrium-szukcinát, pH=6; és 150 mmol/l arginin, 150 mmol/l nátrium-klorid vagy 270 mmol/l szorbit

Készítmény	B' csúcs, % (deaminált)			
	t=0	t=2 hét		
		–70 °C	40 °C	50 °C
10 mmol/l Na-szukcinát, 150 mmol/l Arg, pH=6	0	0	0	0
10 mmol/l Na-szukcinát, 150 mmol/l NaCl, pH=6	0	0	0	3
10 mmol/l Na-szukcinát, 270 mmol/l szorbit, pH=6	0	0	2	2

4. példa

A lefagyasztás/felolvasztás hatása az IL–2 stabilitására

A lefagyasztás okozta fehérjekárosodás 3 mechanizmuson keresztül valósul meg: (1) a fehérje konformációs instabilitása az alacsony hőmérsékleten (hideg okozta denaturáció); (2) a fehérjemolekula denaturálódásra való hajlama a jég/víz határfelületen; (3) a fagyasztásnál a sókoncentráció változása vagy a pH-érték eltolódása által okozott fehérjekárosodás.

Az IL–2 esetében a lefagyasztás/felolvasztás által okozott fehérjevesztést a jég/víz határfelületén le-

zajló denaturálódás és aggregálódás okozza, minthogy a nemionos felületaktív poliszorbát 80 hatásosan védi az IL–2-t a károsodástól. Amint a 7. ábra mutatja, a 0,2 mg/ml IL–2-t, 10 mmol/l nátrium-szukcinátot, pH=6 és 150 mmol/l arginint tartalmazó készítmény minden egyes lefagyasztásával/felolvasztásával csökken az oldott IL–2 mennyisége. A poliszorbát 80-nak a készítményhez adásával az IL–2 ismételt lefagyasztással/felolvasztással szembeni stabilitása nő. 0,05%-os vagy e feletti koncentrációban a poliszorbát 80 teljes védelmet nyújt az IL–2 számára a lefagyasztás/felolvasztás károsító hatásával szemben.

5. példa

A mechanikai nyíróerők hatása az IL–2 stabilitására

5.5. A poliszorbát 80, az EDTA, a fehérjekoncentráció és a töltettérfogat hatása

Vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozólag, hogy a nyíróerőknek kitettség milyen veszteséget okoz az oldott IL–2 mennyiségében. Két típusú nyíróhatást vizsgáltunk: Orbital rázógépen (VWR Scientific, kat. szám: 57018–754) és vortexben (Fisher Scientific, Genie 2 model, 4-es fokozatú sebességnél). A különféle IL–2-készítményekből 1 ml térfogatnyit töltünk a 3 ml-es fiolákba. A fiolákat hűtőszekrényben tartjuk (kontrollminták); laboratóriumi asztalon tartjuk egy éjszakán át (álló minták); 200 fordulatszám/perc sebességgel rázatjuk (rázott minták); vagy vortexoljuk egy percen át (vortexolt minták). Az oldott IL–2 mennyiségi változásait a 14. táblázatban foglaljuk össze.

A hűtőszekrényben tartott kontrollokhoz viszonyítva úgy az álló, mint a rázott mintáknál nem tapasztalható IL–2-veszteség. Az IL–2 tehát stabil a környezeti hőmérsékleten és a rázott körülmények között. A vortexolásnak alávetett mintáknál azonban különféle mennyiségi veszteségek mutathatók ki. A 0,1–0,5 mg/ml IL–2-t vagy 1–5 mmol/l EDTA-t vagy alacsony koncentrációjú poliszorbát 80-at (0,005–0,05%) tartalmazó mintákban 25–50%-os oldható IL–2-veszteség mutatkozik. Az egyperces vortexolás tehát károsabb hatással van, mint az egy éjszakán keresztüli ráztatás. Az IL–2 mennyiségi vesztesége megakadályozható a poliszorbát 80 koncentrációjának 0,1%-ra vagy e fölé emelésével. A teljesen megtöltött fiolákban, melyekben nem hagyunk légteret, ugyancsak minimális az oldható IL–2 vesztesége egyperces vortexolás alatt, jelezve, hogy a levegő/folyadék határfelület megléte a károsodás fő kiváltó tényezője.

14. táblázat

Az oldott IL–2 mennyiségének változása szobahőmérsékleten egy éjszakán keresztüli tárolásnál (álló); percenként 200 fordulatszámú történő egy éjszakán keresztüli ráztatásnál (rázott); és egyperces vortexolás után (vortexolt) a 4 °C hőmérsékleten tartott mintákhoz viszonyítva

A kontrollkészítmény összetétele: 0,2 mg/ml IL–2, 10 mmol/l nátrium-szukcinát, pH=6, 150 mmol/l arginin.

A 3 ml térfogatú fiolákba 1 ml készítményt töltünk vagy a fiolákat teljesen megtöltjük, nem hagyva légtér a folyadék felett. Az oldható IL–2 mennyiségének meghatározását RP-HPLC módszerrel végezzük.

Minta (1 ml a 3 ml-es fiolában)	Álló (éjszakán át)	Rázott (éjszakán át)	Vortexolt (1 perc)
0,2 mg/ml IL–2 (kontroll)	99,6	100,8	74,7
0,1 mg/ml IL–2	100,3	102,7	72,0
0,5 mg/ml IL–2	99,7	101,0	68,6
1 mmol/l EDTA	97,6	101,2	59,6
5 mmol/l EDTA	99,3	102,7	72,2
0,005% poliszorbát 80	100,6	100,0	46,5
0,01% poliszorbát 80	99,7	100,4	66,1
0,05% poliszorbát 80	99,3	100,3	93,9
0,1% poliszorbát 80	99,2	100,0	89,0
0,2% poliszorbát 80	99,3	99,2	99,8
0,5% poliszorbát 80	99,1	98,4	99,7
1 mmol/l EDTA, 0,1% poliszorbát 80	99,6	100,1	99,8
Teljesen megtöltött fiola	99,4	100,0	96,5

5.2 Az arginin hatása

Az argininnek az IL–2-vortexolás okozta károsodásra gyakorolt hatását a 15. táblázat adataival szemlélítettük. Az arginin koncentrációját 150 mmol/l értékről 230 mmol/l értékre emelve, az oldható IL–2 mennyisége az egyperces vortexolás utáni értékeket összehasonlítva, 65% helyett 69%. Az arginin tehát egy gyenge

védőhatást fejt ki a nyíróerők károsításával szemben, noha az aggregálódás elleni hatásán át, amint azt korábban említettük, igen erős stabilizáló hatása van. A 230 mmol/l arginint tartalmazó készítményekhez poliszorbát 80-at adva, az alacsony koncentrációban (0,02%) destabilizálja, magas koncentrációban (0,1%) stabilizálja a vortexolás ellen az IL–2-t.

15. táblázat

Az egyperces vortexolás után megmaradt oldott IL–2 mennyisége százalékban megadva (az IL–2 mennyiségét RP-HPLC módszerrel határozzuk meg)

Készítmény (hacsak másként nem jelezzük 0,5 mg/ml IL–2)	Megmaradt IL–2, %
150 mmol/l Arg, 10 mmol/l Na-szukcinát, 1 mmol/l EDTA, pH=5,8	65,5
150 mmol/l Arg, 81 mmol/l borostyánkősav, 1 mmol/l EDTA, pH=5,8	65,3
230 mmol/l Arg, 10 mmol/l Na-szukcinát, 1 mmol/l EDTA, pH=5,8	69,0
230 mmol/l Arg, 128 mmol/l szukcinát, 1 mmol/l EDTA, pH=5,8	68,9
230 mmol/l Arg, 128 mmol/l borostyánkősav, 1 mmol/l EDTA, 0,02% Tw 80, pH=5,8	55,1
230 mmol/l Arg, 128 mmol/l borostyánkősav, 1 mmol/l EDTA, 0,1% Tw 80, pH=5,8	99,5

5.3 Szállítási vizsgálatok

A szállítás alatti károsodás vizsgálatára az IL–2-készítményeket valódi szállítási körülményeknek tettük ki. Arginint, illetve nátrium-kloridot tartalmazó IL–2-készítményeket vizsgáltunk, melyek mindegyike különböző mennyiségű poliszorbát 80-at tartalmazott. A mintákat jégen szállítottuk légi úton Emeryville-ből (California) St. Louisba (Missouri) és vissza. A 8. ábrán láthatjuk a mintákban az RP-HPLC módszerrel mért oldott IL–2-mennyiségeket. A poliszorbát 80 nélkül úgy az arginines, mint a nátrium-kloridos mintánál az IL–2-veszteség kb. 10%, a stabilitásbeli különbség elhanyagolható, 1% körüli. A poliszorbát jelenléte csökkenti az IL–2-veszteséget, 0,1% poliszorbátkoncentrációnál veszteség nem tapasztalható, jelezve, hogy a felületaktív anyag ezen a koncentrációján teljes védelmet nyújt az IL–2 fehérje számára. A 0,1%-os poliszorbát 80 tehát hatásosan védi az IL–2 fehérjét a szállítás alatt ért nyíróhatásokkal szemben.

