



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 90108133.7

[51] Int.Cl⁵

A61K 37/66

[43] 公开日 1991年4月10日

<p>[22]申请日 90.9.27 [30]优先权 [32]89.9.28 [33]CH [31]3514/89 [71]申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司 地址 瑞士巴塞尔 [72]发明人 阿尔贝托·费罗</p>	<p>[74]专利代理机构 中国专利代理有限公司 代理人 曹恒兴</p> <p>C07K 15/26</p> <p>说明书页数: 9 附图页数:</p>
---	--

[54]发明名称 稳定白细胞干扰素的方法

[57]摘要

本文介绍用二糖和任意胆汁酸或胆汁酸衍生物处理人的干扰素,使之达到稳定状态。

权 利 要 求 书

1、一种制备含 α -干扰素、二糖和任意胆汁酸或胆汁酸衍生物的组合作物的方法，其特征在于用二糖和任意胆汁酸或胆汁酸衍生物处理 α -干扰素，最好用甘氨酸处理，必要时，将所得溶液冻干。

2、按权利要求1的方法，其特征在于采用天然或重组体人的白细胞干扰素，最好为 γ -IFN- α A。

3、按权利要求1或2的方法，其特征在于采用浓度为0.5%至15%（重量/体积），最好为5%（重量/体积）的乳糖或蔗糖。

4、按权利要求1-3的方法，其特征在于采用浓度为0.1%至3.0%（重量/体积）的胆汁酸或胆汁酸衍生物，最好是浓度为0.1%到1%（重量/体积）的甘氨酸。

5、按权利要求4的方法，其特征在于采用浓度为0.5%（重量/体积）的胆汁酸衍生物，最好是浓度为0.5%（重量/体积）的甘氨酸。

6、按权利要求1的方法，其特征在于采用 γ -IFN- α A，5%（重量/体积）乳糖和0.5%（重量/体积）甘氨酸。

7、按权利要求1-6中任一项所述方法制得的组合作物为基础的药物制剂。

8、二糖最好是浓度为0.5%至15%（重量/体积）的乳糖或蔗糖和任意的胆汁酸或胆汁酸衍生物，最好是浓度为0.1%至1%（重量/体积）的甘氨酸用于 α -干扰素的稳定化。

9、按权利要求1-6之任一项所述方法制得的组合作物用于制备预防或治疗免疫调节异常的药物制剂。

10、按权利要求1-6之任一项所述方法制得的组合作物用于制备防治病毒感染的药物制剂。

1 1、按权利要求1 - 6 之任一项所述方法制得的组合物用于制备防治免疫调节异常的药物制剂。

1 2、按权利要求1 - 6 之任一项所述方法制得的组合物用于制备防治瘤的药物制剂。

1 3、按权利要求1 - 6 之任一项所述方法制备的含 α - 干扰素、二糖和任意胆汁酸或胆汁酸衍生物的组合物。

稳定白细胞干扰素的方法

本发明涉及用二糖和任意胆汁酸或胆汁酸衍生物使白细胞干扰素 (IFN- α)，特别是冻干型IFN- α 稳定化的方法。

对IFN- α 可以理解为具有抗病毒和免疫调节活性的体特异性蛋白。就抗病毒感染而言，其抗病毒作用不是通过对病毒本身的直接影响，而是通过对它们的靶细胞作用达到的。除抗病毒活性之外， α -干扰素还对癌肿瘤产生具体作用，使之适用于治疗癌症，而且影响身体的免疫系统，例如，它激活巨噬细胞和NK细胞，并且增强细胞膜在免疫学上有意义的各种组分的表达。

