

(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG  
ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

# SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

**198627 B**

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

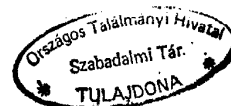
A 61 K 37/02  
A 61 K 31/70

(22) Bejelentés napja: 1987.07.17. (21) 3268/87

(30) Bejelentés elsőbbsége:  
(169486/86) 1986.07.18. JP  
(169487/86)  
(169488/86)  
(169489/86)

(40) Közzététel napja: 1988.05.30.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma  
a Szabadalmi Közlönyben: 1989.11.28.



(72) Feltaláló:  
MACHIDA Minoru, Tokió, (JP)

(73) Szabadalmas:  
Chugai Seiyaku Kabushiki  
Kaisha, Tokió (JP)

## (54) ELJÁRÁS GRANULOCITA TELEPSTIMULÁLÓ FAKTORT TARTALMAZÓ STABIL GYÓGYÁSZATI KÉSZÍTMÉNY ELŐÁLLÍTÁSÁRA

### (57) KIVONAT

A találmány tárgya granulocita telepstimuláló faktort tartalmazó stabil gyógyászati készítmény előállítására. A hatásos alkotórészt képező granulocita telepstimuláló faktort legálább egy gyógyászatiilag elfogadható anyaggal keverik össze az alábbiak közül: felületaktív anyagok, szacharidok, fehérjék, és nagy molekulatömegű anyagok.

**HU 198627 B**

A leírás terjedelme: 11 oldal, ábrák nélkül

A jelen találmány granulocita telepstimuláló faktort tartalmazó gyógyászati készítményre vonatkozik. Pontosabban jelen találmány granulocita telepstimuláló faktort tartalmazó, stabilizált olyan gyógyászati készítmény előállítására vonatkozik, amelyben az aktív komponens (vagyis a granulocita telepstimuláló faktor) veszteség vagy inaktiválódás ellen megvédjük, amely veszteség a készítménynek a tárolóedény falához való adszorpciója következtében, vagy a szóban forgó komponens asszociációja, polimerizációja vagy oxidációja következtében alakul ki.

Kemoterápiát alkalmaznak sokféle fertőző betegség kezelésére, de mostanában gyakran tapasztalják, hogy a kemoterápia súlyos klinikai problémákat okozhat, mint például gyógyszer-rezisztens organizmusok kialakulását, betegség-okozó organizmusok kicserélődését, és súlyos mellékhatásokat. A kemoterápiával együtt járó problémák, beleértve az olyan gyógyászati szereket, mint az antibiotikumok és baktericidok alkalmazásával együtt járó problémák kiküszöbölése érdekében olyan anyagok alkalmazásával kísérleteznek, amelyek aktiválják a gazdaszervezet megelőző képességeit valamely fertőzést okozó organizmus ellen, hogy ezáltal a kemoterápia fentebb említett problémáira minél tökéletesebb megoldást nyújtsanak. A gazdaszervezet különböző megelőző képességei közül a leukociták fagocitázis baktericid tevékenységét tekintik annak, amely a legerősebb befolyást gyakorolja a bakteriális fertőzés kezdeti periódusára, és ezért nagyon fontosnak tartják a gazdaszervezet fertőzés ellen védő képességeinek növelését olyan módon, hogy elősegítik a neutrofilek növekedését és differenciálódásukat érett állapotra. A granulocita telepstimuláló faktor (G-CSF) egyike azoknak a nagyon hasznos anyagoknak, amelyek ilyen aktivitást mutatnak; a jelen találmány bejelentői korábban már nyújtottak be szabadalmi bejelentést G-CSF-et alkalmazó, fertőzés ellen védő szerrel kapcsolatban (23 777/1985 számú japán szabadalmi bejelentés).

Amint fentebb említettük, a kemoterápia különböző elkerülhetetlen problémákat hordoz magában, és intenzív erőfeszítések folynak olyan gyógyászati anyagok alkalmazására, amelyek a gazdaszervezet vagy a fertőzött személy megelőző funkcióinak aktiválására képesek.

Szükségtelen hangsúlyozni, hogy a G-CSF önmagában mutatja azt a képességet, hogy aktiválja a gazdaszervezet megelőző funkcióit, és arra is rájöttek, hogy a G-CSF nagyobb terápiás hatást mutat a klinikai alkalmazásban, ha további olyan anyaggal kombinálva alkalmazzák, amely aktiválja a gazdaszervezet megelőző képességeit.

A G-CSF-et nagyon kis mennyiségben alkalmazzák, így általában 0,1-500 µg (előnyösen 5-50 µg) G-CSF-et adnak be hetenként 1-7-szer adott adagokban felnőtteknek.

A G-CSF azonban hajlamos arra, hogy adszorbeálódjon tárolóedényének, pl. az injekciós ampullának vagy fecskendőnek a falán. Ezért ha a gyógyszert injekciós formában vizes oldatként alkalmazzuk, ez tárolóedényének, pl. az ampullának vagy fecskendőnek a falán adszorbeálódik. Így a G-CSF elveszti azt a képességét, hogy gyógyászati szerként teljes aktivitását mutassa, vagy szükségessé teszi a kívántnál nagyobb mennyiségű G-CSF bevitelét, így egyenlítően ki az adszorpció következtében fellépő esetleges veszteséget.