Következésképp tehát megállapíthatjuk, hogy az arginin elsődleges stabilizálóagens az IL–2-t tartalmazó gyógyszerkészítmények esetében, minthogy a hosszú távú tárolás alatt csökkenti az IL–2 aggregálódását és deamidálódását, hogy tovább követhessük az arginin koncentrációját a készítményben, és az IL–2 még nagyobb stabilitását érhesük el anélkül, hogy az oldat izotón tulajdonsága megváltozzon, a pH=5,8 kémhatás beállítására az argininbázist előnyösen borostyánkősavval pufferoljuk. A fehérje metionin részének oxidálódását meggátlandó, metionint és EDTA-t adhatunk a készítményhez. Végül a nemionos felületaktív anyagnak, például poliszorbát 80-nak a készítményben való jelenléte megvédi az IL–2 fehérjét a lefagyasztás/felolvasztás és a mechanikai nyíróerők által okozott károsodástól.

6. példa

Tartósítószer hatása

Az antimikrobiális tartósítószer tartalmazó készítményeket az USP (Amerikai Egyesült Államok Gyógyszerkönyve) vizsgálati eljárásnak vetettük alá. Az eredményeket a 16. táblázatban foglaltuk össze. Tartósítószer nem tartalmazó kontrollmintát nem vizsgáltunk.

16. táblázat

Az rhlL–2-készítmények USP szerinti vizsgálata a tartósítószer hatását illetően

A készítmények összetétele: 0,1 mg/ml rhlL–2, 230 mmol/l L-arginin-bázis, 128 mmol/l borostyánkősav, 1 mmol/l EDTA, 5 mmol/l metionin, 0,1% poliszorbát 80, pH=5,8 és az adott tartósítószer.

Tartósítószer	USP teszt
Kontroll	nem vizsgált
0,9% benzil-alkohol	megfelel
1,3% benzil-alkohol	megfelel
1,7% benzil-alkohol	megfelel
0,5% klór-butanol	megfelel
0,5% fenol	megfelel

7. példa

A fájdalomkutatásra irányuló vizsgálatok

Az University of Florida, College of Dentistry, OMSDS Division of Neuroscience intézményben kidolgozott patkány modellt használjuk a fájdalomkeltő tulajdonság meghatározására, közelebbről annak megállapítására, hogy a készítmények mennyire okoznak égető és csípős fájdalmat. A modell annak az áramnak a vizsgálatán alapszik, mely az érzőidegekben indukálódik és a fájdalomigert közvetíti. A vizsgálathoz egy regisztráló kamrában érzőidegsejteket (patkány háti gyöki ganglion) izolálunk. A nociceptív (fájdalomindukáló) kritérium alapján előre kiválasztott egyes sejtekből felvételeket végzünk. Az égető fájdalom, csípős fájdalom és standardizált fájdalom pontszámait kiszámítjuk a vizsgált készítményekre. Az égető fájdalom pontszámát a kapszaicinre (500 nmol/l) adott reakcióhoz viszonyítva állapítjuk meg. A kapszaicinről ismert, hogy intenzív égető fájdalmat okoz az emberről [Cooper és munkatársai, Pain, 24:93–116 (1986)]. A csípős fájdalom pontszámát a pH=5,0 értékre beállított oldat által kiváltott áramhoz való viszonyítással állapítjuk meg. A standardizált fájdalom pontszáma a készítményt a normál sóoldathoz (0,9% NaCl, nem pufferolt) viszonyítva értékeli. A normál sóoldatot parenterális gyógyszerkészítményekhez használják és ismert róla, hogy csípős érzést kelt.

Az L-arginin-bázist és a borostyánkősavat tartalmazó folyékony készítmény fájdalomkeltési analízisét ezzel a modellel végezzük el. A két vizsgálati mintára vonatkozó adatokat a 17. táblázatban adjuk meg. Az égető, csípős és a standardizált fájdalomra kiszámított pontszámok alapján megállapíthatjuk, hogy az L-arginin/borostyánkő-

sav készítmény kiváló tulajdonságokkal rendelkezik a normál sóoldathoz viszonyítva. Az is megfigyelhető, hogy a készítmény alkalmazása alatt az áram erőssége csökken (időfüggő csökkenés), míg ilyen csökkenés a normál sóoldatnál nem történik meg. Ez azt bizonyítja, hogy a készítmény jobban tolerálható, mint a sóoldat.

17. táblázat

A folyékony készítmény és a 0,9%-os nátrium-klorid-oldat égető-, csípő- és standardizált fájdalomkeltésének pontszámai

A készítmény összetétele: 230 mmol/l L-arginin-bázis, 128 mmol/l borostyánkősav, 1 mmol/l EDTA, 5 mmol/l metionon, 0,1% poliszorbát 80, pH=5,8.

Készítmény	Égető fájdalom	Csípős fájdalom	Standardizált fájdalom
0,9%-os NaCl-oldat	0,084±0,006	2,44±0,62	1,73±0,73
rhIL-2-készítmény	0,044±0,019	0,65±0,23	0,16±0,05

8. példa

TFPI-vel végzett stabilitási vizsgálatok

A különböző TFPI készítmények stabilitási és oldhatósági vizsgálatai azt bizonyítják, hogy az L-arginin stabilizálja a TFPI-t (adatok nem megadva) és a töltéssel rendelkező puffereknek, mint amilyenek a citrátionok, még kifejezettebb stabilizálóhatásuk van. A vizsgálatokban tanulmányozzuk az L-arginin koncentrációjának és a pufferrendszernek a TFPI stabilitására gyakorolt hatását. Közelebbről, összehasonlítjuk a sójától lényegében mentes savból és a sav és sója keverékéből álló pufferrendszerek hatását. A vizsgálatokat az IL-2-készítményeknél az előzőekben már leírt módon végezzük.

A TFPI-oldat összetétele: 0,6 mg/ml TFPI, 20 mmol/l nátrium-citrát és 300 mmol/l L-arginin, pH=5,5. Az oldat pufferét 4 °C hőmérsékleten végzett dialízissel cseréljük ki Spectral Por #7 membránt (MWCO 3,500, ID#132-110) alkalmazva. A citrát- vagy szukcinátpuffert tartalmazó különféle L-arginines készítmények kémhatása pH=6,5. A dialízis után a TFPI koncentrációját UV/látható fény spektroszkóppal mérjük. A megfelelő puffert használva, mindegyik oldatot 0,15 mg/ml koncentrációjára hígítjuk. Az így előállított készítményekből 1 ml kivétet mérünk 3 ml-es fiolákba. A vizsgálatokat t=0., 3., 7., 14. és 30. napon végezzük. A mérési időpontokban a fiolák tartalmát 1,7 ml-es centrifugacsövekbe visszük és percenkénti 10 K fordulatszámmal centrifugáljuk 2 percen át. A felülúszóból vett mintákat IEX-HPLC módszerrel analizáljuk, melyről az előző vizsgálatokból ismert volt, hogy a stabilitás minősítésére használható eljárás.

A 0,15 mg/ml végkoncentrációjú TFPI-készítmények L-arginin-bázist vagy L-arginin-HCl-ot tartalmaznak. Az L-arginin-HCl-ot tartalmazó készítmények pH=5,5 értékét 10 mmol/l koncentrációjú citromsavat vagy borostyánkősavat és a konjugált nátriumsójukat tartalmazó pufferrendszerrel állítjuk be. Az L-arginin-bázist tartalmazó készítmények kémhatását citromsavval vagy borostyánkősavval állítjuk be pH=5,5 értékre. Összesen nyolc készítményt vizsgálunk:

1) 20–150 mmol/l L-arginin-HCl, pH=5,5, 10 mmol/l citromsavval és nátrium-citráttal beállítva;

2) 20–150 mmol/l L-arginin-bázis, pH=5,5, citromsavval beállítva;

3) 100–300 mmol/l L-arginin-HCl, pH=5,5, 10 mmol/l citromsavval és nátrium-citráttal beállítva;

4) 100–300 mmol/l L-arginin-bázis, pH=5,5, citromsavval beállítva;

5) 20–150 mmol/l L-arginin-HCl, pH=5,5, 10 mmol/l borostyánkősavval és nátrium-szukcináttal beállítva;

6) 20–150 mmol/l L-arginin-bázis, pH=5,5, borostyánkősavval beállítva;

7) 100–300 mmol/l L-arginin-HCl, pH=5,5, 10 mmol/l borostyánkősavval és nátrium-szukcináttal beállítva;

8) 100–300 mmol/l argininbázis, pH=5,5, borostyánkősavval beállítva.

A TFPI degradálódás előzőekben megállapított fő útvonala a fehérje aggregálódása és kicsapódása [Chen és munkatársai, J. Pharm. Sci., 88:881–888 (1999)]. A TFPI degradálódását a stabilitási mintákban megmaradt oldott fehérje mennyiségének meghatározásával követjük nyomon. A különböző L-arginin-koncentrációjú TFPI-készítményeket a gyorsított stabilitási vizsgálatokhoz 50 °C hőmérsékleten tartjuk előre meghatározott időn keresztül. A mintákban oldott fehérjétől mikrocentrifugacsőben végrehajtott centrifugálással elválasztjuk az aggregálódott/lecsapódott fehérjét. Az oldott fehérje meghatározásához IEX-HPLC módszert használunk [Chen és munkatársai, J. Pharm. Sci., 88:881–888 (1993)]. A kapott adatot a tárolási időtartam függvényében illesztjük egy egyetlen exponenciális kinetikai egyenlet $[Y=Y_0 \exp(-kt)]$ felhasználásával, hogy kiszámoljuk a KaleidaGraph grafikus szoftver (Synergy Software, Reading, Pennsylvania) segítségével a megmaradt oldott fehérje felezési idejét.

