

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

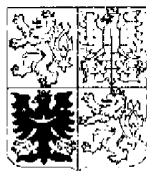
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2282-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23. 12. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **24.12.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/034353**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 12. 99**

(Věstník č. 12/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/23817**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/28007**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 47/18

A 61 K 38/21

A 61 K 9/08

(71) Přihlášovatel:

BIOGEN, INC., Cambridge, MA, US;

(72) Původce:

Dibiasi Mary D., Wellesley, MA, US;

Staples Mark, Cambridge, MA, US;

Chung Wen-Li, Arlington, MA, US;

Scharin Eric, Cambridge, MA, US;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7.

17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Stabilizovaný kapalný přípravek obsahující interferon

(57) Anotace:

Řešení popisuje kapalný interferonový přípravek s pH mezi 4,0 a 7,2. Přípravek obsahuje interferon-beta a stabilizující činidlo v množství mezi 0,3 % a 5 % hmotn., kterým je aminokyselina vybraná ze skupiny obsahující kyselé aminokyseliny, arginin a glycin. Pokud je třeba, přidá se sůl pro dosažení dostatečné iontové síly. Kapalný přípravek nebyl předtím lyofilizován ani kavitován. Přípravek je výhodně obsažen v nádobce, která má alespoň jeden povrch, který je v kontaktu s kapalinou, potažený materiálem inertním k adsorpci interferonu-beta. Dále se popisuje souprava pro parenterální podávání kapalného interferonového přípravku a způsob stabilizace kapalného interferonového přípravku.

CZ 2282-99 A3

Stabilizovaný kapalný přípravek obsahující interferon

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobů stabilizace lidského interferonu-beta a stabilizovaných kapalných přípravků obsahujících interferon-beta.

Dosavadní stav techniky

Interferony jsou proteiny mající řadu biologických účinků, z nichž některé jsou antivirové, imunomodulační a antiproliferativní. Jsou to relativně malé, druhově specifické, jednořetězcové polypeptidy, které se vytvářejí v savčí buňce jako odpověď na expozici k mnohým induktorům jako jsou např. viry, polypeptidy, mitogeny a další. Interferony ochraňují tkáně a buňky savce proti napadení virem a představují důležitý obranný mechanismus hostitele. Ve většině případů interferony poskytují lepší ochranu buňkám a tkáním, ze kterých pocházejí, než jiným typům buněk a tkání, což ukazuje na to, že interferony lidského původu by měly být mnohem účinnější při léčení lidských nemocí než interferony z jiných druhů.

Existuje několik rozdílných typů lidských interferonů, obecně klasifikovaných jako leukocytový (interferon-alfa), fibroblastový (interferon-beta) a imunitní (interferon-gama), a velký počet jejich variant. Obecnou diskusi o interferonech lze najít v mnohých učebnicích a monografiích jako např. "The Interferon System" (W. E. Stewart, II, Springer-Verlag, N.Y. 1979) a "Interferon Therapy" (World Health Organization

Technical Reports Series 676, World Health Organization, Geneva 1982), na které se tímto odkazujeme.

Způsob podávání interferonu je důležitým faktorem v klinické aplikaci tohoto důležitého terapeutického agens. Systémové podávání interferonu buďto intravenózní nebo intramuskulární či subkutánní injekcí bylo nejčastěji užíváno do jisté míry s léčebným úspěchem u nemocí jako leukémie z vlasatých buněk (leukemická retikuloendotelióza), syndrom získané imunodeficiencie (AIDS) a související Kaposiho sarkom. Avšak je známo, že proteiny ve své purifikované podobě jsou zvláště náchylné k degradaci. Pro interferon-beta je primárním mechanismem degradace v roztoku agregace a deamidace. Nedostatečná stabilita interferonu v roztoku i jeho dalších produktů výrazně omezuje možnosti využití.

Farmaceutické interferonové přípravky pro klinické použití obvykle obsahují interferon v lyofilizované (tj. mrazově dehydratované) podobě ve spojení se složitými organickými excipienty (pomocnými látkami) a stabilizátory, jako jsou např. neiontová povrchově aktivní činidla (tj. surfaktanty), různé cukry, organické polyoly a/nebo lidský sérový albumin. Nevýhodou lyofilizovaných preparátů je to, že vyžadují složité balení, neboť je třeba odděleně dodávat sterilní vodu pro injekce. Kromě toho lyofilizované preparáty vyžadují značnou manipulaci před vlastním použitím, což zvyšuje riziko nechtěného píchnutí se jehlou či upadnutí některé složky na zem, což je zejména problematické u té části pacientů, která jeví svalovou ochablost a špatnou koordinaci, jako jsou např. lidé s roztroušenou mozkomíšní sklerózou (MS). Pacienti s MS by si mohli sami podávat interferon, takže dostupnost takové lékové formy, která by se podávala mnohem snadněji než současné lyofilizované

přípravky, je velmi potřebná, aby nebyla nutná rekonstituce, která je nezbytná, když se používá lyofilizovaný preparát.

Kapalně, nelyofilizované přípravky obsahující interferony mohou také obsahovat komplexní nosiče jako je lidský sérový albumin, polyoly, cukry a aniontová povrchově aktivní stabilizující činidla. Viz např. WO 89/10756 (Hara et al., obsahující polyol a p-hydroxybenzoát).

Shrnutí vynálezu

Předkládaný vynález řeší výše uvedený problém tím, že zjistil, že lidský interferon-beta se může stabilizovat, když se umístí do pufrovaného roztoku s pH mezi 4 a 7,2, přičemž roztok obsahuje aminokyseliny jako stabilizující činidla a v některých případech také sůl (pokud aminokyselina neobsahuje nabitý postranní řetězec. Interferon-beta není lyofilizován, ale jakmile se jednou připraví způsobem odborníkovi známým, stane se přímo součástí přípravku podle předkládaného vynálezu.

Tudíž prvním aspektem předkládaného vynálezu je kapalný přípravek obsahující interferon a stabilizující činidlo v množství mezi 0,3% a 0,5% (hmot.), což je aminokyselina vybraná ze skupiny obsahující kyselé aminokyseliny, arginin a glycin. Kapalný přípravek se před tím nelyofilizoval. Avšak je výhodné, když kapalný přípravek je obsažen (uzavřen) v nádobce jako je např. injekční stříkačka, přičemž tato nádobka má povrch, který je v kontaktu s kapalným přípravkem, potažený materiálem, který je inertní k interferonu jako je např. silikon nebo polytetrafluoretylen. Výhodný přípravek obsahuje interferon-beta, nebo rekombinantně připravený interferon, v pufru, který má pH mezi 4,0 a 7,2. K dalším přípravkům podle předkládaného vynálezu patří:

1) 20 mM acetátový pufr s pH 5,0, který nebyl předtím lyofilizován a který obsahuje interferon-beta a další složky vybrané z a) 150 mM arginin-HCl, b) 100 mM chlorid sodný a 70 mM glycín, c) 150 mM arginin-HCl a 15 mg/ml lidský sérový albumin, d) 150 mM arginin-HCl a 0,1 % Pluronic F-68, e) 140 mM chlorid sodný, f) 140 mM chlorid sodný a 15 mg/ml lidský sérový albumin, a g) 140 mM chlorid sodný a 0,1% Pluronic F-68,

2) Kapalina s pH 5,0 obsahující interferon-beta, 170 mM L-glutamovou kyselinu a 150 mM hydroxid sodný, která nebyla předtím lyofilizována,

3) 20 mM fosfátový pufr s pH 7,2, který nebyl předtím lyofilizován, a který obsahuje interferon-beta a složky vybrané z a) 140 mM arginin-HCl, b) 15 100 mM chlorid sodný a 70 mM glycín.

Dalším provedením předkládaného vynálezu je souprava pro parenterální podávání kapalného interferonového přípravku. Souprava obsahuje nádobku obsahující kapalný přípravek pH mezi 4 a 6, přičemž kapalina obsahuje farmaceuticky účinné množství interferonu-beta, který nebyl před tím lyofilizován, a aminokyselinové stabilizující činidlo v množství 5 % (hmot.) nebo méně, a návod k použití.

Dalším provedením předkládaného vynálezu je kapalný farmaceutický přípravek vhodný pro parenterální podávání savci, obsahující v podstatě účinné množství interferonu-beta, který nebyl před tím lyofilizován, v pufru udržujícím pH v rozmezí 4,0 a ž 6,0, a aminokyselinové stabilizující činidlo ve vhodné iontové síle. Přípravek je obsažen v zásobní nádobce jako je např. injekční stříkačka. Výhodně zásobní nádobka postrádá rozhraní kapaliny a prostředí obsahujícího kyslík (tj. interferonový roztok není vystaven působení plynu obsahujícího kyslík v průběhu přípravy

a skladování). Interferon-beta si v podstatě uchovává antivirovou účinnost během skladování při teplotě mezi 2 °C a 25 °C po dobu nejméně 3 měsíců.

Způsob podle předkládaného vynálezu pro stabilizaci interferonu-beta v kapalném farmaceutickém přípravku, takže si v podstatě uchovává fyzickou stabilitu během skladování při teplotě mezi 2 °C a 25 °C po dobu alespoň 3 měsíců spočívá v tom, že se smíchá: a) účinné množství interferonu-beta, b) pufr udržující hodnotu pH v rozmezí 4,0 až 7,2 při vhodné iontové síle, a c) aminokyselinové stabilizující činidlo, přičemž kapalina nebyla předtím lyofilizována a nebyla vystavena plynu obsahujícímu kyslík v průběhu přípravy a skladování.

Kapalné přípravky podle předkládaného vynálezu mají ve srovnání s lyofilizovanými přípravky mnoho výhod. K těmto výhodám patří: I) menší injekční objem nutný pro kapalný přípravek způsobí menší nepohodlí než velký objem, II) náhrada komplexních excipientů jednoduchými aminokyselinami umožňuje lépe monitorovat kvalitu konečných produktů, III) balení je velmi zjednodušeno díky eliminaci potřeby oddělené zásoby vody pro injekci (WFI) a samostatnou stříkačku a viálku, IV) dávkovací přesnost se může zlepšit díky tomu, že se kapalina přenáší v méně krocích, a V) bezpečnost produktu je zlepšena, protože jednodušší podávání snižuje riziko popíchání jehlou a upuštění součástí při přípravě injekce.

Tudíž předmětem předkládaného vynálezu je poskytnout biologicky účinný stabilní interferonový přípravek pro injekční použití.

Další předmět předkládaného vynálezu poskytuje přípravek, který nevyžaduje předchozí lyofilizaci léčiva obsahujícího interferon-beta.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je zabránit ztrátě účinnosti kapalného přípravku s interferonem-beta tím, že se a) zabrání kavitaci a/nebo vytvoření prostoru nad přípravkem v průběhu přípravy kapalného přípravku, nebo b) uskladní kapalný přípravek a prostorem nad přípravkem, který obsahuje inertní plyn jako je argon nebo dusík.

Ještě dalším předmětem vynálezu je poskytnout kapalný přípravek, který umožňuje uskladnění po dlouhou dobu v kapalném stavu usnadňujícím skladování a přepravu před podáním.