Ezen túl a G-CSF labilis és nagy mértékben érzékeny a környezeti tényezőkre, mint a hőmérséklet, nedvesség, oxigén és ultraibolya sugarak. Az ilyen tényezők hatására a G-CSF olyan fizikai és kémiai változásokon megy keresztül, mint asszociáció, polimerizáció és oxidáció, és így nagy aktivitásvesztést szenved. Ezek a jelenségek nehézzé teszik a terápiás tevékenység teljes megvalósulását igen kis mennyiségű G-CSF beadásával nagyon szabatos módon.

Ezért szükséges G-CSF stabil gyógyászati készítményét kifejleszteni, amely teljes mértékben védve van a hatásos anyag aktivitásában végbemenő csökkenés ellen. Ez a jelen találmány elsődleges tárgya, amely találmány tehát G-CSF stabil gyógyászati készítményét nyújtja.

A jelen találmány feltalálói intenzív tanulmányokat folytattak abból a célból, hogy növeljék a G-CSF-et tartalmazó gyógyászati készítmények stabilitását, és arra jöttek rá, hogy ez a feladat hatásosan megvalósítható gyógyászati elfogadható felületaktív anyagok, szacharidok, fehérjék és/vagy nagy molekulatömegű vegyületek alkalmazásával.

Ennek megfelelően a jelen találmány szerinti, stabil G-CSF-et tartalmazó gyógyászati készítmény azzal jellemezhető, hogy a G-CSF mellett legalább egy anyagot tartalmaz az alábbiak közül: gyógyászati elfogadható felületaktív anyagok, szacharidok, fehérjék, és nagy molekulatömegű vegyületek.

A G-CSF-et, amelyet a jelen találmány szerinti gyógyászati készítmények tartalmaznak, bármilyen módszer szerint előállíthatjuk például a 153 273/1984, 269 455/1985, 269456/1985, 270 838/1985 és 270 839/1985 számú japán szabadalmi bejelentések leíró részében ismertetett módszerek szerint, így pl. a humán G-CSF-et el lehet készíteni vagy egy olyan sejtvonal (CNCM I-315 vagy I-483 letéti számon) tenyésztésével, amelyet szájuüregrákban szenvedő betegek tumorjából izoláltak, vagy egy rekombináns DNS (amelyet humán G-CSF-et kódoló gén közreműködésével készítettek) kifejezésével megfelelő gazdasejtben (pl. E. coli, C 127 sejt, vagy kínai hórcsög petefészek-sejtjei).

Bármilyen humán G-CSF, amelyet nagy mértékben tisztítottak, alkalmazható G-CSF-ként a jelen találmány szerinti gyógyászati

készítményekben. Előnyös humán G-CSF-ek azok, amelyeket valamilyen humán G-CSF termelő törzs tenyészetének felülűszójából izolálnak és az olyan polipeptidek vagy glikoproteinek, amelyek humán G-CSF aktivitással bírnak, és amelyeket olyan rekombináns vektorral transzformált gazdaszervezetből kapunk, amely vektor a humán G-CSF aktivitással bíró polipeptidet kódoló gént tartalmazza.

Két különösen előnyös G-CSF-re mutatunk be példát az alábbiakban.

(1) Humán G-CSF, amely a következő fizikokémiai jellemzőkkel bír:

i.) molekulatömeg: mintegy  
19 000 ±1000,  
nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gél elektroforézissel mérve:

ii.) izoelektromos pont:

5

az alábbi három izoelektromos pont közül legalsóbb egyvel rendelkezik:  
pI = 5,5 ± 0,1,  
pI = 5,8 ± 0,1,  
és

10 iii.) ultraibolya adszorpció:

maximuma van 280 nm-nél és minimuma van 250 nm-nél;

iv.) A 21 gyökből álló aminosavszekvencia az N-terminálistól kiindulva az alábbi:

15 H<sub>2</sub>N-Thr-Pro-Leu-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-Leu-Pro-Gln-Ser-Phe-Leu-Leu-Lys-Cys-Leu-Glu-Gln-Val-

(2) Humán G-CSF, amely vagy egy humán granulocita stimuláló faktor aktivitással rendelkező polipeptidet tartalmaz, amely polipeptid az alább bemutatott aminosavszekvenciának egészével vagy részével jellemezhető, vagy egy olyan glikoproteint tartalmaz, amely az előbb említett polipeptid-szerkezettel és egy cukorláncrészlettel rendelkezik:

(Met) <sub>n</sub>	Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro
Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Cys	Leu	Glu	Gln	Val
Arg	Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln
Glu	Lys	Leu	(Val	Ser	Glu)	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys
Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Leu	Leu	Gly
His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Ser
Ser	Cys	Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly
Cys	Leu	Ser	Gln	Leu	His	Ser	Gly	Leu	Phe	Leu
Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile
Ser	Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu
Gln	Leu	Asp	Val	Ala	Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Ile
Trp	Gln	Gln	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Ala	Pro
Ala	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met	Pro	Ala
Phe	Ala	Ser	Ala	Phe	Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly
Val	Leu	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gln	Ser	Phe	Leu
Glu	Val	Ser	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	His	Leu	Ala
Gln	Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(azzal a feltétellel, hogy m jelentése 0 vagy 1; és n jelentése 0 vagy 1).