A citromsavval vagy nátrium-citráttal pufferolt készítmények megmaradt oldható TFPI fehérjéjének a felezési idejét a 18. táblázatban foglaljuk össze. A borostyánkősavval vagy nátrium-szukcináttal pufferolt készítményeknél megállapított felezési időket ($t_{1/2}$) a 19. táblázat mutatja. Ezek az adatok bizonyítják, hogy a felezési idő növekszik a készítmények L-arginin koncent-

rációjának emelésével. A citratos és szukcinatos pufferrendszerű készítmények adatait a 9. és 10. ábrán grafikusán szemléltetjük. A felezési idő görbéje parabolikus, és az argininkoncentráció függvényében emelkedik. Megállapítható, hogy az L-arginin a TFPI stabilizátora.

A két pufferrendszernek a TFPI stabilitását illető befolyása közti különbség elhanyagolhatónak látszik. Noha a citrátpufferes rendszer nagyobb variabilitást mutat (9. ábra), a felezési idő/argininkoncentráció két görbéje a szukcinátpufferes rendszerben lényegében egymásra fektethető (10. ábra). A kémhatás beállításához használt pufferrendszerektől függetlenül a hasonló L-arginin-koncentrációkkal a TFPI hasonló stabilitása érhető el. A 11. ábrán a borostyánkőssavval, illetve citromsavval pufferolt készítmények felezési idő/argininkoncentráció görbéit hasonlítjuk össze. Az ábra azt mutatja, hogy az azonos argininkoncentrációnál nincs különbség a TFPI-stabilitások között. Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy a stabilizálók hatás létrehozásában főként az arginin vesz részt.

A savval történő – legyen az akár citromsav, akár borostyánkőssav – pufferolás azonban a készítmény nagyobb argininkoncentrációját (vagyis nagyobb stabilitását) teszi lehetővé, miközben az oldat izotonicitása változatlan marad. Így például a 18. táblázat 3–3 és 4–3 készítményében az L-arginin koncentrációja 300 mmol/l, a felezési idő pedig hasonló. A 3-3 készítmény azonban a 300 mmol/l L-arginin-HCl pH=5,5 értékre való pufferolását 10 mmol/l citromsav/nátrium-cit-

rát rendszerrel végzi, és az oldat ozmolaritása 497 mOsm/kg. Ez egy hipertóniás készítmény, és ez nem előnyös az injektálhatóság szempontjából. Ezzel szemben a 4–3 készítmény a 300 mmol/l koncentrációjú L-arginin-bázis pH=5,5 értékre való pufferolását 121 mmol/l citromsavval végezzük, mely esetben az oldat ozmolaritása 295 mOsm/kg. Ez a készítmény ozmolaritás tekintetében nagyon közel van az izotóniás oldathoz (290 mmol/kg), így sokkal előnyösebben használható injektálható készítményként. Ha a pH-érték beállításához például 10 mmol/l citromsav/nátrium-citrát puffert használunk, az L-arginin koncentráció csak kissé emelhető 150 mmol/l érték fölé anélkül, hogy ne lépnénk túl az izotonicitást. A 150 mmol/l L-arginin koncentrációjú készítmény (1–6) felezési ideje 16 nap, míg a 300 mmol/l koncentrációjú (4–3) 23 nap.

Az aminosavbázist (például argininbázist), mint stabilizátort és a sójától lényegében mentes savat (például borostyánkőssavat), mint puffert tartalmazó készítmény hatásos módot nyújt arra, hogy a TFPI-t stabilizáló hatás fokozásához több stabilizálószer (például arginint) adhassunk a készítményhez.

A fenti példákban levonhatjuk azt a következtetést, hogy az L-arginin stabilizálja a TFPI-t, kiterjesztve a tárolhatósági időt. Savat használva a kémhatás pufferolásához, további argininmennyiség adható a készítményhez a stabilizálók hatás fokozására anélkül, hogy az oldat izotóniás jellege megváltozna, ami az injektálhatóság szempontjából előnyös.

18. táblázat

A TFPI készítmények stabilitási adatai, az arginint tartalmazó készítmények pH=5,5 kémhatásra citrátpufferrel beállítva

A felezési időket ($t_{1/2}$) az 50 °C hőmérsékleten mért stabilitási adatokból számoljuk ki, egykitevős kinetikai egyenlet felhasználásával.

Készítményszám	Készítmény	Ozmolaritás (mmol/kg)	$t_{1/2}$ (nap)
1–1.	20 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-citrát	66	9,4
1–2.	40 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-citrát	81	12,6
1–3.	60 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-citrát	91	10,7
1–4.	80 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-citrát	106	10,9
1–5.	100 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-citrát	190	12,5
1–6.	150 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-citrát	276	16,0
2–1.	20 mmol/l L-Arg bázis, 8,9 mmol/l citromsavval titrálva	67	5,7
2–2.	40 mmol/l L-Arg bázis, 17,8 mmol/l citromsavval titrálva	84	15,0
2–3.	60 mmol/l L-Arg bázis, 26,6 mmol/l citromsavval titrálva	95	17,0
2–4.	80 mmol/l L-Arg bázis, 34,2 mmol/l citromsavval titrálva	109	14,6
2–5.	100 mmol/l L-Arg bázis, 42,6 mmol/l citromsavval titrálva	119	18,2
2–6.	150 mmol/l L-Arg bázis, 62,4 mmol/l citromsavval titrálva	147	20,4
3–1.	100 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-citrát	239	14,8
3–2.	200 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-citrát	358	19,6
3–3.	300 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-citrát	497	21,7
4–1.	100 mmol/l L-Arg bázis, 42,2 mmol/l citromsavval titrálva	155	16,7

18. táblázat (folytatás)

Készítményszám	Készítmény	Ozmolaritás (mmol/kg)	t _{1/2} (nap)
4-2.	200 mmol/l L-Arg bázis, 81,8 mmol/l citromsavval titrálva	224	22,5
4-3.	300 mmol/l L-Arg bázis, 121 mmol/l citromsavval titrálva	295	23,3

19. táblázat

A TFPI készítmények stabilitási adatai, az arginint tartalmazó készítmények
pH=5,5 kémhatásra szukcinátpufferrel beállítva

A felezési időket (t_{1/2}) az 50 °C hőmérsékleten mért stabilitási adatokból számoljuk ki, egykitevős kinetikai egyenlet felhasználásával.

Készítmény szám	Készítmény	Ozmolaritás (mmol/kg)	t _{1/2} (nap)
1-1.	20 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-szukcinát	66	9,9
1-2.	40 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-szukcinát	97	11,5
1-3.	60 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-szukcinát	129	15,3
1-4.	80 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-szukcinát	163	16,7
1-5.	100 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-szukcinát	197	20,5
1-6.	150 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l citromsav/Na-szukcinát	282	21,9
2-1.	20 mmol/l L-Arg bázis, 12,5 mmol/l borostyánkőssavval titrálva	40	6,7
2-2.	40 mmol/l L-Arg bázis, 25,2 mmol/l borostyánkőssavval titrálva	62	12,6
2-3.	60 mmol/l L-Arg bázis, 37,5 l/l borostyánkőssavval titrálva	8	16,4
2-4.	80 mmol/l L-Arg bázis, 49,9 mmol/l borostyánkőssavval titrálva	107	19,6
2-5.	100 mmol/l L-Arg bázis, 62,4 mmol/l borostyánkőssavval titrálva	129	20,9
2-6.	150 mmol/l L-Arg bázis, 91,4 mmol/l citromsavval titrálva	192	23,1
3-1.	100 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l borostyánkőssav/Na-szukcinát	207	16,5
3-2.	200 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l borostyánkőssav/Na-szukcinát	353	21,6
3-3.	300 mmol/l L-Arg-HCl, 10 mmol/l borostyánkőssav/Na-szukcinát	515	21,7
4-1.	100 mmol/l L-Arg bázis, 61,3 mmol/l borostyánkőssavval titrálva	127	17,0
4-2.	200 mmol/l L-Arg bázis, 122 mmol/l borostyánkőssavval titrálva	256	21,4
4-3.	300 mmol/l L-Arg bázis, 180 mmol/l borostyánkőssavval titrálva	363	22,5

A tudomány mai állását jelző, a leírásban említett valamennyi közlemény és szabadalmi irat referencia-ként itt beépített.