Další předmět vynálezu poskytuje kapalný přípravek, který se snadno připravuje a podává, neboť se eliminuje krok jeho lyofilizace a rekonstituce.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je použití jednoduchých aminokyselin pro jako alternativních stabilizátorů vedle všeobecně užívaného sérového albuminu, což usnadňuje monitorování kvality produktu.

A ještě další předmět vynálezu poskytuje farmaceutický přípravek, který obsahuje nelyofilizovaný interferon-beta, a který je možné vyrábět s menšími náklady.

Další výhody předkládaného vynálezu jsou uvedeny v podrobném popisu vynálezu v následujícím textu nebo budou poznány v při praktickém provádění vynálezu. Doprovodné obrázky, které jsou přiloženy, tvoří součást popisu vynálezu a společně s popisem slouží k vysvětlení principu vynálezu.

Stručný popis obrázků

Obr. 1. je graf ukazující procento monomerů interferonu-beta, které zůstane v kapalině volně vystavené jako funkce procenta v kapalině rozpuštěného kyslíku.

Obr. 2 je graf ukazující koncentraci proteinu v procentech normalizovanou vzhledem k výchozímu materiálu v závislosti na čase pro kapalný přípravek BG9589-1. Vzorky označené "4°C" (plné čtverečky) byly inkubovány při teplotě mezi 2 a 8 °C. Ostatní vzorky byly inkubovány při 25 °C (plné kroužky), 33 °C (plné trojúhelníky) a 40 °C (plné kosočtverce).

Obr. 3 je graf ukazující koncentraci proteinu v procentech normalizovanou vzhledem k výchozímu materiálu v závislosti na čase pro kapalný přípravek BG9589-3. Vzorky označené "4°C" (plné čtverečky) byly inkubovány při teplotě mezi 2 a 8 °C. Ostatní vzorky byly inkubovány při 25 °C (plné kroužky), 33 °C (plné trojúhelníky) a 40 °C (plné kosočtverce).

Podrobný popis vynálezu

Předkládaný vynález překonává problémy a nevýhody spojené se současnými strategiemi a projekty a poskytuje jednoduchý způsob stabilizace interferonu a jednoduchý interferonový přípravek se zvýšenou skladovací kapacitou. Vynález je založen zčásti na našich zjištěních, že:

a) interferon-beta je zvláště nestabilní a agreguje, pokud přijde do kontaktu s kyslíkem buďto aktivně probublávaným kapalinou nebo při statickém kontaktu, když je kyslík v prostoru nad přípravkem (čelním prostoru) v nádobě,

b) kapalně přípravky s interferonem-beta postrádající nosič jako je lidský sérový albumin jsou zvláště náchylné k adsorpci (tj. buďto chemickou reakcí nebo fyzikální vazbou) k povrchu skla,

c) interferon-beta agreguje při nízké iontové síle, pro stabilitu v kapalně fázi vyžaduje iontové prostředí.

Vynález se proto týká způsobu stabilizace lidského interferonu-beta, kterým se zabrání uvedeným nevýhodám, a výsledného kapalného přípravku stabilizovaného interferonu-beta.

A. Definice

Termín "pufr" označuje roztoky slabých kyselin a solí obsahující anionty kyseliny, nebo roztoků slabých bazí a jejich solí. Termín "acetát" konkrétně použitý v této souvislosti v tomto popisu (viz také tabulka 1) se týká pufovacího systému výhodně obsahujícího acetát sodný a kyselinu octovou a termín "fosfát" se týká pufovacího systému výhodně obsahujícího heptahydrát hydrogenfosforečnanu sodného a monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného. Avšak roztoky v tabulce II obsahující aminokyseliny, ačkoliv konvenčně nejsou považovány za pufrы ve smyslu, jak je tento termín v oboru užíván, v tomto popisu patří dle definice do pojmu pufr.

Termín "excipient" se týká jakékoliv sloučeniny přidané v průběhu zpracování a/nebo skladování ke kapalnému přípravku za účelem změny celkových vlastností, zlepšení stability a/nebo upravení osmolality.

Termín "stabilizující činidlo" se týká jakéhokoliv excipientu, který zlepšuje nebo nějak zvyšuje stabilitu.

Termín "stabilita" má nutně funkční definici a znamená relativní časovou stálost antivirové účinnosti interferonu a/nebo stálost jeho struktury.

Termín "kavitovaný" se týká jakéhokoliv interferonového přípravku, který v důsledku změn tlaku nebo třepání umožnil kontakt s bublinami obsahujícím kyslík (např. vzduch) přinejmenším po dobu přípravy nebo skladování. Termín kavitace také znamená, že rozhraní kyslík obsahující

plyn/kapalina se vytvořilo v určitém bodě v průběhu přípravy, skladování nebo použití u kapalného interferonového přípravku. Termín "kavitovaný" také znamená, že hladina rozpuštěného kyslíku v kapalném interferonovém přípravku přesahuje přibližně 10 % hodnoty atmosférické rovnováhy při teplotě která je typická v průběhu přípravy a skladování.

Termín "parenterální" zde zahrnuje způsoby podávání subkutánní, intravenózní, intramuskulární, intrasternální, intraperiotoneální, oftalmickou nebo intraspínální injekcí nebo infúzemi.

Termín "farmaceuticky přijatelná sůl" znamená jakoukoliv organickou nebo organickou adiční sůl, která je relativně netoxická a neškodná pro pacienta v odpovídajících účinných koncentracích, při kterých vedlejší účinky soli neruší prospěšné účinky interferonu.

"Účinné množství" sloučeniny je takové množství, které poskytuje výsledek nebo překonává vliv určitých podmínek, které jsou léčeny. "Účinné množství" také znamená množství, které vede k pozitivnímu výsledku (tj. vykazuje antivirový účinek) v testu CPE na antivirovou aktivitu.

Termín "farmaceuticky účinné množství" se zde užívá k označení procentuální koncentrace interferonu, o které je ve farmakologii a lékařství známo, že je bezpečná a účinná v léčení určitých nemocí.

"Isotonický s krví" (nebo zkráceně jen "isotonický") znamená takový kapalný interferonový přípravek, který má dostatečnou koncentraci složek k tomu, aby jeho osmotické chování bylo v podstatě identické s krví, tzn. že buňky při kontaktu s přípravkem si uchovají svůj tvar a nedochází u nich v podstatě k žádnému přenosu vody v důsledku rozdílů osmotického tlaku.

Termín "polyiontový" (nebo také "polyelektrolytový") se užívá k označení látky s vysokou molekulovou hmotností, která je elektrolyt a, pokud se užije v přípravku podle předkládaného vynálezu, maximalizuje iontovou sílu pro danou osmolalitu. Tato definice je založena na našem zjištění, že interferon-beta je stabilizován vysokou iontovou silou, ale přitom je celková iontová síla omezena nutným požadavkem, aby roztok byl isotonický s krví (viz příklad 7). Výhodný způsob, jak maximalizovat iontovou sílu při dané osmolalitě, je použít excipient polyiontového druhu.

Materiál, který je "inertní k interferonu" znamená takový materiál, který má alespoň takové vlastnosti, že fyzikálně ani chemicky nereaguje s interferonem.

B. Příprava interferonů

Předkládaný vynález je všeobecně využitelný pro všechny typy interferonů včetně přirozeného interferonu, interferonu připraveného technologií rekombinantní DNA a interferonu připraveného chemickou syntézou nebo modifikací. Vynález lze využít s hrubým extraktem, semipurifikovaným nebo plně purifikovaným interferonem z fibroblastů, leukocytů, lymfocytů nebo jakékoliv tkáně produkující interferon člověka nebo jiného vhodného druhu. Nejvýhodnější je podle předkládaného vynálezu použití lidského interferonu z fibroblastů (tj. interferon-beta).

Nejvýhodnější interferon-beta je rekombinantní forma. Metody rekombinantní DNA pro přípravu různých proteinů včetně interferonu jsou v oboru známé a žádným způsobem neomezují předkládaný vynález. Viz např. patenty U.S. 4 399 216, 5 149 636, 5 179 017 (Axel et al.) a 4 470 461 (Kaufman). Rekombinantní formy interferonu již byly připraveny, viz např. Evropský patent 0 41313 (Fiers, exprese interferonu-

beta), patent U.S. 4 966 843 (McMormick et al., exprese interferonu v buňkách CHO), patent U.S. 5 326 859 (Sugano et al. (DNA kódující interferon-beta). Interferon-beta může být také modifikován, buďto rekombinantními technikami nebo chemicky, a může se připravovat v médiu obsahujícím sérum nebo v médiu bez séra. K formám interferonu-beta patří varianty jako např. mutanta ochuzená o cystein (patenty U.S. 4 588 585 a 4 737 462, Mark et al.) a mutanta ochuzená o methionin (EP 260 350, Wang et al.). Primární aminokyselinová sekvence proteinu může být rozšířena derivatizací pomocí cukerných skupin (glykosylací) nebo dalšími doplňujícími molekulami. Další modifikace se mohou uskutečnit prostřednictvím posttranslačního systému v hostitelské buňce. Jednotlivé aminokyselinové zbytky v řetězci mohou být dále modifikovány oxidací, redukcí nebo jinou derivatizací, a nebo protein může být štěpen, aby se získal aktivní fragment. Přesná chemická struktura konkrétní rekombinantní formy interferonu-beta bude proto záviset na mnoha faktorech a neomezuje nijak předmět předkládaného vynálezu. Všechny takové proteiny interferon-beta v přípravcích podle předkládaného vynálezu si uchovají svou biologickou účinnost, když budou ve vhodném prostředí.

Jednou z metod, jak připravit rekombinantní interferon-beta, je kultivovat ovariální buňky čínského křečka (CHO) transfekované genem lidského interferonu-beta. Rekombinantní interferon-beta je vylučován buňkami CHO kultivovanými v dávkových suspenzních buněčných kulturách, které obsahují fetální hovězí sérum. Buňky se mohou kultivovat v rotačních kultivačních lahvích umístěných v inkubátoru s CO₂ (5% CO₂) a teplotou 35 °C. Obsah z několika takových lahví se pak může sloučit a přenést do fermentoru větší velikosti, pokud je třeba kultivace ve větším měřítku.

Kultivace ve fermentoru pak probíhá asi šest dní a během této doby se aktivní produkt, tj. interferon-beta, akumuluje v kultivačním médiu. Kultura se pak může sklídit a buňky se odstraní z média, které obsahuje produkt, např. tangenciální průtokovou filtrací.

C. Purifikace interferonů

Purifikační postupy pro interferony jsou již dobře známy a pro odborníky dostupné. K těmto metodám patří jednokrokové nebo vícekrokové postupy zahrnující chromatografické separační kroky, viz např. patenty U.S. 5 015 730 (Friesen et al., afinitní chromatografie a HPLC), 4 541 952 (Hosoi et al., chelatační chromatografie).

Jeden ze způsobů např. zahrnuje využití neobvykle hydrofobní a relativně bazické povahy molekul interferonu-beta společně s jeho silnou afinitou pro vazbu kovových iontů, viz např. publikace Knight a Fahey, Human Fibroblast Interferon, an Improved Purification, J. Biol. Chem., 256: 3609-3611, 1981 a Edy et al., Purification of Human Fibroblast Interferon by Zinc Chelate Chromatography, J. Biol. Chem., 232: 5934-5935, 1981, na které se tímto odkazujeme.