A G-CSF említett két típusának előállítására szolgáló eljárások részleteivel kapcsolatban lásd a 153 273/1984, 269 455/1985, 269 456/1985, 270 838/1985 és 270 839/1985 számú japán szabadalmi bejelentéseket, amelyek mindegyikét a jelen találmány bejelentője nyújtotta be.

Egy másik módszer, amelyet alkalmazhatunk, G-CSF termelő sejtek fúziójának megvalósításából áll ön-burjánzó rosszindulatú tumor sejtekkel, és az így létrejövő hibridoma tenyésztéséből mitogén jelenlétében vagy anélkül.

A kapott humán G-CSF-et tartalmazó oldatot fagyasztott állapotban lehet tárolni, szükség esetén bármilyen ismert technikával

végzett tovább tisztítás és koncentráció után. Egy másik megoldás szerint az oldatot pl. fagyasztva szárítással végzett dehidráció után tárolhatjuk.

Az így készített humán G-CSF-ek mindegyikét fel lehet dolgozni a jelen találmány szerinti leírás alapján abból a célból, hogy stabil, G-CSF-et tartalmazó gyógyászati készítményt kapjunk.

A tipikus felületaktív anyagok, amelyeket használhatunk a jelen találmány szerinti stabil, G-CSF-et tartalmazó gyógyászati készítmény kialakításához, például a következők: nemionos felületaktív anyagok 6-18 HLB-vel, mint pl. szorbitán alifás karbonsav-észterei (pl. szorbitán monokaprilát, szorbitán monolaurát és szorbitán monopalmitát), glicerin alifás karbonsav észterei (pl. glicerin

monokaprilát, glicerin monomirisztát, és glicerin monosztearát), poliglicerin alifás karbonsav észterei (pl. dekagliceril-monosztearát, dekagliceril-disztearát és dekagliceril-monolinoleát), polioxietilén-szorbitán alifás karbonsav-észterei (pl. polioxietilén-szorbitán-monolaurát, polioxietilén-szorbitán-monoleát, polioxietilén-szorbitán-monosztearát, polietilén-szorbitán-monopalmitát, polioxietilén-szorbitán-tiroleát, és polioxietilén-szorbitán trisztearát), polioxietilén-szorbit alifás karbonsav észterei (pl. polioxietilén szorbit-tetrasztearát és polioxietilén-szorbit-tetraoleát), polietilén-glicerin alifás karbonsav észterei (pl. polioxietilén-gliceril-monosztearát), polietilén-glikol alifás karbonsav észterei (pl. polietilén-glikol-disztearát), polioxietilén-alkil-éterek (pl. polioxietilén-lauril-éter), polioxietilén-polioxipropilén-alkil-éterek (pl. polioxietilén-polioxipropilén-glikol-éter, polioxietilén-polioxipropilén-propil-éter, és polioxietilén-polioxipropilén-cetil-éter), polioxietilézett keményített hódzsír (pl. polioxietilézett, hidrogénezett hódzsír), és természetes felületaktív anyagok, mint pl. lecitin. Ezeket a felületaktív anyagokat természetesen lehet alkalmazni önmagukban vagy keverékben.

A fentebb felsorolt felületaktív anyagokat előnyösen 1-10 000 tömegrész/G-CSF tömegrész mennyiségben alkalmazzuk.

Az alkalmazható szacharidok a stabil G-CSF-et tartalmazó gyógyászati készítmények előállításában lehetnek monoszacharidok, oligoszacharidok és poliszacharidok, valamint ezek foszfátészterei és nukleotid-származékai, amennyiben ezek gyógyászatiilag elfogadhatók. Tipikus példákat sorolunk fel az alábbiakban: háromértékű és magasabb cukoralkoholok, mint pl. glicerin, eritrit, arabit, xilit, szorbit és mannit; savas cukrok, mint pl. glükuronsav, iduronsav, neuraminsav, galakturonsav, glukonsav, mannuronsav, ketoglikolsav, ketogalaktonsav és ketogulonsav; hiarulonsav és sói; kondroitin-szulfát és származékai, kitozán és származékai, dextrin, 5000-15 000 átlagos molekulatömegű dextrán, és alginsav és sói. Mindezeket a szacharidokat önmagukban vagy keverékben lehet alkalmazni.

A fentebb felsorolt szacharidokat előnyösen 1-10 000 tömegrész/1 tömegrész G-CSF mennyiségben alkalmazzuk.