Noha a leírtak pontosabb értelmezése céljából bizonyos részletességgel illusztrációkat és példákat megadtunk, nyilvánvaló, hogy a gyakorlatban további változtatások és módosítások végezhetők a találmány oltalmi körén belül.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Stabilizált folyékony gyógyszerkészítmény, amely az alábbiakat tartalmazza:

gyógyászatiilag hatékony komponensként egy interleukin-2-t (IL-2) vagy annak egy az IL-2 biológiai aktivitását megtartó variánsát, ahol az említett IL-2 vagy annak variánsa folyékony készítményben a tárolás alatt aggregátumot képez;

100 mM–400 mM mennyiségű aminosavbázist, amely bázis legalább egy arginint, lizint, aszparaginsavat vagy glutaminsavat tartalmaz; és egy puffert, amely puffer egy a só formájától lényegében mentes sav.

2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett IL-2 humán rekombináns IL-2 (rhIL-2) vagy annak variánsa

3. Az 1. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett készítmény ozmolaritása 240–360 mmol/kg.

4. Az 1. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett készítmény kémhatása pH=4,0–9,0.

5. Az 1. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett puffer ecetsav, borostyánkőssav, citromsav, foszforsav vagy glutaminsav.

6. Az 5. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett puffer a borostyánkőssav.

7. A 6. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett aminosavbázis a 100–400 mmol/l koncentrációjú,

szabad bázis alakjában jelen lévő arginin, és az említett borostyánkősav 80–190 mmol/l koncentrációban van a készítményben.

8. A 7. igénypont szerinti készítmény, ahol a szabad bázis alakjában lévő arginin koncentrációja 150–350 mmol/l.

9. A 8. igénypont szerinti készítmény, ahol a szabad bázis alakjában lévő említett arginin koncentrációja 230 mmol/l és az említett borostyánkősav koncentrációja 128 mmol/l.

10. A 9. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett IL–2 a rekombináns humán IL–2 (rhIL–2) vagy variánsa.

11. A 9. igénypont szerinti készítmény, amelynek kémhatása pH=5,0–6,5, és ozmolaritása 250–330 mmol/kg.

12. Az 1. igénypont szerinti készítmény, ahol az IL–2 vagy variánsa legalább egy olyan metionin részt tartalmaz, amely a folyékony készítményben tárolva oxidálódik.

13. A 12. igénypont szerinti készítmény, amely metionint is tartalmaz olyan mennyiségben, amely elegendő ahhoz, hogy megakadályozza az említett IL–2-ben vagy variánsában lévő legalább egy említett metionin-rész oxidálódását a készítmény tárolása alatt.

14. Az 1. igénypont szerinti készítmény, amely nemionos felületaktív anyagot is tartalmaz olyan mennyiségben, amely elegendő ahhoz, hogy megakadályozza az IL–2 vagy variánsának a lefagyasztás/felolvasztás vagy a mechanikai nyíróerők tárolás alatt okozta károsítóhatását.

15. A 14. igénypont szerinti készítmény, ahol a nemionos felületaktív anyag a polisorbát 80.

16. Stabilizált folyékony gyógyszerkészítmény, amely interleukin–2-t (IL–2) vagy egy az IL–2 biológiai aktivitását megtartó variánsát, szabad bázis alakjában lévő arginint és a sójától lényegében mentes borostyánkősavat tartalmaz, ahol a szabad bázis alakjában lévő említett arginin 150–350 mmol/l, az említett borostyánkősav 80–190 mmol/l koncentrációban van a készítményben.

17. A 16. igénypont szerinti készítmény, ahol a szabad bázis alakjában lévő említett arginin 230 mmol/l, az említett borostyánkősav 128 mmol/l koncentrációban van jelen, és ahol az említett készítmény kémhatása pH=5,0–6,5, ozmolaritása 250–330 mmol/kg.

18. Eljárás folyékony gyógyszerkészítményekben lévő IL–2 vagy annak egy az IL–2 biológiai aktivitását megtartó variánsa stabilitásának fokozására, ahol a folyékony készítményben tárolás alatt az említett IL–2 vagy variánsa aggregátumot képez, és ahol az említett eljárás abból áll, hogy az említett készítményhez az említett IL–2 vagy variánsa aggregálódásának csökkentéséhez megfelelő mennyiségű aminosavbázist és egy puffert adunk, ahol az említett puffer egy sójától lényegében mentes sav, és ahol az említett aminosavbázis legalább egy arginint, lizint, aszparaginsavat vagy glutaminsavat tartalmaz, ahol az említett gyógyszerkészítmény pH-értéke

4,0–9,0 amelyet az IL–2 vagy variánsa hozzáadása előtt állítunk be.

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett készítmény ozmolaritása 240–360 mmol/kg.

20. A 18. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett készítmény kémhatása pH=4,0–9,0 közötti tartományban van.

21. A 18. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett puffert az ecetsav, borostyánkősav, citromsav, foszfor- és glutaminsav közül választjuk ki.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett puffer a borostyánkősav.

23. Eljárás IL–2-t vagy annak egy az IL–2 biológiai aktivitását megtartó variánsát tartalmazó gyógyszerkészítmény tárolási stabilitásának fokozására, ahol az említett IL–2 vagy variánsa a folyékony készítmény tárolása alatt aggregátumot képez, és az említett eljárás abból áll, hogy a készítményhez az említett interleukin–2 (IL–2) vagy variánsa aggregálódásának csökkentéséhez szükséges mennyiségű aminosavbázist és egy puffert adunk, ahol a puffer egy sójától lényegében mentes sav és az említett aminosavbázis legalább egy arginint, lizint, aszparaginsavat vagy glutaminsavat tartalmaz, ahol az említett gyógyszerkészítmény pH-értéke 4,0–9,0 amelyet az IL–2 vagy variánsa hozzáadása előtt állítunk be.

24. A 23. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett puffer a borostyánkősav.

25. Az 1. igénypont szerinti készítmény szárított alakja, ahol a szárított alak liofilizált vagy permetként szárított készítmény.

26. Interleukin–2-re (IL–2) reagáló betegségek megelőzésére, kezelésére vagy diagnosztizálására szolgáló gyógyszerformátum, ahol az említett formátum az 1. igénypont szerinti készítményt tartalmazza.

27. A 7. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett, szabad bázis formájában jelen lévő arginin koncentrációja 175–325 mM.

28. A 27. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett, szabad bázis formájában jelen lévő arginin koncentrációja 200–300 mM és ahol az említett borostyánkősav koncentrációja 120–180 mM.

29. A 28. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett készítmény pH-ja 5,0–6,5, és ozmolaritása 240–360 mmol/kg.

30. Az 5. igénypont szerinti készítmény, ahol a puffer a citromsav.

31. A 30. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett aminosavbázis szabad bázis formában jelen lévő arginin, amelynek koncentrációja 175–400 mM, és ahol a citromsav koncentrációja az említett készítményben a 40 mM és 200 mM közötti tartományba esik.

32. A 31. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett, szabad bázis formájában jelen lévő arginin koncentrációja 250–350 mM és ahol az említett citromsav koncentrációja 100–150 mM.

33. A 32. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett készítmény pH-értéke 5,0–6,5 és ozmolaritása 240–360 mmol/kg.

34. Az 1. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett variáns szekvenciája legalább 80%-ban megegyezik a humán IL-2 szekvenciájával.

35. Az 1. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett variáns szekvenciája legalább 90%-ban megegyezik a humán IL-2 szekvenciájával.

36. Az 1. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett variáns szekvenciája legalább 95%-ban megegyezik a humán IL-2 szekvenciájával.

37. Az 1. igénypont szerinti készítmény, ahol az említett variáns a dezalanil-1, szerin-125 humán interleukin-2.

38. A 18. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett variáns szekvenciája legalább 80%-ban megegyezik a humán IL-2 szekvenciájával.

39. A 18. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett variáns szekvenciája legalább 90%-ban megegyezik a humán IL-2 szekvenciájával.

40. A 18. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett variáns szekvenciája legalább 95%-ban megegyezik a humán IL-2 szekvenciájával.