由于DNA重组技术的出现，目前可用微生物方法大量制备IFN- α ，但尽管作了最大努力，迄今尚不能从天然物质（白细胞，淋巴细胞）分离和纯化制得。

为加强临床试验，首次开拓了这一新技术，尽可能广泛地将IFN- α 用于治疗，并且有可能为人们探索用活性物质进行治疗而提供足够的活性物质。

目前存在的问题是：纯IFN- α 在贮存期间不够稳定，并逐渐失去生物活性。

因此，为提高IFN- α 的稳定性，已使用了各种辅药。加入甘氨酸就可使IFN- α 达到一定程度的稳定状态（参见Publ. PCT 申请86/00,531 号和欧洲专利公开82,481号），但最好同时加入白蛋白。

在致力于使IFN- α 尽可能长期保持良好的稳定状态，同时又避免应用高分子化合物（例如血清白蛋白，动物胶，葡聚糖或淀粉衍生物）的过程中，已经发现采用二糖和任意胆汁酸或胆汁酸衍生物是成功的。

因此，本发明涉及一些组合物，尤以冻干型为最佳，该组合物含有二糖和任意胆汁酸或胆汁酸衍生物；以及涉及组合物的制备方法，该方法包括用二糖和任意胆汁酸或胆汁酸衍生物处理IFN- α 溶液，必要时将所得溶液冻干；本发明还涉及以本发明组合物为主的药物制剂，以及二糖和任意胆汁酸或胆汁酸衍生物在IFN- α 的稳定化方面的应用。

本发明组合物可用于制备防治大量感染和免疫调节异常（尤其是瘤）的药物制剂。

稳定化作用可适用于天然或重组体IFN- α (γ -IFN- α)。重组体IFN- α A(γ -IFN- α A)是本发明特别优选的IFN- α 。本发明组合物中IFN- α 含量并不严格要求，其浓度范围超过10的倍率，并且主要仅受IFN- α 溶解度上限的限制。在人IFN- α 情况下，可考虑的浓度高达 5×10^8 国际单位(I. U.)/ml，优选为 0.1×10^6 至 1×10^5 I. U./ml，最好为 1×10^6 至 5×10^7 I. U./ml。

将二糖（最好为乳糖或蔗糖）加到浓度为0.5%至15%（重量/体积），最好为5%（重量/体积）的IFN- α 溶液中。

胆汁酸或胆汁酸衍生物可以是，例如，胆酸，脱氧胆酸，甘氨脱氧胆酸，牛磺脱氧胆酸，鹅脱氧胆酸，甘氨鹅脱氧胆酸，牛磺鹅脱氧胆酸，甘氨胆酸和牛磺胆酸。其中，以甘氨胆酸为最佳。将其加到浓度为0.01至3%（重量/体积），最好为0.5%（重量/体积）的IFN- α 溶液中。

还可加入其它辅药，例如，pH调节剂（如氢氧化钠），pH缓冲剂（如磷酸盐缓冲剂和柠檬酸缓冲剂），等渗剂（如氯化钠）和防腐剂（如对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯），以及加固冻干组织的试剂（如甘氨酸）。

下面实施例详述本发明内容。

按照文献中所述的已知方法或本技术领域人员熟知的方法，可以得到实施例中所用的纯 γ -IFN- α A。

为测定 γ -IFN- α A 的抗病毒活性，用 Madison Darby 牛肾脏 MDBK 细胞和 VSV (水疱性口炎病毒) 病毒进行细胞病理学的试验，已由 Rubinstein 等人作过介绍 [参见 J. Virol. 37, 755-758 (1981)]。MDBK 细胞和 VSV 病毒一般容易得到和能够得到，例如，可由美国标准菌库 (ATCC) (MDBK: ATCC Nos. CCL21 和 CRL6071; VSV: ATCC No. VR-159) 得到。

研究稳定性试验时，将含 γ -IFN- α A 和添加剂的溶液于不同温度 (5 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C, 35 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C 和 65 $^{\circ}$ C) 下冻干和贮存。经预定的时间后，测定仍在冻干物中存在的 IFN- α 的抗病毒活性。