A felhasználható fehérjékre tipikus példák a jelen találmány szerinti stabil, G-CSF-et tartalmazó gyógyászati készítmények készítésénél az alábbiak: humán szérum albumin, humán szérum globulin, zselatin, savval kezelt zselatin (átlagos móltömeg: 7000-100 000), alkálival kezelt zselatin (átlagos móltömeg: 7000-100 000), és kollagén. Szükségtelen hangsúlyozni, hogy ezek a fehérjék is alkalmazhatók anyagokban is, keverékben is.

A fentebb felsorolt fehérjéket előnyösen 1-20 000 tömegrész/1 tömegrész G-CSF mennyiségben alkalmazzuk.

A felhasználható nagy molekulatömegű anyagokra tipikus példák a jelen találmány szerinti stabil, G-CSF-et tartalmazó gyógyászati készítmények készítésénél az alábbiak: természetes polimerek, mint pl. hidroxipropil-cellulóz, hidroximetil-cellulóz; nátriumkarboximetil-cellulóz, és hidroxietil-cellulóz; és szintetikus polimerek, mint pl. polietilén-glikol (molekulatömeg: 300-600), polivinilalkohol (molekulatömeg: 20 000-100 000), és polivinilpirrolidon (molekulatömeg: 20 000-100 000). Szükségtelen hangsúlyozni, hogy ezek a nagy molekulatömegű anyagok alkalmazhatók egyedül is, de kombinációkban is.

A fentebb felsorolt nagy molekulatömegű anyagokat kívánatosan 1-20 000 tömegrész/1 tömegrész G-CSF mennyiségben alkalmazzuk.

A fentebb leírt felületaktív anyagokon, szacharidokon, fehérjéken vagy nagy molekulatömegű anyagokon kívül legalább egy további anyagot alkalmazhatunk a jelen találmány szerinti, G-CSF-et tartalmazó gyógyászati készítmények előállításánál: aminosavak, kén-tartalmú redukálószer, és antioxidánsok. Az aminosavak lehetnek például glicin, treonin, triptofán, lizin, hidroxilizin, hisztidin, arginin, cisztein, cisztin és metionin. A kén-tartalmú redukálószer lehetnek például N-acetil-cisztein, N-acetil-homocisztein, tioktánsav, tioglikol, tio-etanolamin, tioglicerin, tioszorbit, tioglikolsav és sói, nátrium-tioszulfát, nátrium-hidrogén-szulfid, nátrium-piroszulfid, nátrium-szulfid, tio-tejsav, ditiotretin, glutation, és valamilyen enyhe, kén-tartalmú redukálószer, amely merkapto-csoporttal rendelkezik, mint pl. valamely 1-7 szénatomos tioalkánsav. Az antioxidánsok lehetnek például eritorbinsav, dibutil-hidroxitoluol, butil-hidroxianizol, d1- $\alpha$ -tokoferol, tokoferol acetát, L-aszkorbinsav és sói, L-aszkorbinsav palmitát, L-aszkorbinsav sztearát, triamilgallát, propilgallát, és kelátképző szerek, mint pl. dinátrium-etilén-diamin-tetraacetát (EDTA), nátrium-pirofoszfát és nátrium-metafoszfát.

A fentebb felsorolt aminosavakat, kén-tartalmú redukálószereket és antioxidánsokat vagy keverékeiket 1-10 000 tömegrész/1 tömegrész G-CSF mennyiségben alkalmazzuk.

A jelen találmány szerinti stabil, G-CSF-et tartalmazó készítmény megfelelő dózisformára történő kiszerezésének céljából az alábbi szerekből egyet vagy többet lehet alkalmazni: hígítószerek, szolubilizáló segédanyagok, izotóniás szerek, kötőanyagok, pH-módosító szerek, nyugtató szerek és pufferek.

A jelen találmány szerinti stabilizált, G-CSF-et tartalmazó gyógyászati készítményeket vagy orális vagy parenterális adagolásnak megfelelően (pl. különböző utakon alkalmazott injekciók útján) lehet kiszerezni, és az adagolási formák széles választékát lehet alkalmazni a beadás adott módjától függően. Tipikus adagolási formák az alábbiak:

az orális beadásra szántak, mint tabletták, labdacskok, kapszulák, granulátumok és szuszpenziók; oldatok, szuszpenziók és fagyaszttva szárított készítmények, elsősorban intravénás injekciókhoz, szubkután injekciókhoz és intrakután injekciókhoz szántak, és a nyálkahártyán keresztül beadáshoz szántak, mint a végbélkúpok, nazális gyógyszerek, és hüvelykúpok.

A jelen találmány szerint legalább egy anyagot adunk a G-CSF-et tartalmazó gyógyászati készítményhez az alábbiak közül: felületaktív anyagok, szacharidok, fehérjék, vagy nagy molekulatömegű anyagok, ilyen módon akadályozzuk meg, hogy a készítmény adszorbeálódjék tárolóedényének falához vagy a fecskendő falához, ugyanakkor a készítmény stabil maradjon hosszabb időtartamon át.