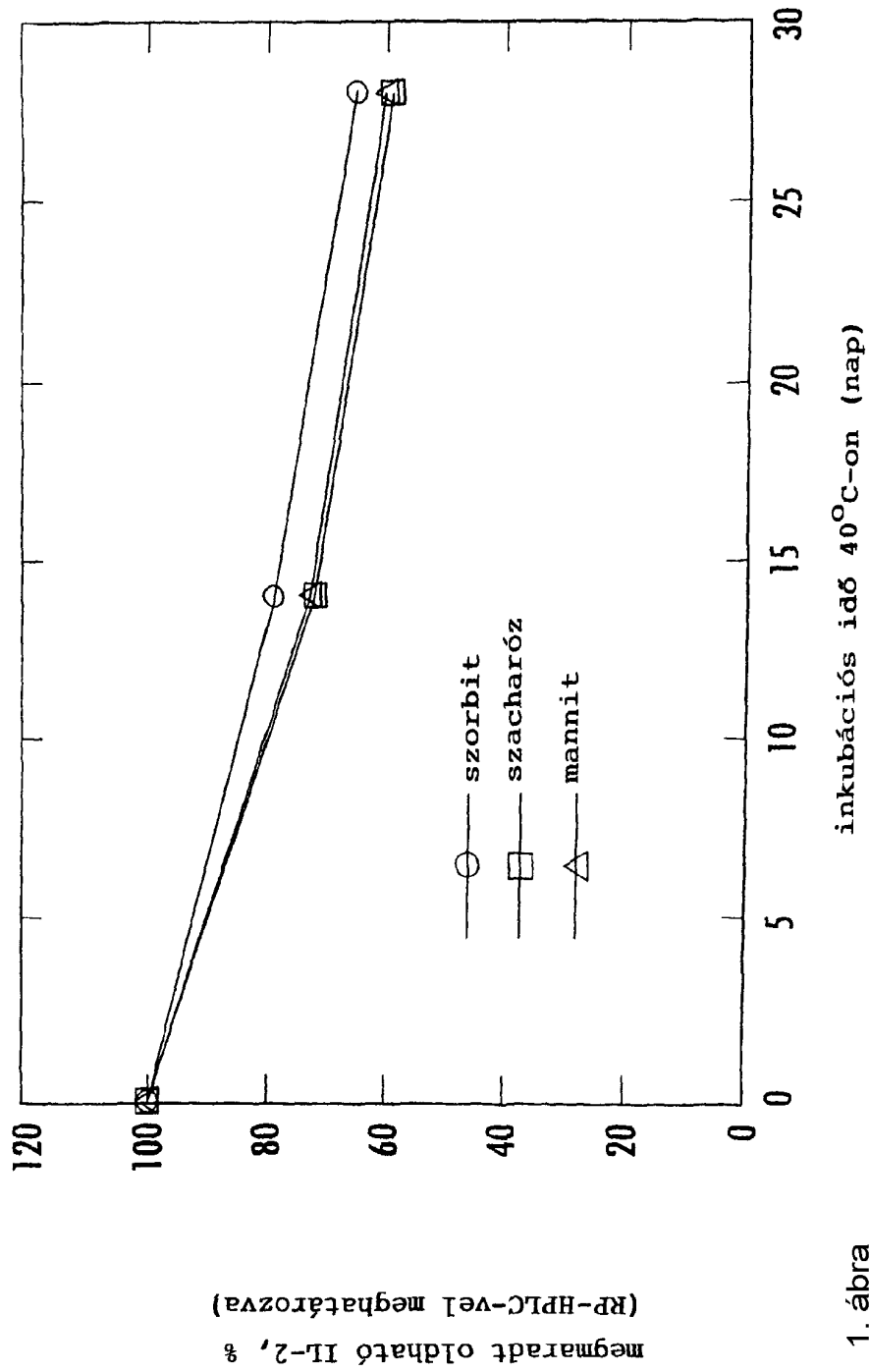
41. A 18. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett variáns a dez-alanil-1, szerin-125 humán interleukin-2.

42. A 23. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett variáns szekvenciája legalább 80%-ban megegyezik a humán IL-2 szekvenciájával.

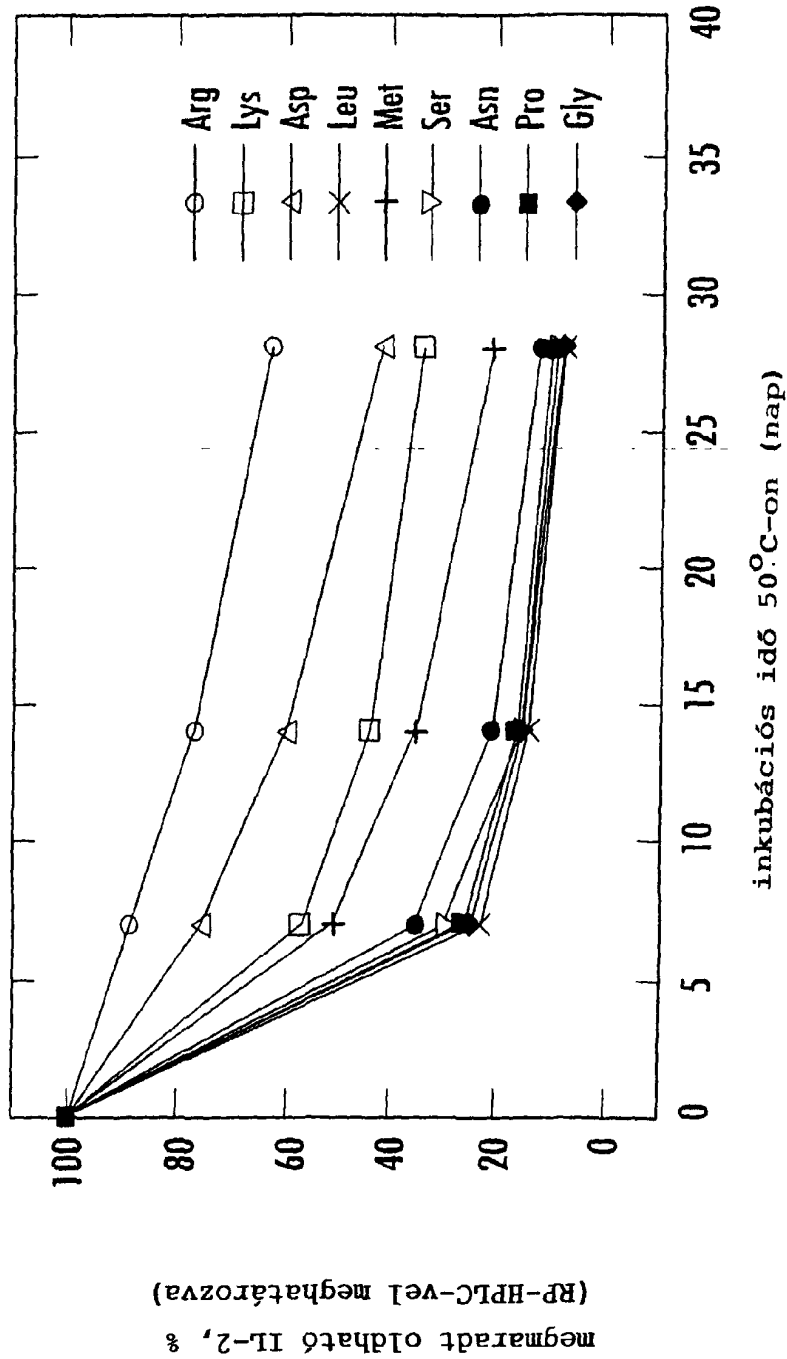
43. A 23. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett variáns szekvenciája legalább 90%-ban megegyezik a humán IL-2 szekvenciájával.

44. A 23. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett variáns szekvenciája legalább 95%-ban megegyezik a humán IL-2 szekvenciájával.

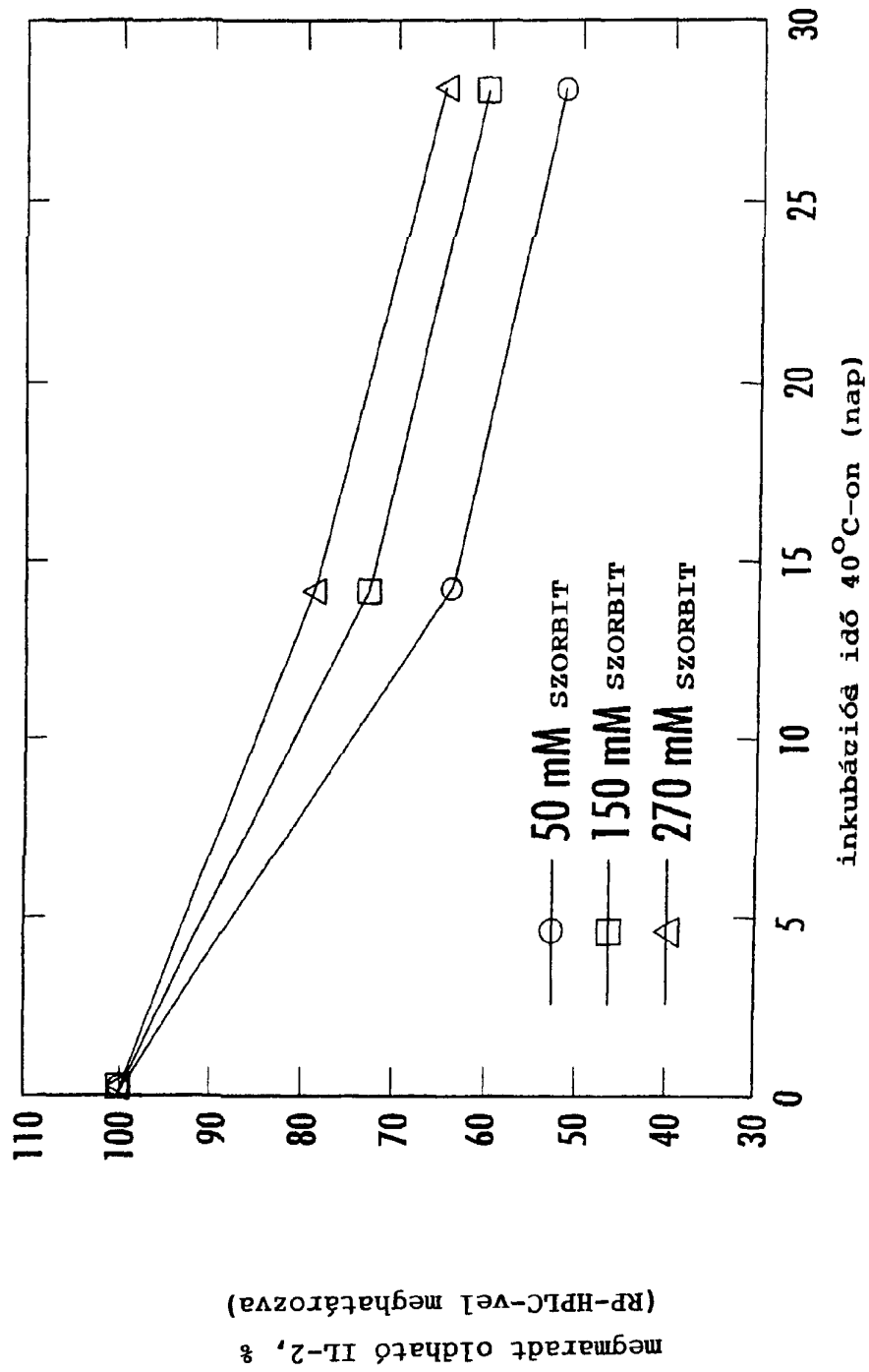
45. A 23. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett variáns a dez-alanil-1, szerin-125 humán interleukin-2.