Stručně řečeno, kroky zachycení a purifikace zahrnují navázání interferonu-beta na sérii kolon s náplní sefarózy (Sephacrose®, Pharmacia Biotech) a pak eluci se solemi a polyolem. Jakmile se jednou konečný eluát ze sefarózy naředí a sníží se pH, interferon-beta se naváže na SP sefarózu (SP Sepharose®, Pharmacia Biotech). Většina proteinů v navázce na kolonu je povahy více bazické než je monomerní interferon-beta a proto se váže těsněji v koloně než interferon. Na této koloně se také od interferonu-beta

oddělí DNA a virové částice. Kolona se pak proplachuje sérií pufrů obsahujících chlorid sodný.

Interferonový produkt se naváže na kolonu s chelatující sefarózou (Sepharose®, Pharmacia Biotech) předem "nabitou" zinkem (viz výše uvedená citace Edy et al.). Tato kolona se provozuje v atmosféře bez kyslíku, stejně jako všechny následující kroky, aby se ochránily volné sulfhydrylové skupiny v molekule. Purifikovaný interferon se okyselí a uchovává se při nízkém pH, aby se inaktivovaly všechny zbylé viry. Po neutralizaci se interferon koncentruje průtokovou filtrací a pak se vymění pufr za neutrální pufrovací roztok. Proces výměny pufru redukuje koncentraci zinku a organických sloučenin. Poté se surový interferon uchovává při -70°C , než se začne zpracovávat do přípravku.

D. Formulace interferonových přípravků

V ukázkovém příkladu purifikace popsaném výše a po první výměně pufru se zahájí stejný druhý krok výměny pufru, kromě toho, že se neutrální pufrovací roztok nahradí pufrovacím roztokem s pH 4 až 7,2, který obsahuje stabilizující činidlo, popsané podrobněji dále. Výsledný přípravek obsahující interferon se nazývá "meziprodukt" a lze ho zamražený uchovávat. Viz také příklad 7.

Pokud se uchovává ve zmrzlém stavu (v atmosféře inertního plynu jako je argon nebo dusík), nechá se roztát a pumpuje se přes $0,22\mu\text{m}$ filtr do tárovaných nádob, výhodně z nerezové oceli, kde se "meziprodukt" smíchá s předem filtrací sterilizovaným rozpouštědlem, dokud se nedosáhne požadované hmotnosti výsledného produktu. Rozpouštědlo je v podstatě stejný pufr, který byl použit ve druhém kroku výměny pufru. Výsledný kapalný produkt se pak sterilizuje filtrací za aseptických podmínek např. pomocí dvou $0,22\mu\text{m}$

filtrů v sérii, a rozdělí do těsně uzavřených nádobek, výhodně z nerezové oceli, které jsou opatřeny vstupem pro inertní plyn, kombinací odvzdušňovacího ventilu a filtru a přítokovou ponornou trubičku. Konečný produkt se pumpuje ponornou trubičkou do uzavřené nádoby. Pomocí inertního plynu jako je dusík je konečný produkt tlakem přenesen do pumpovací hlavy zařízení schopného asepticky plnit sterilní stříkačky.

Pro aseptické plnění sterilních injekčních stříkaček je dostupných několik metod a konkrétní použitá metoda vynález nikterak neomezuje. Ve způsobu, který zde uvádíme jako příklad, se užívá plnička injekčních stříkaček HYPAK® (Becton Dickinson Pharmaceutical Systems, Franklin Lakes, NJ), kterou lze sterilizovat autoklávem. Stříkačky je možné autoklávovat se špičkami opatřenými čepičkami. Obecně takové zařízení obsahuje vakuovou komoru obsahující stříkačky, které mají být naplněny interferonovým přípravkem. Komora je umístěna v aseptickém prostředí. Každá stříkačka je umístěna v komoře vertikálně s otevřeným koncem, do kterého je vsunut plunžr, který je upraven tak, aby pasoval do otevřeného konce válce stříkačky. Plunžr je upraven tak, aby vytvořil ve válci stříkačky zátku, aby se kapalný přípravek zachytil uvnitř. Po naplnění/vložení je ve stříkačce ponechán malý prostor. Komora je pak evakuována a propláchnuta několikrát inertním plynem bez kyslíku (např. argonem, dusíkem) a jakmile se dosáhne konečného vakua, plunžry se mechanicky vsunou malý kousek do otevřených válců stříkaček a zátky se automaticky vloží do stříkaček. Komora je pak ventilována filtrovaným vzduchem, aby se tlak v komoře vyrovnal s vnějším atmosférickým tlakem. Míra vakua je určující pro objem volného prostoru ve stříkačce obsahujícího inertní plyn.

V konkrétním zařízení, které jsme použili, byly stříkačky umístěny vertikálně a upevněny v otvorech

v rotujícím kotouči. Nejdříve se stříkačky dostanou pod jehlu, která se vsune do stříkačky. Jehla pak propláchne vnitřek stříkačky inertním plynem (např. argonem nebo dusíkem). Pak se jehla stáhne zpět ze stříkačky. Pak se stříkačka nastaví pod druhou jehlu, která se vsune do stříkačky. tato jehla je připojena k pumpě, která dávkuje produkt do stříkaček. Pak se druhá jehla stáhne zpátky ze stříkačky. Pak se stříkačka nastaví pod třetí jehlu, která se vsune do stříkačky. Plunžr (předem autoklávovaný) je proudem vtlačen do stříkačky s inertním plynem (např. dusíkem nebo argonem), pak se jehla stáhne zpět ze stříkačky a plunžr zůstane umístěn tak, že ponechává ve stříkačce prostor inertního plynu mezi vrchem kapaliny a dnem plunžru.

1. Excipient

Excipient je výhodně látka polyiontového druhu, aby se maximalizovala iontová síla při dané osmolalitě, jako je tomu např. v případě polyelektrolytu, který obsahuje heparin nebo jinou polymerní látku. Jak je diskutováno v příkladu 4, interferon-beta je stabilizován vysokou iontovou silou, ale celková iontová síla je omezena potřebou, aby roztok byl isotonický s krví. Výhodný způsob, jak maximalizovat iontovou sílu při dané osmolalitě, je proto použít polyiontovou látku. Roztoky interferonu-beta podle předkládaného vynálezu jsou isotonické s krví (přibližně 290 miliosmol/kg).

Nejvýhodnějším stabilizujícím činidlem podle předkládaného vynálezu je aminokyselina, a sice některá z následujících: jakákoliv kyselá aminokyselina (např. kyselina glutamová, asparagová) nebo aminokyselina vybraná z argininu a glycinu. Nejvýhodnější aminokyselinové stabilizující činidlo je arginin, který je v roztocích s pH 5,0 ve své kyselé formě (arginin-HCl). Výhodná kyselá

aminokyselina je kyselina L-glutamová. Aniž bychom se přísně drželi teorie, skutečnost, že polyiontové excipienty jsou výhodné, je důvod, proč arginin a lysin (se 3 nabitými skupinami) stabilizují interferon lépe než glycin (2 nabité skupiny), který zase stabilizuje lépe než kterákoliv z nenabitých sloučenin, které byly testovány.

Pokud je excipientem arginin-HCl, jeho koncentrace je v rozmezí od 0,5 % (hmotnost/objem) do 5 % a nejvýhodněji je 3,13 % (což je ekvivalent 150 mM arginin-HCl). Pokud je excipientem glycin, jeho koncentrace je v rozmezí od 0,5 % (hmotnost/objem) do 2 % a nejvýhodněji je 0,52 % (což je ekvivalentní 66,7 mM až 266,4 mM a nejvýhodněji 70 mM). Pokud je excipientem kyselina glutamová, jeho koncentrace je v rozmezí od 100 mM až 200 mM a nejvýhodněji 170 mM (což je ekvivalent 1,47 % do 2,94 % a nejvýhodněji 2,5 %, všechna % hmotnost/objem).

Různé excipienty jako stabilizující činidla pro kapalný interferonový přípravek byly analyzovány pomocí puřovacího systému obsahujícího 50 mM octan sodný a ledovou kyselinu octovou společně se 100 mM chloridem sodným o pH 5,0. Vzorky kapalného interferonového přípravku jsou testovány tepelným stresem tak, že se inkubují ve 37 °C po dobu 1 až 3 týdnů nebo mechanickým stresem, kdy se umístí na 1 až 3 dny na rotátor. Takto "stresované" vzorky se pak hodnotily na stabilitu interferonu způsobem popsáným v příkladu 1. Jak je podrobněji popsáno v příkladu 7, přípravky obsahující pufr s hodnotou pH 5,0 s octanem sodným a aminokyselinovým excipientem (a případně ještě obsahující chlorid sodný) prokazovaly nejlepší stabilitu.

2. Interferon

Výhodný interferon je fibroblastový interferon-beta nejvýhodnější je lidský rekombinantní interferon-beta produkovaný v savčích buňkách. Lidský rekombinantní interferon-beta může obsahovat volnou sulfhydrylovou skupinu a alespoň jednu disulfidovou vazbu. Zvláště výhodná molekula obsahuje jednu volnou sulfhydrylovou skupinu v poloze 17 a jednu disulfidovou vazbu mezi polohami 31 a 141 v každé molekule. Jak je to známo v případě přirozeného lidského IFN-beta, N-glykosylace se očekává v místě Asn-80. Rozmezí koncentrace v kapalném přípravku podle předkládaného vynálezu je asi od 30 µg/ml do 250 µg/ml. Výhodné rozmezí koncentrace je 48 až 78 µg/ml a nejvýhodnější koncentrace je 60 µg/ml. Ve smyslu Mezinárodních standardů byl stanoven vnitřní standard firmy Biogen vzhledem ke stanardu WHO pro interferon Natural Gb-23-902-531, takže rozmezí koncentrací v IU (pro objem injekce 0,5 ml) je od 6 IMU do 50 IMU a nejvýhodnější koncentrace je 12 IMU.

3. Pufr

Pufrovací roztoky organických kyselin nebo fosfátové pufrы, které se mohou použít podle předkládaného vynálezu, pro udržení hodnoty pH v rozmezí od 4,0 do 7,2 a výhodně od 4,5 do 5,5, nejvýhodněji pH 5,0, mohou být obvyklé pufrы organických kyselin a jejich solí jako jsou např. pufrы citrátové (obsahující např. směs monosodné a disodné soli kyseliny citronové, směs kyseliny citronové a její trisodné soli, směs kyseliny citronové a její monosodné soli apod.), pufrы sukcinátové (např. směs kyseliny jantarové a její monosodné soli, směs kyseliny jantarové a hydroxidu sodného, směs kyseliny jantarové a její disodné soli apod.), pufrы tartarátové (např. směs kyseliny vinné a její sodné soli,

směs kyseliny vinné a její draselné soli, směs kyseliny vinné a hydroxidu sodného apod.), fumarátové pufrы (např. směs kyseliny fumarové a její monosodné soli, směs kyseliny fumarové a její disodné soli, směs monosodné a disodné soli kyseliny fumarové apod.), glukonátové pufrы (např. směs kyseliny glukonové a její sodné soli, směs kyseliny glukonové a hydroxidu sodného, směs kyseliny glukonové a její draselné soli apod.), oxalátové pufrы (např. směs kyseliny šťavelové a její sodné soli, směs kyseliny šťavelové a hydroxidu sodného, směs kyseliny šťavelové a její draselné soli apod.), laktátové pufrы (např. směs kyseliny mléčné a její sodné soli, směs kyseliny mléčné a hydroxidu sodného, směs kyseliny mléčné a její draselné soli apod.), fosfátové pufrы (hydrogenfosforečnan sodný/dihydrogenfosforečnan sodný) a acetátové pufrы (např. směs kyseliny octové a její sodné soli, kyseliny octové a hydroxidu sodného apod.).