A részletes mechanizmus, amellyel a fentebb említett anyagok stabilizálják a G-CSF-et, vagy megakadályozzák, hogy adszorbeálódjék, még nem tisztázott. A G-CSF felszínét, amely hidrofób fehérje, a felületaktív anyagok beborítják és szolubilizálják így megakadályozzák még a nyomnyi mennyiségben jelen levő G-CSF-et is, hogy tárolóedényének vagy a fecskendőnek a felületéhez adszorbeálódjék. A szacharidok vagy hidrofil, nagy molekulatömegű anyagok hidratált réteget alkothatnak a G-CSF és tárolóedénye vagy a fecskendő falának adszorptív felülete között, ilyen módon akadályozva meg a G-CSF adszorpcióját. A fehérjék versenghetnek a G-CSF-fel a tárolóedény vagy fecskendő falának adszorpciójáért, ilyen módon gátolva a G-CSF adszorpcióját.

A G-CSF adszorpciójának megakadályozásán kívül a fentebb említett anyagok részt vehetnek a G-CSF molekulák összekapcsolódásának vagy polimerizációjának megakadályozásában is. Felületaktív anyagok, szacharidok, fehérjék vagy nagy molekulatömegű vegyületek jelenlétében az egyes G-CSF molekulák diszpergálódnak ezekben az anyagokban, és a G-CSF molekulák közti kölcsönhatás megfelelően csökken, így csökken ezek összekapcsolódásának vagy polimerizációjának valószínűsége. Ezen kívül ezek az anyagok gátolhatják a G-CSF autooxidációját, amely magas hőmérsékleten és nedvességtartalomnál felgyorsul, és megakadályozzák, hogy a G-CSF összekapcsolódjék vagy polimerizálódjék autooxidációja eredményeképpen. A G-CSF autooxidációjának, összekapcsolódásának és polimerizációjának gátlása tovább fokozható valamely aminosav, kéntartalmú redukálószer vagy autooxidáns hozzáadásával.

A fentebb leírt problémák főleg injekciókhoz való oldatok és szuszpenziók esetén lépnek fel, de előfordulnak a G-CSF kiszérésének olyan eljárásai során is, amikor más adagolási formáról, pl. tablettákról van szó. Felületaktív anyagok, szacharidok, fehérjék

vagy nagy molekulatömegű anyagok hozzáadása hatásos ez utóbbi esetben is.

Felületaktív anyagok, szacharidok, fehérjék és nagy molekulatömegű anyagok, legalább egyikének az adagolása révén a G-CSF nagy mértékben stabilizálódik, és aktivitása meghosszabbított időtartamon át fennmarad, amint ezt a későbbi példák mutatják. Hogy ezeket az eredményeket elérjük, ezen anyagok mindegyikének mennyisége, különösen alsó határán kritikus, és a következő tartományok kívánatosak: 1-10 000 tömegrész felületaktív anyag, 1-10 000 tömegrész szacharid, 1-20 000 tömegrész fehérje és 1-20 000 tömegrész nagy molekulatömegű anyag, 1 tömegrész G-CSF-re vonatkoztatva.

A jelen találmány szerint a felületaktív anyagokat, szacharidokat, fehérjéket és/vagy nagy molekulatömegű anyagokat meghatározott koncentrációban alkalmazzuk, és ez hatásos nemcsak annak megakadályozásában, hogy a G-CSF tárolóedényének vagy egy fecskendőnek a falára adszorbeálódjék, hanem abban is, hogy a G-CSF-et tartalmazó gyógyászati készítmény stabilitása növekedjék. Ennek eredményeképpen lehetővé válik kicsiny, de nagyon pontos G-CSF adag beadásának biztosítása; mivel a G-CSF költséges anyag, hatékony felhasználása kisebb költségeket eredményez a G-CSF-et tartalmazó gyógyászati készítmények előállításánál.

A következő példákat abból a célból ismertetjük, hogy pontosabban bemutassuk a jelen találmányt, de ezeknek nem az a célja, hogy korlátozzák a találmány oltalmi körét. Ezekben a példákban a G-CSF maradék aktivitását az alábbi módszerek egyikével határozzuk meg.

(a) Egér csontvelő-sejteket alkalmazó lágy agar módszer

Lószérumot (0,4 ml), 0,1 ml mintát, 0,1 ml C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>/He (nőstény) egér csontvelő-sejt szuszpenziót (0,5-1.10<sup>5</sup> magos sejt), és 0,4 ml módosított McCoy-5A tenyésztő oldatot, amely 0,75% agart is tartalmaz, összekeverünk, szövettenyésztésre szolgáló műanyag csészébe (35 mm $\varnothing$ ) öntjük, koaguláljuk, és 5 napon át tenyésztjük 37 °C hőmérsékleten 5% CO<sub>2</sub>/95% levegő atmoszférában, 100% nedvességtartalomnál. A képződött telepek számát megszámloljuk (egy telep legalább 50 sejtet tartalmaz), és az aktivitást meghatározzuk oly módon, hogy egy egységnek tekintjük azt az aktivitást, amely egy telepet képez.