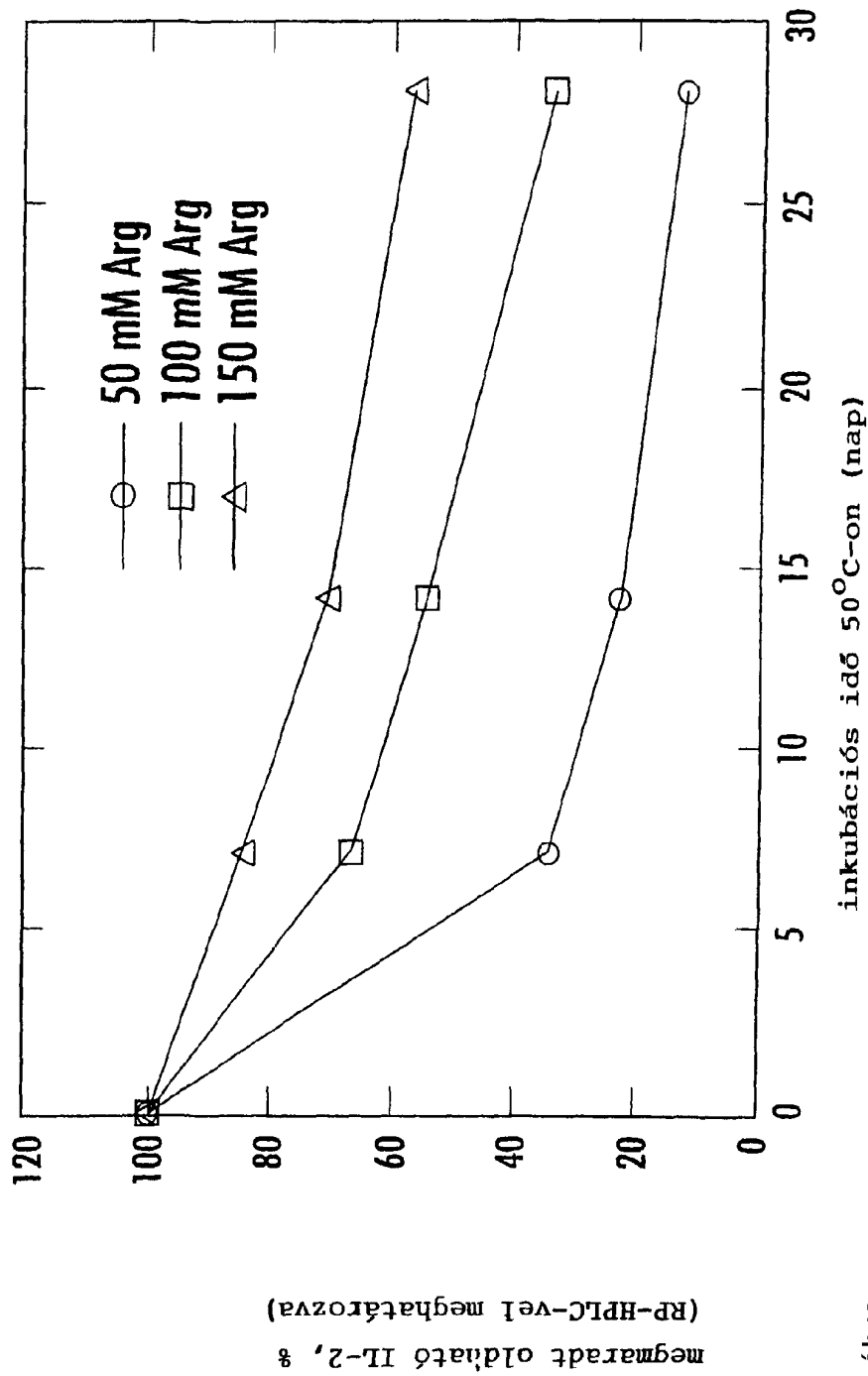
1. ábra



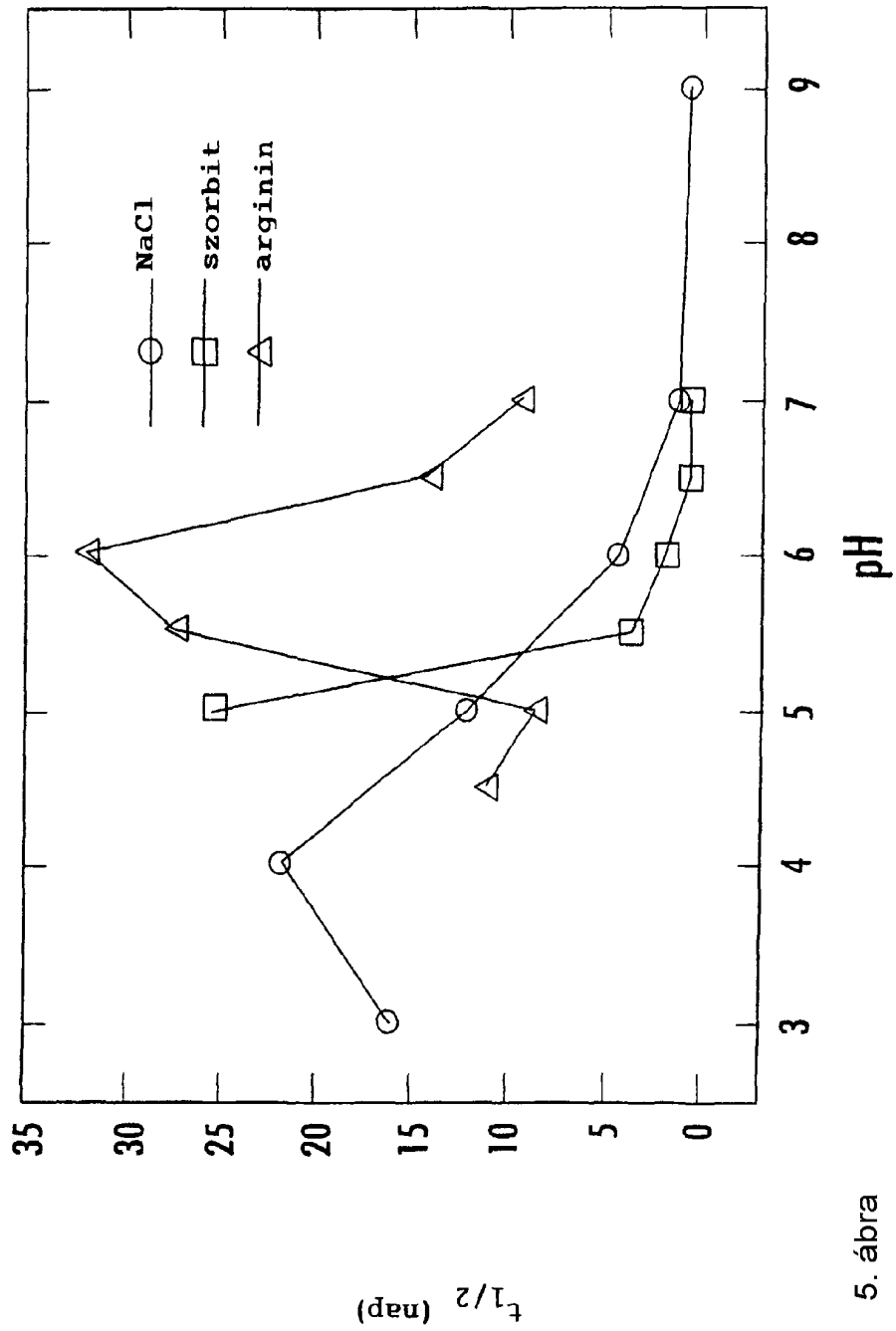
2. ábra



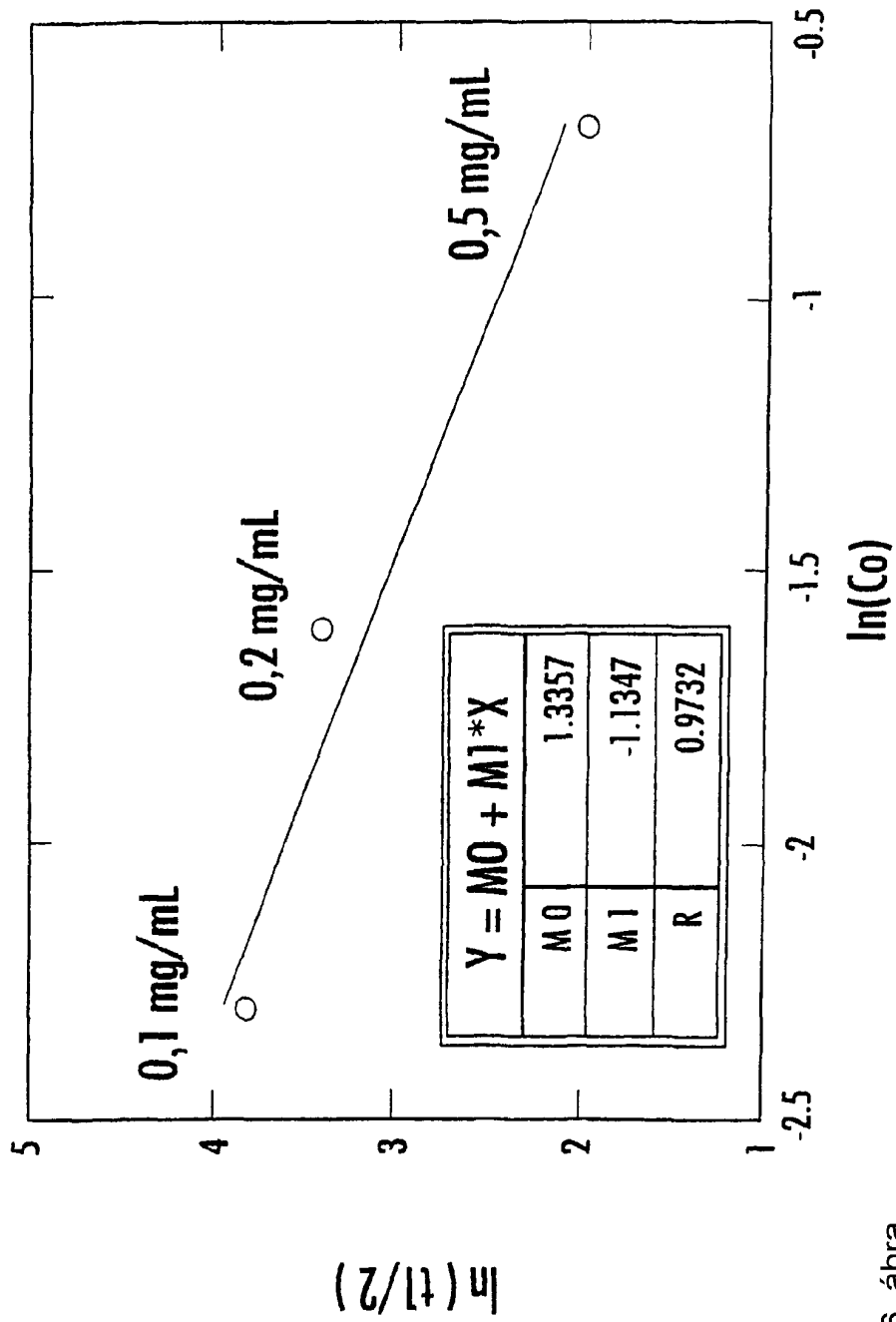