下面实施例是为了说明本发明而非限制本发明。

实施例1

将 3 百万 I. U. 的 γ -IFN- α A 溶于 1 ml 含有人血清白蛋白、甘氨酸或乳糖和其它任意辅药 (参见表1) 的水中，所得溶液经无菌过滤 (隔膜过滤器，孔径为 0.2 μ m)，装入 10 ml 玻璃小瓶中，然后放在经蒸汽消毒的冰冻干燥器内。该溶液于 -40 $^{\circ}$ C 冰冻 4 小时后，在压力为 0.1 mbar、约 -30 $^{\circ}$ C 下进行真空冻干法的初级干燥 14 小时，接着在全真空、+20 $^{\circ}$ C 下进行第二级干燥 4 小时，充氮下，在冰冻干燥器内，用合适的铝盖封闭玻璃小瓶，接着进行各种稳定性试验。试验结果列于表1。

表 1 含 γ -IFN- α A 的冻干组合物

冻干物成分	1	2	3	4	5
γ -IFN- α A (百万 I. U.)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
氯化钠 (mg)	9.0	-	-	-	-
人血清白蛋白 (mg)	5.0	-	-	-	-
无致热质甘露糖醇 (mg)	-	-	-	-	20.0

甘氨酸(mg)	-	20.0	-	10.0	-
乳糖(mg)	-	-	50.0	-	-
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 加至pH7.4	-	适量	-	-	适量
NaOH IN 加至pH7.4	-	-	适量	适量	-
注射用水	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

抗病毒活性 (百万I.U.)

制成冻干制品后	3.0	3.0	2.7	3.3	2.3
2周后/ 5℃	3.2	3.0	2.8	3.3	1.8
2周后/ 25℃	3.2	2.7	3.4	3.1	1.5
2周后/ 35℃	3.3	2.8	3.3	2.7	1.2
2周后/ 45℃	2.7	2.0	3.0	2.9	0.9
2周后/ 55℃	2.8	1.5	2.4	2.1	0.8
2周后/ 65℃	2.1	0.6	-	-	0.4
3个月后/ 5℃	2.7	2.5	3.0	3.6	-
3个月后/ 25℃	2.5	2.3	3.1	3.2	-
3个月后/ 35℃	2.4	2.1	3.1	2.7	-
3个月后/ 45℃	1.7	1.2	2.8	1.3	-
6个月后/ 5℃	3.5	3.1	3.2	3.1	-
6个月后/ 25℃	3.3	3.1	3.2	2.4	-
6个月后/ 35℃	2.6	1.9	3.0	2.4	-
6个月后/ 45℃	未测	1.7	3.0	1.1	-

12个月后/ 5℃	3.7	未测	3.0	2.8	-
12个月后/ 25℃	2.9	未测	2.9	2.5	-
12个月后/ 35℃	2.1	未测	2.7	1.3	-
12个月后/ 45℃	未测	未测	2.7	1.6	-

含乳糖的冻干物能达到最佳结果 (见第 3 栏)。该制剂甚至在贮藏温度为45℃下, 长期保存后仍显示出极好的稳定性, 这对IFN- α 来说, 几乎是最高贮藏温度。这一结果还可进一步明确证实含 1 百万 I. U. γ - IFN- α A 的冻干试验 (见表2)。

表 2 含 γ -IFN- α A 的冻干组合物

	1	2
冻干物成分		
γ -IFN- α A (百万 I. U.)	0.5	0.5
甘氨酸 (mg)	10.0	-
乳糖 (mg)	-	50.0
NaOH IN 加至 pH7.4	适量	适量
注射用水	1.0 ml	1.0 ml
抗病毒活性 (百万 I. U.)		
制成冻干制品后	0.4	0.4
2 周后 / 5℃	0.5	0.4
2 周后 / 25℃	0.4	0.4
2 周后 / 35℃	0.4	0.4
2 周后 / 45℃	0.3	0.3
2 周后 / 65℃	0.2	0.3

3个月后/ 5℃	0.5	0.5
3个月后/ 25℃	0.4	0.4
3个月后/ 35℃	0.3	0.4
3个月后/ 45℃	0.2	0.4
6个月后/ 5℃	0.4	0.5
6个月后/ 25℃	0.4	0.4
6个月后/ 35℃	0.2	0.4
6个月后/ 45℃	0.05	0.3