V následujících příkladech byly pro výběr nejvhodnějšího pufru použity pufrы různých koncentrací a s různou hodnotou pH, a sice jednalo se o pufrы obsahující fosforečnan sodný, citronan sodný, jantaran sodný, uhličitan sodný nebo octan sodný. Vzorky interferonu-beta byly umístěny buďto ve 37 °C na dobu 6 dnů až 2 týdnů nebo byly umístěny v rotátoru po 7 až 9 hodin, aby se urychlil degradační proces. Pak byly stanoveny chemické vlastnosti vzorků. Vzorky byly analyzovány měřením optické hustoty, peptidovým mapováním, vylučovací HPLC, redukující a neredukující SDS-PAGE/westernový přenos a isoelektrickým fokusováním (IEF)/westernový přenos, jak je podrobněji popsáno v příkladu 1. Všechny pokusné vzorky interferonu-beta byly srovnávány s výchozím materiálem nebo se vzorky interferonu-beta, které byly uchovávány při 2 až 8 °C. Údaje ukazují, že pH je hlavním faktorem, který určuje stabilitu vzorků

interferonu-beta, a že vzorky s pH mezi 4,0 a 5,0 byly stabilnější než vzorky s pH 7,0 nebo vyšším, viz příklad 2. Přesto jsme vyvinuli několik interferonových přípravků s fyziologickou hodnotou pH (pH 7,2), viz příklad 6.

4. Kavítace

Většina sulfhydrylových skupin v interferonu-beta je oxidována při vysokém pH ($\text{pH} > 8,0$), tj. pH kdy se přestavují disulfidové vazby. Zjistili jsme určitou agregaci interferonu-beta v meziprojektu pomocí analýzy vylučovací chromatografii, neredukující SDS-PAGE a analýzou rozptylu laserového světla. Poté jsme zjistili, že vytváření agregátů interferonu-beta je závislé na množství rozpuštěného kyslíku. Vypracovali jsme následující kritéria pro postup, kterým je zajištěno, že kapalný přípravek interferonu-beta není kavítován: a) nemělo by být žádné rozhraní plynu obsahujícího kyslík s kapalinou v průběhu přípravy a skladování, pokud je to možné, b) v průběhu přípravy a skladování by se neměly tvořit žádné bubliny, a c) hladina rozpuštěného kyslíku v přípravku by se měla udržovat pod 10 % atmosférické rovnovážné koncentrace při teplotě přípravy a skladování (viz příklad 3).

5. Adsorpce interferonu na povrchy

Zjistili jsme také, že interferon se adsorbuje na určité povrchy a jeho skladování ve skleněných nádobách vyžaduje, aby alespoň jeden povrch nádoby, který je v kontaktu s interferonem, byl potažen materiálem, který zabrání nebo podstatně omezí adsorpci. Takový povrch může být chemicky nebo fyzikálně inertní k adsorpci. příklady vhodných materiálů jsou odborníkovi známy a patří k nim např. nastříkaný nebo vypalovaný silikon, polypropylen nebo

polytetrafluoretylén (PTFE). Použili jsme výhodné kapalně přípravky s koncentrací 60 µg/ml (BG9589-1, 2, 3 a 4, přehledně uvedené v tab. 1) a naplnili jimi skleněné injekční stříkačky typu I o objemu 1 ml potažené nastříkaným silikonem (Becton Dickinson) a skleněné lahvičky typu I o objemu 0,75 ml. Vzorky pak byly analyzovány HPLC s reverzní fází (rpHPLC) a byla určena koncentrace proteinu. Údaje ukazují, že ve vzorcích naplněných do skleněných lahviček bylo méně proteinu v roztoku než ve stříkačkách potažených silikonem (viz příklad 5).

6. Výhodné přípravky

Byla provedena kinetická analýza stability proteinů u čtyř kapalných přípravků, které obsahovaly 60 mg/ml interferonu-beta, a jejichž výsledná koncentrace je uvedena v následující tabulce 1. Další alternativní přípravky, z nichž některé obsahují surfaktanty jako je Pluronic F-68 (od firmy BASF), jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 1: Výhodné přípravky

System pH	Excipient	Výsledné pH
20 mM acetát	150 mM arginin-HCl	5.0 ("BG9589-1")
20 mM acetát	70 mM glycín 100 mM chlorid sodný	5.0 ("BG9589-2")
20 mM fosfát	140 mM arginin-HCl	7.2 ("BG9589-3")
20 mM fosfát	70 mM glycín 100 mM chlorid sodný	7.2 ("BG9589-4")

Všechny složky uvedených přípravků odpovídají Lékopisu USA.

Konkrétní složení jednotlivých přípravků je následující:

BG9589-1

<u>Složka (jako surovina)</u>	<u>Množství</u>
Arginin-HCl (podle Lékopisu USA, USP)	15,8 mg
ledová kyselina octová, USP	0,167 mg
octan sodný, trihydrát, USP	0,972 mg
Interferon-beta	30 µg
Voda pro injekce, USP	0,5 ml

BG9589-2

<u>Složka (jako surovina)</u>	<u>Množství</u>
Glycin (podle Lékopisu USA, USP)	2,62 mg
Ledová kyselina octová, USP	0,185 mg
Octan sodný, trihydrát, USP	0,932 mg
Interferon-beta 1a	30 µg
Voda pro injekce, USP	0,5 ml
Chlorid sodný	2,922 mg

BG9589-3

<u>Složka (jako surovina)</u>	<u>Množství</u>
Arginin-HCl (podle Lékopisu USA, USP)	14,725 mg
Hydrogenfosforečnan sodný-7H ₂ O	2,332 mg
Dihydrogenfosforečnan sodný-1H ₂ O	0,359 mg
Interferon-beta 1a	30 µg
Voda pro injekce, USP	0,5 ml

BG9589-4

<u>Složka (jako surovina)</u>	<u>Množství</u>
Hydrogenfosforečnan sodný-7H ₂ O	1,984 mg
Dihydrogenfosforečnan sodný-1H ₂ O	0,359 mg
Interferon-beta 1a	30 µg
Glycin	2.628 mg
Chlorid sodný	2.922 mg
Voda pro injekce, USP	0,5 ml

Tabulka 2: Alternativní přípravky

System pH	Excipient	Výsledné pH
20 mM acetát	150 mM arginin-HCl 15 mg/ml lidský sérový albumin	5,0
20 mM acetát	150 mM arginin-HCl 0,1% Pluronic F-68	5,0
20 mM acetát	140 mM chlorid sodný	5,0
20 mM acetát	15 mg/ml lidský sérový albumin 140 mM chlorid sodný	5,0
20 mM acetát	0,1% Pluronic F-68 140 mM chlorid sodný	5,0
170 mM kyselina L-glutamová 150 mM hydroxid sodný	15 mg/ml lidský sérový albumin	5,0
170 mM kyselina L-glutamová 150 mM hydroxid sodný	0,1% Pluronic F-68	5,0

Součástí přípravků podle předkládaného vynálezu mohou být i jiné materiály. K nim patří konzervační látky (všechny údaje o výhodné koncentraci se týkají procent hmotnost/objem): fenol (0,2%), metylparaben (0,08%), propylparaben (0,008%), m-kresol (0,1%), chlorobutanol (0,25%), benzylalkohol (0,1 %) a thimerosal (0,1 %). Na základě analýz pro stanovení agregace proteinů a deamidace (údaje zde nejsou uvedeny) bylo zjištěno, že nejvýhodnější konzervační látkou je chlorbutanol a benzylalkohol.

7. Soupravy pro parenterální podávání

K výhodným provedením předkládaného vynálezu patří také zabalené soupravy pro parenterální podávání kapalných přípravků podle vynálezu. Souprava může obsahovat injekční stříkačky naplněné kapalným přípravkem podle předkládaného vynálezu, několik tamponů napuštěných alkoholem, alespoň jednu injekční jehlu, jednu nebo několik náplastí a návod k použití. kapalně přípravky podle předkládaného vynálezu lze také úspěšně využít v obvyklých bezjehlových injekčních systémech.

E. Použití interferonů

Interferonové přípravky podle předkládaného vynálezu mají antivirovou účinnost (viz příklad 7). Pro klinické použití závisí množství interferonu použité v konkrétním případě, stejně jako frekvence, s jakou se podává, na mnoha faktorech jako na typu použitého interferonu, nemoci, která je léčena a pacientově reakci na léčení interferonem.

Výhodně se kapalně přípravky užívají pro léčení relapsující roztroušené sklerózy mozkomíšní (sclerosis multiplex). Lyofyilizované (tj. rekonstituované) kapalně přípravky obsahující přirozený interferon-beta nebo

rekombinantní interferon-beta byly podávány pacientům trpícím relapsující roztroušenou sklerózou mozkomíšní, viz Jacobs et al., *Annals of Neurology* 39: 285-294 (březen 1996) a Jacobs a Munschauer, "Treatment of multiple sclerosis with interferons", v *Treatment of multiple sclerosis: trial design, results and future perspectives*, s. 223-250, R.A. Rudnick et al.(ed.), Springer London 1992. Použití kapalných přípravků podle vynálezu pro léčení roztroušené sklerózy mozkomíšní probíhá podle stejných protokolů a bere do úvahy stejné primární proměnné jaké byly popsány ve výše citované publikaci Jacobse et al.

Jeden ze způsobů jak hodnotit užitečnost kapalných přípravků podle předkládaného vynálezu je provést toxikologickou studii a hodnotit podráždění tkáně, ke kterému dojde v důsledku podání kapalného přípravku. Provedli jsme toxikologickou studii přípravků podle předkládaného vynálezu na králících, viz příklad 8.

Následující příklady slouží k ilustraci některých provedení vynálezu a v žádném případě předmět vynálezu neomezuje.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Metody použité pro testy

Bylo použito několik dobře popsaných metod pro stanovení fyzikálně-chemických vlastností interferon-beta v kapalných přípravcích podle předkládaného vynálezu, tyto metody je možné využít i pro charakterizaci jiných interferonů. Přítomnost/nepřítomnost nerozpustných agregátů

byla sledována měřením absorpance při 320 nm a transmitance při 580 nm. Koncentrace rozpustných proteinů byla stanoveny buďto měřením absorpance při 278 až 280 nm (s extinkčním koeficientem 1,5) nebo kapalinovou chromatografií (HPLC) s reverzní fází za použití známé koncentrace interferonu-beta, která byla přidána k přípravku jako standard. Před testem byly vzorky kapalných přípravků odstředěny. Procento rozpustných agregátů bylo stanoveno separací agregátů od monomerů interferonu-beta vylučovací chromatografií na koloně TSK-Gel ® G2000SW (Toso Haas, Montgomeryville, PA). Vrchol byl monitorován při 280 nm a použit pro výpočet procenta rozpustných agregátů.