3. ábra



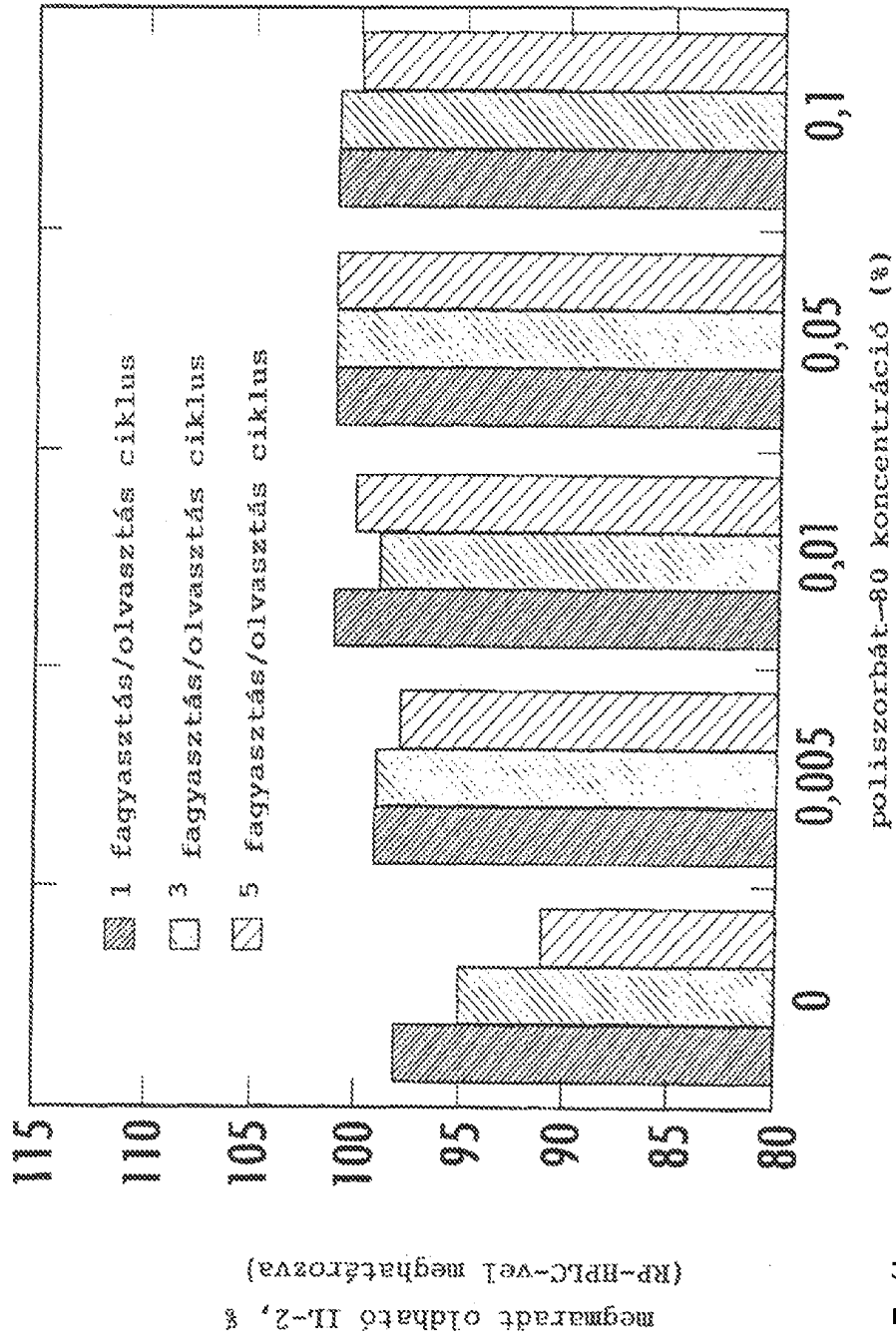
4. ábra



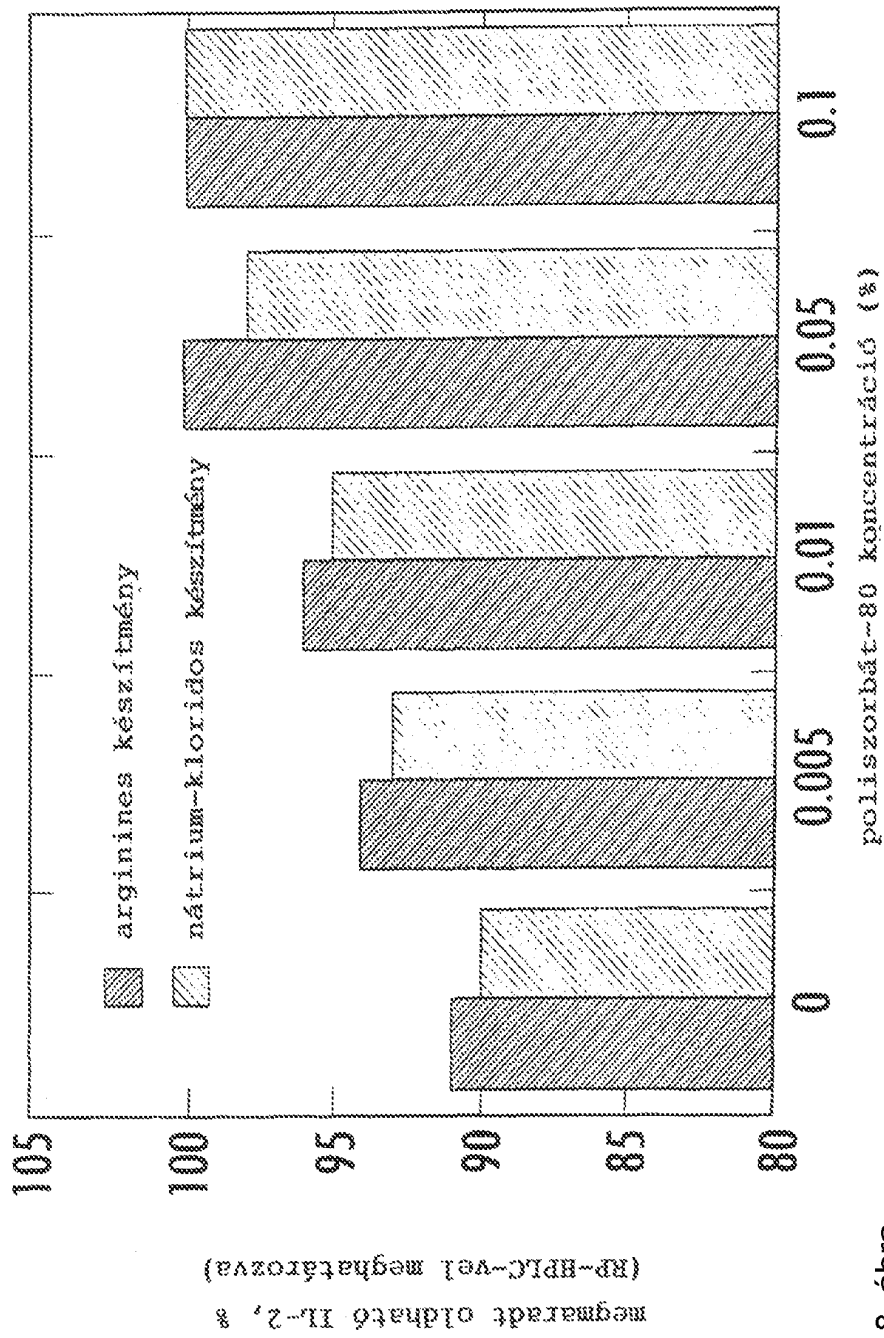
5. ábra