Az (a) módszerben alkalmazott módosított McCoy 5A tenyésztő oldatot a következő eljárással állítjuk elő.

Módosított McCoy 5A tenyésztő oldat (dupla koncentráció)

12 g McCoy 5A tenyésztő oldatot (Gibco), 2,55 g MEM aminosav-vitamin tápközeget (Nissui Seiyaku Co., Ltd.), 2,18 g nátrium-hidrogén-karbonátot, és 50 000 egység kálium-G-penicillint feloldunk 500 ml kétszer desztillált vízben, és az oldatot aszeptikusan szűrjük Millipore szűrőn keresztül (0,22 m).

(b) Fordított fázisú, nagy teljesítményű folyadékromatográfia

Fordított fázisú C8 oszlopot (4,6 mm x 300 mm; 5 m) és mozgó fázisként n-propanol/trifluor-ecetsav keveréket alkalmazva a G-CSF maradék aktivitását (1 µg-mal ekvivalens mennyiségben injektálva) a következő gradiens-körülmények közt határozzuk meg:

Idő (sec)	(A) Oldószer	(B) Oldószer	Gradiens
0	100%	0%	} lineáris
15	0%	100%	
25	100%	0%	

(A) oldószer: 30% n-propanol és 0,1% trifluor-ecetsav

(B) oldószer: 60% n-propanol és 0,1% trifluor-ecetsav

A kimutatást 210 nm hullámhossznál végezzük, és a maradék G-CSF aktivitásának százalékát a következő képlettel számítjuk ki:

$$\text{Maradék G-CSF aktivitás\%} = \frac{\text{a G-CSF maradék mennyisége egy adott idő eltelte után}}{\text{a G-CSF kiindulási mennyisége}} \times 100$$

A G-CSF ezzel a módszerrel meghatározott maradék mennyisége nagyon jól egybehang az egér csontvelő-sejteket alkalmazó lágy agar (a) módszerrel végzett mérésekben elért eredményekkel.

#### 1. példa

5 µg G-CSF-hez az 1. táblázatban felsorolt stabilizáló szerek egyikét adjuk, és a keveréket aszeptikusan oldjuk 20 mmól/l pufferoldatban (amely 100 mmól/l nátrium-kloridot tartalmaz; pH 7,4) hogy 5 µg G-CSF/ml-t tartalmazó gyógyászati készítményt állítsunk elő, amelyet azután fagyasztva szárítunk. A G-CSF aktivitásának változását az idő függvényében az (a) módszerrel mérjük, és az eredményeket az 1. táblázat-

ban mutatjuk be. Az „aktivitás (%)” kifejezés a táblázatban a G-CSF maradék aktivitását képviseli a kiindulási egységre vonatkoztatva, és ezt következő képlettel határozzuk meg:

$$\text{Aktivitás (\%)} = \frac{\text{aktivitás egység egy adott idő eltelte után}}{\text{kiindulási aktivitás-egység}} \times 100$$

Valamely stabilizálószer tartalmazó G-CSF-et tartalmazó oldatot steril, szulfa-kezelte üvegfiolába helyezünk, -40 °C vagy alacsonyabb hőmérsékleten fagyasztjuk 4 órán át, a szárítás első lépésében a hőmérsékletet 48 óra alatt -40 °C-ról 0 °C-ra emeljük, eközben 4 Pa-ról 13 Pa-ra növelve a nyomást majd a második lépésben 12 óra alatt 0 °C-ról 20 °C-ra emeljük a hőmérsékletet, eközben a nyomást 13 Pa-ról 35 Pa-ra növeljük, ez után a fiola belsejét steril száraz nitrogéngázzal töltjük meg, hogy atmoszférikus nyomást érjünk el, és a fiolát fagyasztva-száritó gumidugóval ledugaszoljuk, majd alumínium kupakkal lezárjuk.

1. TÁBLÁZAT

Stabilizálószer	Mennyiség (tömegrész)	4 °C hőmérsékleten 6 hónapon át végzett tárolás után	37 °C hőmérsékleten 1 hónapon át végzett tárolás után
xilit	10 000	92	86
mannit	10 000	91	85
glükuronsav	10 000	86	82
hialuronsav	2000	92	89
dextrán (molekulatömeg: 40 000)	2000	95	90
heparin	5000	85	80
kitozán	2000	93	91
alginsav	2000	90	90
humán szérum albumin	1000	98	99