Stabilita peptidových koster byla potvrzena pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE). Interferon-beta byl redukován merkaptoetnolem v přítomnosti dodecylsulfátu sodného předtím, než proběhla elektroforéza na 10 až 20% gradientovém gelu (MiniPlus SepragelS, Integrated Separation Systems, Natick, MA). Proteiny pak byly elektroforeticky přeneseny na nitrocelulózovou membránu a detekovány imunochemickou metodou pomocí protilátek anti-interferon-beta a koží anti-myší protilátky konjugované s křenovou peroxidázou. Viz např. publikace "Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach", 2nd edition, B.D. Hames and D. Rickwood, IRL Press.

Změna povrchového náboje, způsobená deamidací a dalšími chemickými změnami, byla sledována pomocí isoelektrického fokusování na polyakrylamidovém gelu (IEF 3-10 MiniPlus SepragelS, Integrated Separation Systems), viz výše citovaná publikace "Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach".

Oxidace methioninu, deaminace asparaginu a další možné chemické změny byly sledovány pomocí peptidového mapování. Interferon-beta byl naštěpen endoproteinázou Lys-C (Wako Pure Chemicals) v přítomnosti dithiotreitolu a vzniklé peptidové fragmenty byly separovány HPLC s reverzní fází. Obecné údaje viz Kalgahtgi, K., a Horvath, C. "Rapid Peptide Mapping by High Performance Liquid Chromatography", J. Chromatography 443, 343-354, 1988.

Profil N-vázaných oligosacharidů byl stanoven pomocí elektroforézy sacharidů podporované fluoroforem (FACE®) firmy Glyko, Inc. (Novato, CA). Oligosacharidy navázané na asparagin (N-vázané oligosacharidy) byly uvolněny z glykoproteinu pomocí enzymu peptidové N glykosylázy F, pak byly označeny fluoroforem na redukujícím konci metodou redukční aminace, pak separovány a nakonec kvantifikovány na polyakrylamidovém gelu.

Antivirová aktivita interferonu se stanovuje řadou metod jakonapř. těmi, které jsou podrobně popsány v publikaci W. E. Stewart II, "The Interferon System", Springer-Verlag (2d Ed. 1981). Zvláště užitečný test pro stanovení antivirové účinnosti interferonu je test inhibice cytopatického působení (CPE, Cytopathic Effect Inhibition Assay). Výhodná metoda je popsána publikací WHO Technical Report Series No. 725, Annex 1, 1985), na kterou se tímto plně odkazujeme.

Stručně řečeno, metoda CPE začíná tím, že se připraví pracovní standardní roztok interferonu-beta, který byl předtím kalibrován proti referenčnímu standardu WHO. Tento roztok se připraví s koncentrací 10 000 jednotek (U) v médiu D-MEM+ obsahujícím 10 % fetální bovinní sérum a 4 mM L-glutamin. V den testu se testované vzorky, standard a kontrolní vzorky naředí médiem D-MEM+ ve třech oddělených ředicích řadách: a) začínající od 32 U/ml a pokračující

polovičním ředěním, b) začínající od 12 U/ml a pokračující ředěním 1,5, a c) začínající od 6 U/ml a pokračující ředěním 1,2. Po 50 μ l naředěného vzorku se pak nanese do sloupců na 96jamkové mikrodestičce, přičemž se jedna destička užije pro jedno ředění. Pak se do každé jamky přidá 50 μ l buněk A549 (ATCC, katalogové č. CCL-185, Rockville, MD) v D-MEM+ v koncentraci 5×10^5 buněk/ml, což vedou ke dvojnásobnému naředění jak buněk tak interferonu-beta. Buňky s interferonem se pak inkubují ve 37 °C v 5% oxidu uhličitém po dobu 15 až 20 hodin. Obsah destičky se vytřepe a do každé jamky se přidá 100 μ l viru EMC (encefalomyokarditida) vhodně naředěného médiem. Buňky s virem se pak inkubují ve 37 °C v 5% oxidu uhličitém po dobu 30 hodin. Obsah destičky se pak vytřepe a přidá se 0,75% barvivo krystalová violet. Po 5 až 10 minutách se destičky opláchnou destilovanou vodou a nechají oschnout. Každá destička přitom obsahuje kontrolu buněčného růstu, kterou je jamka neobsahující ani interferon ani EMC, virovou kontrolu, kterou je jamka obsahující EMC a buňky, ale žádný interferon, a ředící řadu interferonového standardu.

Destičky se vyhodnocují vizuálně, aby se určila poslední jamka v každém sloupci ještě s živými buňkami (>25 % konfluentní purpurové barvy). Detekční limit je určen jako nejnižší koncentrace standardu, která chrání před toxicitou viru. Ředění vzorků v poslední pozitivní jamce se násobí detekčním limitem, který byl určen pro standard, a faktorem ředění vzorků, a tím se získá hodnota aktivity interferonu ve vzorku (MU/ml). Výsledky z každé destičky jsou převedeny na logaritmické hodnoty pro stanovení geometrického průměru a je vypočten 95 % interval spolehlivosti.

Příklad 2

Výběr pufrovacího systému

Byly připraveny tři sady pufrů obsahující 9 až 10 různých složek v každé sadě. Sada I obsahovala sérii roztoků fosforečnanu sodného a 100 mM chloridu sodného s pH mezi 4,0 a 7,2. Sada II obsahovala další řadu pufrů obsahujících citronan sodný s pH mezi 4,0 a 7,0. Sada III obsahovala pufrovací roztoky obsahující jantaran sodný, octan sodný a uhličitán sodný, vždy v kombinaci se 100 mM chloridem sodným, s pH v rozmezí 4,0 až 7,2. Ve dvou dalších roztocích byl chlorid sodný nahrazen 50mM síranem sodným při pH 4,0 až 7,2.

Základní roztok interferonu-beta byl po roztátí přes noc dialyzován proti různým pufrům při 2 až 8 °C s alespoň dvěma výměnami pufru a pak byl získaný roztok sterilizován filtrací. Koncentrace proteinu byla stanovena měřením absorbance při 278 nm (s extinkčním koeficientem $1,5 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$) a všechny vzorky obsahovaly 140 $\mu\text{g/ml}$ nebo 150 $\mu\text{g/ml}$ interferonu-beta. Vzorky byly přefiltrovány, rozděleny na 4 sady do 2,2ml mikrozkuvek typu ependorf. Jedna sada byla umístěna do 2 až 8 °C, jedna sada byla umístěna do 37 °C na 6 dní až 2 týdny, jiná byla umístěna do rotátoru na 7 až 9 hodin a poslední sada byla užita jako kontrola v počátečním (nulovém) čase. Procentuální ztráty proteinu v důsledku vzniku nerozpustných agregátů byla vypočítána ze snížení koncentrace proteinu v průběhu různých zásahů dělené výchozí koncentrací.

Výsledky byly následující:

Procentuální ztráty proteinu v důsledku vzniku nerozpustných agregátů byla vypočítána ze snížení koncentrace proteinu v průběhu různých zásahů dělené výchozí koncentrací.

Statická analýza všech získaných dat ukázala, že vzorky interferonu v pufrech s pH 4,0 až 5,0 měly menší procentální ztrátu proteinů v důsledku agregace ve srovnání se vzorky s vyšším pH. Vzorky interferonu inkubované při 37 °C a pH 4,0 až 5,0 ztratily asi 10 až 15 % v důsledku agregace. Při pH hodnotách vyšších než 6 rostly ztráty až na 40 až 50 %. Zjistili jsme také, že interferonové vzorky měly při pH vyšším než 6 více rozpustných agregátů. Avšak pomocí peptidového mapování jsme zjistili, že když se hodnota pH zvyšuje z 4,0 na 7,2, podstatně se lineárním způsobem zvyšuje množství interferonu, který je deamidován, při pH 7,0 a vyšším více než 85 % interferonu bylo deaminováno v této studii. Měřili jsme také isoelektrický bod (pI) proteinových druhů ve vzorku (tj. pH při kterém protein nemigruje v elektrickém poli a celkový průměrný náboj proteinu je nulový) a IEF/westernový přenos ukázaly zvláštní pás pI vzorků v citrátovém pufru a změnila intenzitu pásů vzorků v sukcinátovém pufru. Fosfátový pufr nemá žádnou pufrovací kapacitu při pH 5,0. Pufr s octanem sodným a chloridem sodným s pH 5,0 nejevil žádné změny ve vzorci pásů ani v intenzitě pásů.

Příklad 3

Působení kavitace

Během experimentů, kdy se testovala vhodná hodnota pH, popsanych v příkladu 2, jsme zjistili, že prostor nad přípravkem ve skladovacích zkumavkách je kritický pro ztrátu proteinu u některých vzorků. Když byl vzorek o objemu 1,5 ml umístěn ve 2,2ml zkumavce, nebyly pozorovány žádné ztráty proteinu. Naopak ve vzorku 1,2 ml výrazně vzrostla tvorba agregátů. To je v souladu s pozorováním, že tvorba agregátů

interferonu-beta v průběhu kroku purifikace, kdy se inaktivuje virus, závisí na hladině rozpuštěného kyslíku v průběhu tohoto kroku.

Ve stručnosti, krok inaktivace viru zahrnuje nastavení pH chelatujícího sefárového eluátu (viz sekce C) z hodnoty $7,85 \pm 0,25$ na hodnotu mezi 2,5 až 3,5 pomocí 15% kyseliny fosforečné, pak se okyselený eluát ponechá 120 až 135 minut a pak se znovu upraví pH na $6,7 \pm 0,7$ pomocí 0,5N hydroxidu sodného. Všechny uvedené kroky se provádějí ve 2 až 8 °C. Navrhli jsme provedení studie, která by stanovila, zde existuje vztah mezi vytvářením agregátů interferonu-beta v tomto kroku a množstvím rozpuštěného kyslíku.

Materiál a metody

Eluát z chelatující sefárové kolony byl rozdělen na 50 ml nebo 100 ml alikvotní části a přenesen po 100 ml rotačních lahví. Do každé lahve se přidal 1 ml argonem probublané 15% kyseliny fosforečné, láhev se pak jemně promíchávala 2 minuty a pak se držela bez míchání 2 hodiny ve 2 až 8 °C. Po této době se přidalo 6,5 ml argonem probublaného hydroxidu sodného a vzorky byly testovány vylučovací chromatografií v různých časových intervalech. Kyslík rozpuštěný v kapalině byl měřen kontinuálně kyslíkovou sondou (Orion, Model 860) a zaznamenán v okamžiku přidání base. U vzorků s hladinou kyslíku stejnou nebo nižší než 10 % byly prostory nad kapalinou v reakčních nádobkách promyty argonem.