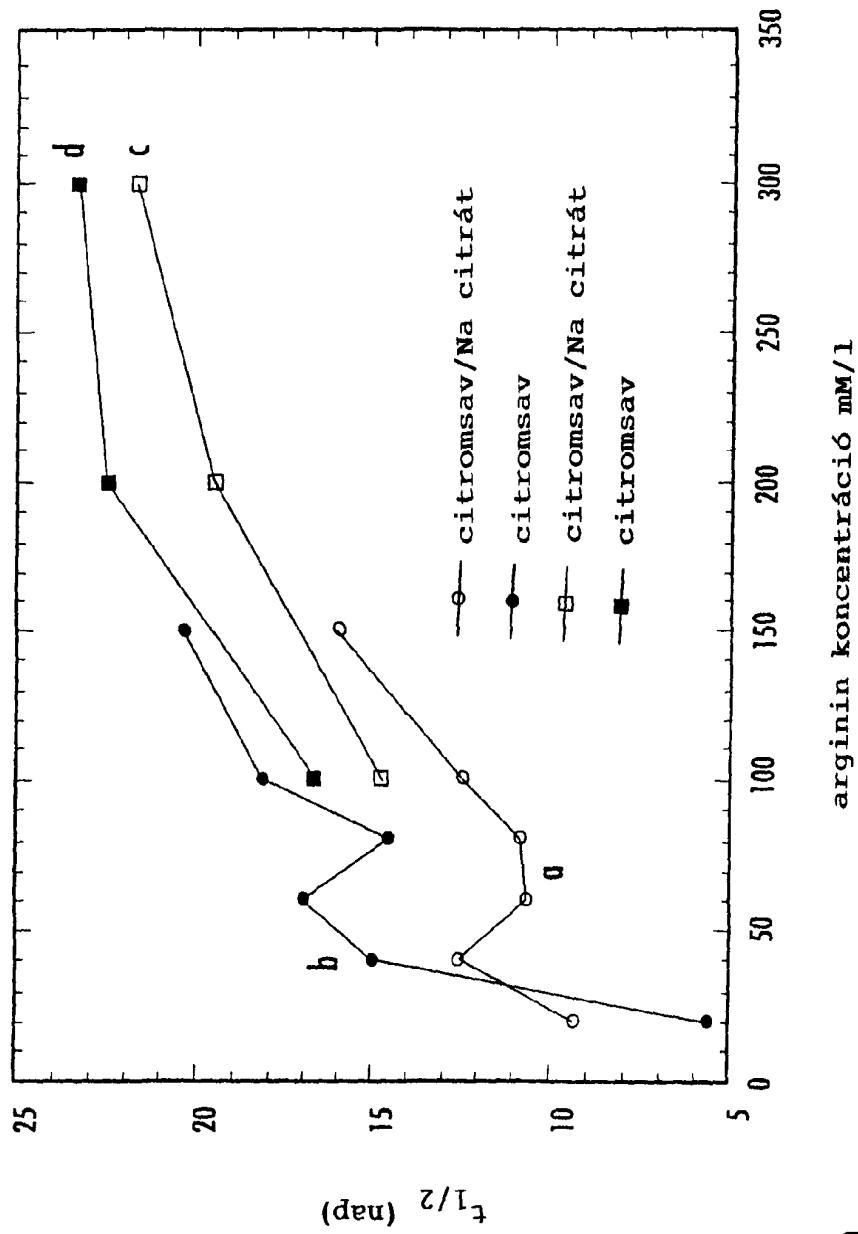
6. ábra



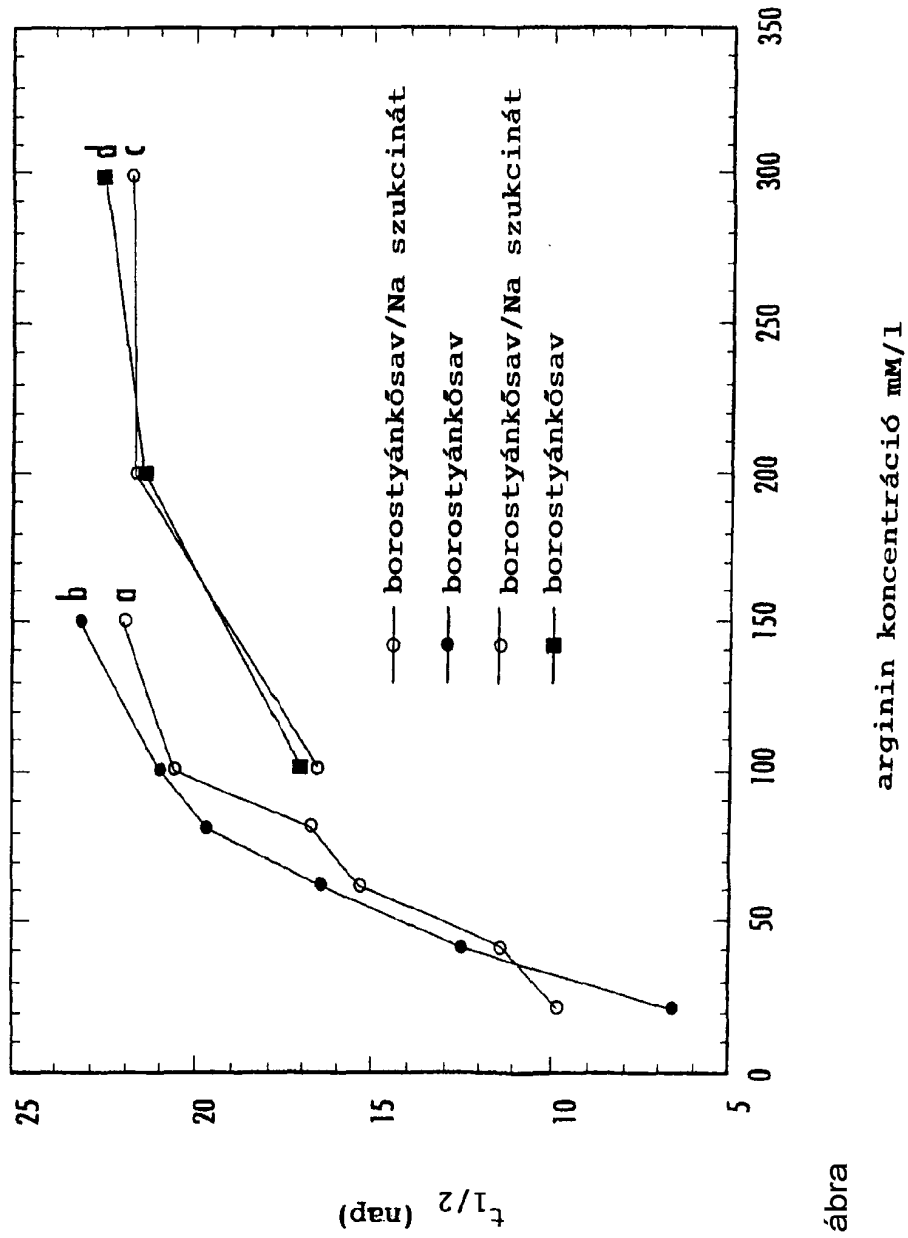
7. ábra



8. ábra



9. ábra



10. ábra