Stabilizáló szer	Mennyiség (tömegrész)	Aktivitás (%)			humán szérum albumin 2000			
		4 °C hőmérsékleten 6 hónapon át végzett tárolás után	37 °C hőmérsékleten 1 hónapon át végzett tárolás után					
				5	hidroxipropilcellulóz	500	98	92
				10	dextrán (molekulatömeg: 40 000)	2000		
humán szérum globulin	1000	98	95	15	polioxi- etilén- -szorbítán-mono- laurát	100	98	96
savval kezelt zselatin	2000	97	95		szorbit	2000		
alkálival kezelt zselatin	1000	99	96	20	polioxi- lezett, keményített hód- zsír	100		
kollagén	2000	95	90	25	dextrán (molekulatömeg: 40 000)	2000	94	92
polietilén-glikol (molekulatömeg: 40 000)	10 000	94	90	30	adalék nélkül	--	74	58
hidroxipropilcellulóz	1000	98	94					
nátrium-karboximetilcellulóz	1000	88	80	35				
hidroximetilcellulóz	5000	92	90	40				
polivinil alkohol (molekulatömeg: 50 000)	2000	96	95	45				
polivinilpirrolidon (molekulatömeg: 50 000)	2000	95	94	50				
humán szérum albumin	2000							
mannit cisztein	2000 100	100	97	55				
humán szérum albumin	2000							
polioxi- etilén- -szorbítán-mono- laurát	100	99	96	60				
mannit	2000			65				

## 2. példa

10 µg G-CSF-hez a 2. táblázatban felsorolt stabilizáló szerek egyikét adjuk, és a keveréket aseptikusan oldjuk 20 mmól/l foszfát puffer oldatban (amely 100 mmól/l nátrium-kloridot tartalmaz; pH 7,4), hogy 10 µg G-CSF/ml-t tartalmazó gyógyászati készítményt állítsunk elő. A készítményt aseptikusan szulfa-kezelt üvegfiolába töltjük és lezárjuk, így készítve G-CSF oldatot. A G-CSF aktivitásának változását az idő függvényében azonos módszerrel mérjük, mint amelyet az 1. példában alkalmaztunk; az eredményeket a 2. táblázat tartalmazza.

## 2. TÁBLÁZAT

Stabilizálószer	Mennyiség (tömegrész)	Aktivitás (%)		
		4 °C hőmér- sékleten 7 napon át végzett tárolás	4 °C hőmér- sékleten 2 hónapon át végzett tárolás	Szobahő- mérsékle- ten 1 hóna- pon át vég- zett táro- lás
mannit	5000	91	87	82
hiarulonsav	2000	93	87	70
dextrán (molekulatö- meg: 40 000)	2000	96	95	85
glicerin	10 000	90	90	88
neuraminsav	5000	93	91	84
kitin	2000	95	92	86
dextrin	2000	90	92	87
humán szérum albumin	1000	99	95	92
humán szérum globulin	1000	98	94	90
savval kezelt zselatin	2000	97	96	87
alkálival kezelt zselatin	500	99	95	92
kollagén	2000	99	94	88
polietilénlikol (mo- lekulátömeg: 40 000)	10 000	94	89	90
hidroxi-propil-cellulóz	2000	98	95	92
nátrium-karboximetil- -cellulóz	2000	92	91	80
hidroxi-etil-cellulóz	4000	92	94	90
polivinilalkohol (mo- lekulátömeg: 40 000)	4000	97	93	90
polivinilpirrolidon (molekulátömeg: 40 000)	4000	95	95	92
szorbitán-monolaurát	400	97	96	95
polioxietilén-szorbi- tán-monolaurát	400	100	96	94
polioxietilén-szorbi- tán-monosztearát	400	98	97	94
polioxietilén-polioxi- propilén-glikoléter	400	100	94	93

Stabilizálószer	Mennyiség (tömegrész)	Aktivitás (%)		
		4 °C hőmér- sékleten 7 napon át végzett tárolás	4 °C hőmér- sékleten 2 hónapon át végzett tárolás	Szobahő- mérsékle- ten 1 hóna- pon át vég- zett táro- lás
polioxilezett, keményi- tett hódzsír	400	99	98	90
nátrium-lauril-szulfát	2000	97	93	87
lecitin	2000	97	94	90
humán szérum albumin	2000			
mannit	2000	100	99	97
cisztein	100			
humán szérum albumin	2000			
polioxietilén-szorbi- tán-monolaurát	100	99	97	95
mannit	2000			
humán szérum albumin	1000			
hidroxi-propil-cel- lulóz	500	99	97	95
dextrán (molekulatö- meg: 40 000)	2000			
polioxietilén-szorbi- tán-monopalmitát	100	96	96	93
szorbit	2000			
polioxietilezett, ke- ményített hódzsír	100	95	92	92
dextrán (molekulatö- meg: 40 000)	2000			
adalék nélkül	--	72	61	47

### 3. példa

10 µg G-CSF-hez a 3. táblázatban felsorolt stabilizálószer egyikét adjuk, és a keveréket aszeptikusan oldjuk 20 mmól/l foszfát puffer oldatban (amely 100 mmól/l nátrium-kloridot tartalmaz, pH 7,4), hogy 10 µg G-CSF/ml-t tartalmazó gyógyászati készítményt állítsunk elő. 1 ml készítményt szulfakezelt, szilikonnal bélelt üvegfiolába töl-

tünk, és 4 °C hőmérsékleten hagyjuk állni. Az egyes stabilizáló szereknek a G-CSF adszorpciójának megakadályozásában kifejtett hatékonyságát olyan módon értékeljük, hogy megmérjük a G-CSF maradék aktivitását az oldatban 0,5; 2; és 24 óra múlva. A mérést a (b) módszerrel hajtjuk végre, fordított fázisú, nagy teljesítményű folyadékromatográfiát alkalmazva. Az eredményeket a 3. táblázatban mutatjuk be.