Výsledky: Data uvedená na obr. 1 jasně ukazují vztah mezi množstvím rozpuštěného kyslíku přítomného v okamžiku přidání hydroxidu sodného a výtěžkem monomeru interferonu-beta v průběhu kroku inaktivace viru. Hodnoty výtěžku získané při koncentraci kyslíku nižší nebo shodné s 10 % jsou

významně odlišné od všech ostatních koncentrací kyslíku. Také jsme charakterizovali agregáty (data zde nejsou uvedena) a zjistili jsme, že jejich specifická aktivita je snížena 30 až 40x ve srovnání se základním meziproduktem. Také jsme zjistili, že více než 90 % agregátů je rezistentních k denaturaci pomocí SDS za neredukujících podmínek, což vede k domněnce, že se jedná o zesíťení kovalentními vazbami. Za redukujících podmínek (2% beta-merkaptóetanol) se agregáty rozpadají na monomery, což vede k domněnce, že se jedná o disulfidové vazby.

Příklad 4

Výběr excipientu

Série přípravku s interferonem-beta (60 µg/ml) obsahující různé excipienty byla připravena s výhodným pufrům o pH 5,0 obsahujícím 50mM octan sodný a 100 mM chlorid sodný. Excipienty byly glycin, arginin-HCl, sacharóza, glycerin, PEG3350, glutathion a Pluronic F-68. Meziprodukt interferonu-beta byl dialyzován proti do 50mM octanu sodného a 100 mM chloridu sodného s pH 5,0 přes noc při 2 až 8 °C s alespoň dvěma výměnami pufru a pak ještě před použitím filtrován. Koncentrace interferonu-beta byla stanovena měřením absorbance při 278 nm s odečtem pozadí. Všechny vzorky byly naředěny tak, aby výsledná koncentrace interferonu-beta byla přibližně 60 µg/ml. Všechny vzorky byly přefiltrovány, 2 ml byly přeneseny do 4ml skleněné lahvičky (nesilikonizované), prostor nad kapalinou byl propláchnut argonem a lahvičky byly uzavřeny. Sady vzorků pak byly umístěny do 2 až 8 °C a do 37 °C na dobu až 2 týdnů. Další vzorky byly podrobeny mechanickému stresu tím, že rotovaly po dobu 3 dnů.

Vzorky byly analyzovány postupy popsánymi v příkladu 1. Kromě toho procento rozpuštěného kyslíku v přípravku bylo měřeno analyzátozem krevních plynů Ciba-Corning Model 248. "Experimentální" hodnota je parciální tlak kyslíku (v mm Hg) vzorku, od kterého se odečte parciální tlak v "blanku", který byl probublán dusíkem, a "kontrolní" hodnota je parciální tlak kyslíku v "blankovém" pufru uloženém při teplotě místnosti, od které se odečte parciální tlak kyslíku dusíkem probublaném pufru. Procento rozpuštěného kyslíku ("experimentální"/"kontrolní") bylo vždy nižší než 30 %.

Výsledky: Analýzy IEF/westernový přenos a SDS-PAGE/westernový přenos vzorků inkubovaných při 37 °C po dva týdny ukázal posun pásů a snížení jejich intenzity současně přítomnost multimerů interferonu ve vzorcích, které obsahovaly PEG3350 a glutathion. Po dalším týdnu ve 37 °C vzorek, kde byl jako excipient glycerin, ukázal po analýze jeden zvláštní pás. Tam, kde byla použita sacharóza jako excipient došlo ke ztrátě intenzity pásů. Toto počáteční testování umožnilo dále podrobněji zvažovat použití argininu-HCl, glycinu, chlořidu sodného a manitolu v dalších studiích.

Příklad 5

Adsorpce interferonu

Interferonový meziprodukt byl po roztátí dialyzován do BG9589-1, 2, 3 a 4 (viz tabulka 1) přes noc v 2 až 8 °C s alespoň dvěma výměnami pufru a pak před použitím filtrován. Koncentrace proteinu byla stanovena měřením absorbance při 280 nm (s extinkčním koeficientem $1,5 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$). Všechny vzorky byly naředěny tak, aby výsledná koncentrace

interferonu-beta byla přibližně 60 µg/ml. Naředěné vzorky byly přeneseny ve třech opakováních buďto do 0,5ml silikonizovaných stříkaček dlouhých 1 cm (sklo typu I), kde byl prostor nad kapalinou propláchnut dusíkem, nebo do 0,75ml lahviček ze skla typu I, kde byl volný prostor nad kapalinou propláchnut argonem. Koncentrace proteinu se stanovily pomocí HPLC s reverzní fází (viz příklad 1).

Následující tabulka 3 uvádí přehled koncentrací proteinů, které byly stanoveny HPLC s reverzní fází. Údaje ukazují, že bylo méně proteinu ve vzorcích, které byly naplněny do skleněných lahviček ve srovnání se stříkačkami potaženými silikonem. Takže pro kapalně přípravky s interferonem-beta byly vybrány silikonizované stříkačky.

Tabulka 3

	Skleněná lahvička (µg/ml) (S.D.)	Silikonizovaná stříkačka (µg/ml) (S.D.)
8G9589-1	59.3 (2.6)	63.3 (2.5)
BG9589-2	58.3 (0.7)	61.7 (0.1)
BG9589-3	56.4 (0.4)	58.8 (1.1)
8G9589-4	55.5 (0.7)	59.3 (0.5)

Příklad 6

Přípravky s fyziologickou hodnotou pH

Iontová síla/fosfát. Počáteční studie byly provedeny v pufovacím systému fosfátového pufru s chloridem sodným s hodnotou pH 7,2 a s proměnlivou koncentrací jednotlivých složek, takže byla použita koncentrace fosfátu 10, 50 a 75 mM a iontová síla (definovaná jako $I = \sum c_i z_i^2$, kde c_i a z_i

jsou molární koncentrace a náboj příslušného iontu i) byla 0,2, 0,4 a 0,6 upravována pomocí chloridu sodného. Bylo využito faktoriální schéma experimentu, kde proměnnými byly koncentrace fosfátu (10, 50 a 75 mM) a iontová síla (0,2, 0,4 a 0,6). Obsahy fosforečnanu a hydrogenfosforečnanu sodného a chloridu sodného v pufru (aby bylo dosaženo požadované iontové síly) se počítaly pomocí upraveného tabulkového kalkulátoru, který publikovali Elis a Morrison: Buffers of Constant Ionic Strenght for Studying pH-dependent Processes, Methods Enzymol. 87: 405-426, 1982. Rovnice dovoľovaly stanovit požadované množství každé složky pufru pro určité pH, koncentraci fosfátu a iontovou sílu. Každý z devíti roztoků použitých v tomto multifaktoriálním experimentu byl připraven výměnou pufru v interferonovém meziproduktu pomocí odsolovací kolony Pharmacia PD-10. Hodnota pH všech výsledných roztoků byla $7,20 \pm 0,15$. Koncentrace byly stanoveny z hodnot absorbance měřené při 280 nm a pak byl interferon-beta naředěn příslušným puforem na koncentraci 150 $\mu\text{g/ml}$. Výsledné roztoky byly sterilizovány filtrací přes 0,22 μm filtr v argonové atmosféře byly po 1,3 ml uzavřeny do 5ml skleněných lahvíček, kde byl prostor nad roztokem naplněn argonem. Vzorky byly ve třech opakováních inkubovány při 37 °C po 6 dnů. Vzorky se analyzovaly a byly charakterizovány procentem transmitance při 580 nm, procentem výtěžku proteinu a pomocí IEF-PAGE/westernový přenos.

Výsledky: Analýza transmitance pro různé iontové síly ukázala trend zvyšování transmitance (tj. snižování množství nerozpustných proteinových agregátů) s rostoucí iontovou silou. Procento výtěžku proteinu jevílo stejnou tendenci, ačkoliv IEF-PAGE/westernový přenos neukázaly žádný trend v deamidaci s měnící se iontovou silou, takže všechny vzorky byly shodně deamidovány. Po uskladnění 6 dní ve 37 °C vzorky

vykazovaly zmenšující se agregaci pro snižující se koncentraci fosfátu a zvyšující se iontovou sílu. Výsledky experimentu s procentuální transmitancí a procentem výtěžku v závislosti na měnící se koncentraci fosfátu (zde neuvedeny) ukazují slabý trend snižování % transmitance s rostoucí koncentrací fosfátu, ale analýza rozptylu neprokázala významný rozdíl v průměrných hodnotách vzorků s různými koncentracemi fosfátu. Procenta výtěžku jevíly zlepšený výtěžek proteinu pro nižší koncentrace fosfátu (významný rozdíl pro 94% interval spolehlivosti). Analýzy IEF-PAGE/westernový přenos nejevily žádný zřetelný trend v deamidaci v závislosti na koncentraci fosfátu.

Poměr excipinet/sůl. Předběžné studie ukázaly (výsledky zde neuvedeny), že některé excipienty vyžadují sůl (např. chlorid sodný), aby se udržela vysoká iontová síla a bylo dosaženo stabilizujícího účinku při pH 7,2. Takže byl navržen multifaktoriální experiment kombinující excipienty (glycin, lysin, arginin, sacharóza a manitol) a frakce chloridu sodného přispívající k isotoničnosti roztoku ($f_{s\text{ol}} = 0, 0,25, 0,75 \text{ a } 1,0$). Tato frakce se vypočítává podle vzorce $f_{s\text{ol}} = O_{s\text{ol}} / (O_{s\text{ol}} + O_{\text{excipient}})$, kde $O_{s\text{ol}}$ a $O_{\text{excipient}}$ jsou osmolality v mOsm/kg chloridu sodného a excipientu v roztoku. Solná frakce umožňuje porovnávat účinek soli při různých excipientech. Všechny vzorky obsahovaly aditiva pro dosažení isotoničnosti, s proměnlivým poměrem excipient:sůl (definovaným pomocí $f_{s\text{ol}}$).

Byly připraveny 10% (hmotnost/objem) zásobní roztoky každého excipientu ve 20mM fosfátovém pufru s pH 7,2, které byly odplyněny a probublány argonem. Byl také připraven roztok 20mM chloridu sodného s 20mM fosfátem o pH 7,2, který byl odplyněn a probublán argonem. Výsledné roztoky byly testovány na koncentraci interferonu-beta měřením absorbance

při 280 nm a pak naředěny fosfátovým pufrům a příslušným zásobním roztokem excipientu a soli tak, aby se získala koncentrace interferonu 60 $\mu\text{g/ml}$ a požadovaný poměr soli a excipientu. Výsledné vzorky se sterilizovaly filtrací (0,22 μm) a naplnily se do 1 ml silikonizovaných skleněných stříkaček (Becton Dickinson) typu I (naplnitelný objem 0,5 ml) s prostorem nad roztokem naplněným dusíkem. Vzorky byly uloženy při 40 °C.

V 6 dnech byly vzorky s argininem, glycinem a sacharózou analyzovány měřením absorbance při 320 a 280 nm, jak před tak i po filtraci přes 0,22 μm filtr. Ve 2 týdnech byly podobně analyzovány vzorky obsahující arginin, lysin a manitol, které byly také podrobeny IEF-PAGE, redukující SDS-PAGE a neredukující SDS-PAGE. Kontrolní vzorky byly uloženy při teplotě 2 až 8 °C a obdobně analyzovány.