实施例2

按类似于实施例1的方法,进行含 γ -IFN- α A和蔗糖真冻干物的稳定性试验。证实了用乳糖得到的 γ -IFN- α A的稳定性,也可用蔗糖使其稳定(见表3)。

表 3 含 γ -IFN- α A的冻干组合物

	1	2	3
冻干物成分			
γ -IFN- α A(百万I.U.)	3	3	3
氯化钠(mg)	9.0	-	-
人血清白蛋白	5.0	-	-
甘氨酸	-	20.0	10.0
蔗糖(mg)	-	-	50.0
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O加至pH7.4	-	适量	-
NaOH IN 加至pH7.4	-	-	适量
注射用水加至	1.0ml	1.0ml	1.0ml

抗病毒活性 (百万I. U.)

制成冻干制品后	2.7	3.0	3.4
3个月后 / 5℃	2.7	2.5	3.9
3个月后 / 25℃	2.5	2.3	3.6
3个月后 / 35℃	2.4	2.1	3.7
3个月后 / 45℃	1.7	1.2	-
6个月后 / 5℃	3.5	3.1	4.0
6个月后 / 25℃	3.3	3.1	3.7
6个月后 / 35℃	2.6	1.9	3.7
6个月后 / 45℃	-	1.7	-

实施例3

按类似于实施例1的方法,进行含高浓度 γ -IFN- α A和乳糖或蔗糖冻干物的稳定性试验。证实了用二糖产生的IFN- α 的稳定性,也适用于高浓度 γ -IFN- α A(见表4)。

表 4 含 γ -IFN- α A的冻干组合物

冻干物成分	1	2	3	4
γ -IFN- α A(百万I. U.)	9.0	9.0	18.0	18.0
乳糖	50.0 mg	-	50.0 mg	-
蔗糖	-	50.0 mg	-	50.0 mg
甘氨酸	10.0 mg	10.0 mg	10.0 mg	10.0 mg
NaOH IN 加至pH7.4	-	-	-	q. s.
注射用水加至	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

抗病毒活性 (百万I.U.)

制成冻干制品后	8.8	8.9	18.3	19.9
3个月后 / 5℃	9.9	9.6	17.8	23.4
3个月后 / 25℃	10.0	10.5	19.1	23.2
3个月后 / 35℃	10.3	10.1	20.5	未测
3个月后 / 45℃	10.4	10.9	22.0	未测
6个月后 / 5℃	9.7	未测	17.8	19.1
6个月后 / 25℃	9.9	未测	21.1	21.9
6个月后 / 35℃	8.9	未测	16.6	未测
6个月后 / 45℃	8.4	未测	16.1	未测

实施例4

按类似于实施例1的方法,进行含 γ -IFN- α A、乳糖和甘氨酸冻干物的稳定性试验。试验结果列于表5。

表 5 含 γ -IFN- α A 的真空冻干组合物

冻干物组分:

γ -IFN- α A(百万I.U.)	1	3	9	18
甘氨酸(mg)	5.0	5.0	5.0	5.0
乳糖(mg)	50.0	50.0	50.0	50.0
氯化钠(mg)	2.5	2.5	2.5	2.5
NaOH IN 加至pH7.4	适量	适量	适量	适量
注射用水加至	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

抗病毒活性 (百万I.U.)

制成冻干制品后	0.96	2.97	8.56	18.8
14天后/ 5℃	0.85	-	-	-
14天后/ 室温	0.92	-	-	-
14天后/ 35℃	0.85	-	-	-
14天后/ 45℃	0.83		-	-
6个月后/ 5℃	1.02	2.89	9.2	18.7
6个月后/ 室温	1.1	2.82	8.7	18.7
6个月后/ 35℃	1.06	3.11	8.9	18.3
6个月后/ 45℃	0.99	2.71	8.94	未测