## 3. TÁBLÁZAT

Stabilizálószer	Mennyiség (tömegrész)	Maradék aktivitás (%)			
		kezdeti	0.5 h	2 h	24 h
mannit	5000	100	93	90	91
hiarulonsav	2000	100	97	92	92
dextrán (molekulatö- meg: 40 000)	2000	100	98	95	96
glicerín	10 000	100	94	91	90
heparin	2000	100	92	90	90
glükuronsav	5000	100	96	90	91
ketoglikolsav	5000	100	92	88	90
humán szérum albumin	1000	100	100	101	99
humán szérum globulin	1000	100	98	100	98
alkálival kezelt zse- latin	500	100	99	98	99
savval kezelt zselatin	2000	100	99	97	97
kollagén	2000	100	100	98	99
polietilénlikol (mo- lekulátömeg: 4000)	10 000	100	100	100	99
hidroxipropil-cellulóz	2000	100	100	100	99
nátrium-karboximetil- cellulóz	2000	100	98	96	95
hidroxietil-cellulóz	4000	100	96	93	92
polivinilalkohol (mo- lekulátömeg: 50 000)	4000	100	99	100	98
polivinilpirrolidon (molekulátömeg: 50 000)	4000	100	98	98	96
szorbitán monokaprilát	400	100	100	100	98
polioxietilén-szorbi- tán-monosztearát	400	100	100	98	100
polioxietilezett, ke- ményített hódzsír	400	100	99	101	99
nátrium-lauril-szulfát	2000	100	100	99	97
lecitin	2000	100	99	100	98
humán szérum albumin	2000				
mannit	2000	100	100	100	101
cisztein	100				

Stabilizálószer	Mennyiség (tömegrész)	Maradék aktivitás (%)			
		kezdeti	0.5 h	2 h	24 h
humán szérum albumin polioxietilén-szorbi- tán-monolaurát mannit	2000 100 2000	100	100	98	99
humán szérum albumin hidroxi-propil-cellulóz dextrán (molekulatömeg: 40 000)	1000 500 2000	100	101	99	100
polioxietilén-szorbi- tán-monolaurát szorbit	100 2000	100	100	99	99
polioxilezett, ke- ményített hódzsír dextrán (molekulatö- meg: 40 000)	100 2000	100	100	98	97
adalék nélkül	--	100	91	72	73

## SZABADALMI IGÉNYPONT

Eljárás granulocita telepstimuláló faktort tartalmazó stabil gyógyászati készítmény előállítására, azzal jellemezve, hogy 1 tömegrész granulocita telepstimuláló faktort 1-10 000 tömegrész felületaktív anyaggal 1-10 000 tömegrész szachariddal, 1-20 000 tömegrész fehérjével és/vagy 1-20 000 tömegrész nagy molekulatömegű anyaggal összekeverve gyógyászati készítménnyé alakítunk, ahol felületaktív anyagként legalább egy nem-ionos felületaktív és/vagy természetes felületaktív anyagot, éspedig nem-ionos felületaktív anyagként szorbitán alifás karbonsav-észterét, glicerín alifás karbonsav észterét, poliglicerín alifás karbonsav észterét, polioxietilén-szorbitán alifás karbonsav észterét, polioxietilén-szorbit alifás karbonsav észterét, polioxietilén-glicerín alifás karbonsav észterét, polietilén-glikol alifás karbonsav-észterét, polioxietilén-alkil-étert, polioxietilén-polioxipropilén-alkil-étert, természetes felületak-

tív anyagként lecitint, szacharidként előnyösen glicerint, eritritet, arabitot, xilitet, szorbitot, mannitot, glükuronsavat, iduronsavat, galakturonsavat, neuraminsavat, glukonsavat, mannuronsavat, ketoglikolsavat, ketogalaktonsavat ketogulonsavat és/vagy sóit, hialuronsavat és/vagy sóit, kondroitin-szulfátot és/vagy sóit, heparint, inulint, kitint és/vagy származékait, ki-tozánt és/vagy származékait, dextrint, 5000-150 000 átlagos molekulatömegű dextránt és/vagy algin-savat és/vagy sóit, fehérjeként humán szérum albumint, humán szérum globulint, zselatint, sával vagy alkálival kezelt, 7000-100 000 átlagos molekulatömegű zselatint és/vagy kollagént, nagy molekulatömegű anyagként hidroxipropil-cellulózt, hidroximetil-cellulózt, nátrium-karboxi-metil-cellulózt, hidroxietil-cellulózt, 300-6000 átlagos molekulatömegű polietilén-glikolt, 20 000-100 000 átlagos molekulatömegű polivinilalkoholt és/vagy 20 000-100 000 átlagos molekulatömegű polivinilpirrolidont alkalmazunk.

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest - A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető  
R 1874 - KJK

90.2398.66-13-2 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Benkő István vezérigazgató