Výsledky: Výtěžek interferonu-beta 1a (vyjádřený jako procenta kontroly) rostl s rostoucí hodnotou f_{NaCl} pro sacharózu a manitol, maximální hodnoty dosáhl pro $f_{\text{NaCl}} = 1$ (130 mM chlorid sodný). Pro arginin a lysin výtěžek klesal s rostoucí hodnotou f_{NaCl} . Maximálního výtěžku pro přípravky s glycinem při pH 7,2 bylo dosaženo při $f_{\text{NaCl}} = 0,75$.

Tento test excipientů s fosfátovým pufrům o pH 7,2 s různými excipienty jako glycin, lysin, arginin, manitol a sacharóza, doplněnými do izotonického roztoku, ukázal, že výtěžek byl nízký u všech excipientů bez náboje. Míra deamidace nebyla těmito aditivami ovlivněna. Tak např. redukující a neredukující SDS/PAGE ukázala, že došlo ke ztrátě neglykosylovaných druhů interferonu-beta ve všech typech přípravků a ke ztrátě těžších pásů monomerů v samotném isotonickém chloridu sodném a manitolu. Lze shrnout, že je zde silná korelace mezi iontovým charakterem excipientu a jeho schopností stabilizovat interferon-beta proti agregaci

v těchto pufovacích systémech při fyziologickém pH. Neiontová aditiva, jako je sacharóza nebo manitol, neposkytují, jak se zdá, žádnou ochranu, ve skutečnosti mohou i uspišit ztrátu proteinu při fyziologickém pH. Chlorid sodný s jedním nábojem na rozpuštěnou částici, se chová lépe než manitol nebo sacharóza. Aminokyseliny obsahují dva náboje na molekulu při fyziologickém pH. V případě glycinu se zwitteriontová povaha této molekuly nezdá dostatečná k tomu, aby stabilizovala interferon-beta. Arginin a lysin obsahující po třech nábojích na molekulu stabilizují interferon-beta lépe než samotný chlorid sodný nebo přípravky obsahující glycin/chlorid sodný.

Příklad 7

Studie kinetiky a stability

Přípravky byly asepticky rozplněny v inertní atmosféře, stříkačky se inkubovaly v různých teplotách po různě dlouhou dobu a pak byl obsah stříkaček analyzován.

Interferonový meziprodukt byl po roztátí dialyzován do BG9589-1, 2, 3 a 4 přes noc v 2 až 8 °C s alespoň dvěma výměnami pufru a pak před použitím filtrován. Koncentrace proteinu byla stanovena měřením absorpance při 280 nm (s extinkčním koeficientem $1,5 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$). Všechny vzorky byly naředěny tak, aby výsledná koncentrace interferonu-beta 1a byla přibližně 60 $\mu\text{g/ml}$. Čtyři interferonové přípravky podle tabulky 1 byly přefiltrovány a pak po 0,5 ml naplněny do dlouhých 1ml stříkaček Becton Dickinson (BD), jejichž vnitřní povrch byl potažen nastříkaným nebo vypalovaným silikonem. Vzorky byly analyzovány měřením OD, vylučovací HPLC (SEC), elektroforézou s isoelektrickým fokusováním SDS-PAGE/westernový přenos, elektroforézou na redukcí

polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)/westernovým přenosem, peptidovým mapováním, elektroforézou sacharidů podporovanou fluoroforem (FACE) a biotestem CPE. Plyn vyplňující prostor nad roztokem byl dusík. Stříkačky byly inkubovány ve 2 až 8 °C, 25 °C, 33 °C a 40 °C po dobu až 90 dnů. Vzorky byly analyzovány postupy popsány v příkladu 1.

Výsledky: Analyzovali jsme koncentrace v našich vzorcích, normalizované vzhledem k výchozímu materiálu po dobu 90 dnů při různých teplotách. Obrázek 2 ilustruje, že BG9589-1 vykazuje úplnou stabilitu proteinu (nedošlo k žádné ztrátě proteinu) po 3 měsících inkubace v teplotě od 2 až 8 °C (průměrně 4°C) do 25 °C. Při teplotě skladování blízké se teplotě lidského těla (35 °C) bylo degradováno asi 18 % proteinu. Při teplotě skladování přesahující teplotu lidského těla (40 °C) bylo po 3 měsících degradováno asi 30 % proteinu. V podstatě shodné výsledky byly získány pro BG9598-2 (zde neuvedeny). Obrázek 3 ilustruje výsledky z testu, kdy se po 2 měsíce skladoval BG9589-3. Degradace proteinu byla minimální od 4 do 25 °C, ale při vyšších teplotách byla rychlá. Výsledky pro BG9589-4 jsou v podstatě shodné s výsledky uvedenými v tabulkách 2 a 3. Tyto údaje byly také potvrzeny pomocí SDS-PAGE/westernový přenos.

Ve "vypalovaných" stříkačkách nebyly po dobu studie žádné detekovatelné rozpustné agregáty. Také nebyly pozorovány žádné změny v koncentraci proteinu, v testu CPE, procentu oxidovaného AP6 a profilu sacharidů. Žádné změny vzorků nebyly detekovány ani redukcí SDS-PAGE)/westernovým přenosem ani IEF/westernovým přenosem. Došlo k určitému zvýšení procenta deamidace ve srovnání s výchozím bodem. Avšak výchozí materiál použitý k plnění stříkaček měl 37% deamidaci, což je více než 33,8 % které byly detekovány v materiálu po naplnění do stříkaček. To může být způsobeno

variabilitou v testu. Ve stříkačkách s nástřikem silikonu nebyly po dobu studie také žádné detekovatelné rozpustné agregáty. Také nebyly pozorovány žádné změny v koncentraci proteinu, v testu CPE, procentu oxidovaného AP6 a profilu sacharidů. Žádné změny vzorků nebyly detekovány ani redukcí (SDS-PAGE)/westernovým přenosem ani IEF/westernovým přenosem. Dosavadní výsledky lze stručně shrnout, že výsledný produkt BG9589-1 je stabilní až 3 měsíce v 2 až 8 °C ve stříkačkách s "vypalovaným silikonem" a až 6 měsíců ve 2 až 8 °C ve stříkačkách s "nastříkaným silikonem".

Po té, co byly stříkačky asepticky naplněny, byl proveden antivirový test CPE s přípravky BG9589-1 a BG9589-2 (viz tabulka 1). Hodnoty aktivity jak pro BG9589-1 tak i BG9589-2 byly 12,0 MU/ml. Antivirový test CPE se opakoval po uskladnění vzorků 3 měsíce v teplotě 2 až 8 °C. Zjištěná aktivita BG9589-1 byla 11,6 MU/ml (n=8) s 95% intervalem spolehlivosti 10,2 - 13,3 MU/ml.

Měřili jsme také stabilitu hlavního meziprojektu BG9589-1 ve 2 až 8 °C po dobu 5 měsíců a v -70 °C po dobu 6 měsíců. Vzorky BG9589-1 z pilotní diafiltrační studie byly analyzovány metodami popsanými v příkladu 1. Dosavadní výsledky ukázaly, že meziprojekt BG9589-1 je stabilní ve 2 až 8 °C po dobu 5 měsíců a v -70 °C po dobu 6 měsíců.

Po celou dobu této konkrétní studie nebyly detekovatelné žádné rozpustné agregáty. Také nebyly pozorovány žádné změny v koncentraci proteinu, v testu CPE, procentu oxidovaného AP6 a profilu sacharidů (rozdíly v deamidaci spadají do šíře rozptylu testu). Žádné změny vzorků nebyly detekovány ani redukcí (SDS-PAGE)/westernovým přenosem ani IEF/westernovým přenosem. Došlo k mírnému snížení koncentrace proteinu. ke snížení koncentrace proteinu u vzorků v -70 °C mohlo dojít v důsledku jednoho cyklu

zamrazení/tání. Snížení koncentrace proteinu však představuje nejvýše 15 % počáteční koncentrace.

Příklad 8

Preklinická studie

Byla provedena studie lokální snášenlivosti jediné intramuskulární injekce na králících, která sloužila k hodnocení lokální toxicity interferonu podávaného v několika nových přípravcích. Reakce v místě injekce na podání kapalných přípravků podle předkládaného vynálezu nebo rekonstituovaných přípravků s lyofilizovaným interferonem byla srovnatelná s odpovědí na podání normálního fyziologického roztoku.

1. Studie čtyř přípravku interferonu-beta sledováním podráždění a biologické dostupnosti po podání jedné IM dávky králíkovi

Dvacet samců novozélandských bílých králíků bylo intramuskulárně (IM) injikováno 30 µg interferonu-beta 1a ve formě jednoho z pěti následujících přípravků: BG9589-1 (pH 5,0, acetátový pufr, arginin jako stabilizátor, 0,5 ml/dávka), BG9589-2 (pH 5,0, acetátový pufr, glycin/NaCl jako stabilizátor, 0,5 ml/dávka), BG9589-3 (pH 5,0, fosfátový pufr, arginin jako stabilizátor, 0,5 ml/dávka), BG9589-4 (pH 7,2, acetátový pufr, glycin/NaCl jako stabilizátor, 0,5 ml/dávka) a lyofilizovaný přípravek interferonu-beta s pH 7,2 obsahující 1,5% HSA, 1,0 ml/dávka (viz výše citovaný Jacobs et al.).

Každé ošetření bylo aplikováno na 4 zvířata. Zvířata, která dostala BG9589-1 nebo lyofilizovaný přípravek, dostala také injekci stejného objemu fyziologického roztoku do

kontralaterální poloviny těla jako negativní kontrolu. Mikroskopické dermální vyšetření na erytém, tvorbu jizev a edém bylo provedeno 6, 12, 24, 48 a 72 hodin po aplikaci dávky. Po odběru krve po 72 hodinách od aplikace dávky byla zvířata usmrcena a místa vpichu byla zhodnocena makroskopicky z hlediska poškození tkání a pak byla fixována 10 % neutrálně pufrovaném formalínu. Vzorky svalové tkáně (tři na každé místo vpichu) byly mikroskopicky vyšetřeny na zánět, nekrózy, hemoragii a léze.

Výsledky: Když se použilo hodnocení podle škály indexu primárního podráždění (dermální klasifikační systém EPA), pak žádný z použitých přípravků nezpůsobil více než slabé podráždění kůže. Makroskopické vyšetření místa injekce přípravku BG9589-4 odhalilo u jednoho zvířete slabé podráždění (hemoragii), avšak mikroskopické vyšetření neukázalo žádné známky hemoragie a prokázalo, že se jednalo o artefakt. Stručně shrnuto, mikroskopická vyšetření ukázala, že reakce na podání testovaných kapalných přípravků v místě injekce byly konzistentně minimální až mírné a že žádná reakce nebyla silnější než reakce způsobená podáním lyofilizovaného přípravku nebo fyziologického roztoku.

Kromě toho podráždění kůže králíků po opakovaném IM podání kapalného přípravku se může snadno testovat pomocí několika skupin králíků, kteří budou dostávat intramuskulární injekce kapalného přípravku nebo fyziologického roztoku každý druhý den (celkem 5 dávek). Dávky se podávají do předem definovaného místa na hřbetě každého zvířete, aby se maximalizovala expozice k testované látce. Makroskopické dermální vyšetření se provádí 4 až 6 hodin po každém podání a 24 hodin po posledním podání v každé ošetřované skupině. Po 24 hodinách od podání poslední dávky po makroskopickém vyšetření se zvířata usmrtí a místa injekcí se podrobí

vyšetření na přítomnost poškození tkání a tkáně se pak fixují v 10 % neutrálně pufrovaném formalínu. Fixovaná tkáň se pak vyšetřuje mikroskopicky na přítomnost zánětu, nekrózy, hemoragie a léze. Bezprostředně před prvním podáním testované látky a před usmrcením se odebírají vzorky krve pro hematologické vyšetření a biochemické vyšetření séra.

Příklad 9

Klinická studie

Kapalné přípravky podle předkládaného vynálezu se významně odlišují od dříve známých interferonových přípravků. Z hlediska klinické indikace zde existuje možnost, že se mění farmakokinetické a farmakodynamické chování interferonu po podání člověku. Naneštěstí jsou účinky interferonu-beta vysoce druhově specifické a většina pertinentních farmakologických informací pochází ze studií na kulturách lidských buněk, na lidech a v menší míře na opicích. Výhodným způsobem testu farmakologických změn je pokus lidské bioekvivalence.

Antivirovou hladinu interferonu-beta v séru je možné kvantifikovat pomocí biotestu cytopatického účinku (CPE), který byl popsán v příkladu 1. Studie lidské bioekvivalence může být provedena s jakýmkoliv počtem kapalných nebo lyofilizovaných interferonových přípravků. Analýzou séra, plochy pod křivkou (AUC) a C_{max} je odborník schopen určit, zda jsou lyofilizované a kapalné přípravky bioekvivalentní. Jako jediný příklad studia bioekvivalence uvádíme zde stručně dvojnásobně slepou křížovou jednodávkovou studii, abychom demonstrovali bioekvivalenci kapalných přípravků podle předkládaného vynálezu s lyofilizovanými přípravky interferonu-beta na skupině zdravých dobrovolníků.

Návrh studie: Každý subjekt dostává stejnou dávku (např. 60 µg/12 MU) přípravku interferonu-beta ve dvojnásobně slepém pokuse křížově ve dvou okamžicích (viz tabulka 4). Subjekty jsou ve věku mezi 18 a 45 lety včetně a v 15% rozmezí normální tělní hmotnosti a výšky pro daný tělní typ. Bezprostředně před aplikací, a v různých časových intervalech po aplikaci každé dávky, až po 144 hodin po aplikaci se odebírají vzorky krve pro hematologické vyšetření, vyšetření biochemické, vyšetření aktivity interferonu-beta a vyšetření farmakodynamického profilu. Také se vyhodnocuje bolestivost při injekci a reakce v místě injekce.

Doprovodná opatření studie: každý subjekt dostává acetaminofen bezprostředně před a během období aplikace dávek jako profylaxi proti chřipkovému syndromu spojenému s interferonem.

Farmakokintika: Stanovení interferonu-beta v séru

Hladiny v séru se určují jako jednotky antivirové účinnosti testem CPE. Antivirová hladina v séru se analyzuje na hodnoty AUC, C_{max} a T_{max} . Hodnoty AUC se vypočítávají z času od dávky po poslední detekovatelnou hladinu (AUC_{0-T}) a pro 144 hodin po dávce (AUC_{0-144}). Standardní popisná analýza těchto experimentálních dat se provádí pomocí programového souboru SAS (verze 6.08, SAS Institute, Cary, North Carolina).

Tabulka 5: Schéma dávek v ukázkové studii

Skupina	Způsob podání	Dávka (MU)	1. termín podání	2.termín podání
1	IM	12	lyofilizovaný (60 mcg)	kapalný (60 mcg)
2	IM	12	kapalný (60 mcg)	lyofilizovaný (60 mcg)

Farmakodynamika

Biologický marker neopterin, produkt interferonem indukovaného enzymu GTPcyklohydrolázy, který odráží aktivaci makrofágů a T-buněk (C. Huber et al., J. Exp. Med. 15, 1984, 160: 310-314; September 20, 1996; D.Fuchs et al., Immunol. Today 9: 150-155; 1988) byl charakterizován. Jak v klinických tak neklinických studiích rekombinantního lidského interferonu-beta koreluje indukce neopterinu s aktivitou v séru po podání různých rekombinantních lidských interferonů.

Neopterin se měří standardním laboratorním postupem. Farmakodynamický profil interferonu-beta se popíše kvantitativním způsobem výpočtem třech parametrů neopterinu v krvi. První parametr, E_{AUC} , je plocha pod křivkou závislosti neopterinu na čase normalizovaná k základní hladině. Druhý parametr je E_{max} , tento paramter je rozdílem mezi pozorovaným vrcholem neopterinu a základní hladinou neopterinu. Třetí parametr je indukční poměr, IR, tento parametr se počítá jako vrcholová hodnota hladiny neopterinu dělená základní hladinou neopterinu.

Statistika.

Pro stanovení ekvivalence na AUC bylo užito Wilcoxon-Mann-Whitneyova jednostranného a dvoustranného testu. Pro stanovení relativní biologické dostupnosti interferonu z kapalného přípravku relativně vzhledem k lyofilizovanému přípravku a 90% intervalu spolehlivosti byla provedena na AUC analýza rozptylu (ANOVA) po logaritmické transformaci. Pomocí rozptylu "mezi subjekty" se oddělí vliv posloupnosti a pohlaví. Pomocí rozptylu "uvnitř subjektu" se oddělí složky rozptylu způsobné obdobím a skupinou léčení.

Ekvivalenty

Odborníkovi jsou zřejmá další provedení vynálezu na základě popisu a příkladů provedení předkládaného vynálezu. Avšak jak popis tak příklady je třeba považovat za ukázková řešení předkládaného vynálezu, přičemž skutečný předmět a rozsah předkládaného vynálezu je vymezen následujícími nároky.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Kapalný přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje interferon a stabilizující činidlo v množství mezi 0,3 % a 5 % (hmot.), kteréžto činidlo je aminokyselina vybraná ze skupiny obsahující kyselé aminokyseliny, arginin a glycin, přičemž tento kapalný přípravek nebyl předtím lyofilizován.

2. Kapalný přípravek podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nádobka, ve které je přípravek obsažen, má alespoň jeden povrch potažený materiálem inertním k interferonu.

3. Kapalný přípravek podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že interferon je interferon-beta nebo rekombinantně připravený interferon.

4. Kapalný přípravek podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že má hodnotu pH mezi 4,0 a 7,2.

5. Kapalný přípravek podle nároku 4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že má hodnotu pH mezi 4,8 a 5,2.

6. Kapalný přípravek podle nároku 5 v y z n a č u j í c í s e t í m, že má hodnotu pH 5,0.

7. Kapalný přípravek podle nároku 5
v y z n a č u j í c í s e t í m, že kyselá aminokyselina je
kyselina glutamová.

8. Kapalný přípravek podle nároku 1
v y z n a č u j í c í s e t í m, že arginin je arginin-HCl.

9. Kapalný přípravek podle nároku 1
v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncentrace interferonu
je mezi 6 IMU/ml a 50 IMU/ml.

10. Kapalný přípravek podle nároku 2
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň jeden povrch
nádobky je potažen materiálem vybraným ze skupiny obsahující
silikon a polytetrafluoretylén.

11. Kapalný přípravek podle nároku 10
v y z n a č u j í c í s e t í m, že nádobka je injekční
stříkačka.

12. 20mM acetátový pufr s pH 5,0 v y z n a č u j í c í
s e t í m, že obsahuje interferon-beta a stabilizující
činitel vybrané ze skupiny obsahující a) 150mM arginin,
b) 100mM chlorid sodný a 70mM glycin, c) 150mM arginin
a 15mg/ml lidský sérový albumin, d) 150mM arginin
a surfaktant, e) 140mM chlorid sodný, f) 140mM chlorid sodný
a 15mg/ml lidský sérový albumin, g) 140mM chlorid sodný
a surfaktant, přičemž pufr nebyl předtím lyofilizován.

13. Pufr podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e
t í m, že surfaktant je 0,1% (hmot./obj.) Pluronic F-68.

14. Pufr podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že arginin je arginin-HCl.

15. Pufr podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nádobka, ve které je pufr obsažen, má alespoň jeden povrch, který je v kontaktu s pufrem, potažený materiálem vybraným ze skupiny obsahující silikon a polytetrafluoretylén.

16. Pufr podle nároku 15 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nádobka je injekční stříkačka.

17. Kapalný přípravek s pH 5,0 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje interferon-beta a 170mM kyselinu L-glutamovou, přičemž přípravek nebyl předtím lyofilizován.

18. Kapalný přípravek podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje aminokyselinu glycin, a že dále obsahuje sůl.

19. Kapalný přípravek podle nároku 17 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje složky vybrané ze skupiny obsahující 15mg/ml lidský sérový albumin a 0,1% (hmot./obj.) Pluronic F-68.

20. 20mM fosfátový pufr s pH 7,2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje interferon a stabilizující činidlo vybrané ze skupiny obsahující a) 140mM arginin, b) 100mM chlorid sodný se 70mM glycinem, přičemž pufr nebyl předtím lyofilizován.

21. Kapalný přípravek podle nároku 20
v y z n a č u j í c í s e t í m, že nádobka, ve které je
pufr obsažen, má alespoň jeden povrch, který je v kontaktu
s kapalinou, potažený materiálem vybraným ze skupiny
obsahující silikon a polytetrafluoretylén.

22. Kapalný přípravek podle nároku 20
v y z n a č u j í c í s e t í m, že nádobka je injekční
stříkačka.

23. Kapalný farmaceutický přípravek, obsažený v zásobní
nádobce a vhodný pro parenterální podávání savcům,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje účinné
množství interferonu-beta, pufr udržující pH v rozmezí 4,0 až
6,0 a aminokyselinové stabilizující činidlo, přičemž
interferon-beta nebyl podroben předchozí lyofilizaci
a zásobní nádobka má alespoň jeden povrch, který je
v kontaktu s kapalinou, potažený materiálem vybraným ze
skupiny obsahující silikon a polytetrafluoretylén.

24. Kapalný přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že zásobní nádobka nemá
rozhraní prostředí obsahující kyslík/kapalina.

25. Kapalný přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že interferon beta si
v podstatě uchovává svou antivirovou účinnost během
skladování při teplotě mezi 2 °C a 25 °C po dobu alespoň dvou
měsíců.

26. Kapalný přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že inteferon-beta nebyl
vystaven předchozí kavitaci.

27. Kapalný přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že pufr je organický pufr
vybraný ze skupiny obsahující citrátový, sukcinátový,
tartarátový, fumarátový, glukonátový, oxalátový, laktátový
a acetátový pufr.

28. Kapalný přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že aminokyselinové
stabilizující činidlo je vybráno ze skupiny obsahující kyselé
aminokyseliny, glycin a arginin.

29. Kapalný přípravek podle nároku 28
v y z n a č u j í c í s e t í m, že aminokyselina je
přidána v množství 0,3 % až 5,0 % hmotnosti přípravku.

30. Kapalný přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že pH kapalného přípravku
je v rozmezí 4,5 až 5,5.

31. Kapalný přípravek podle nároku 30
v y z n a č u j í c í s e t í m, že pH kapalného přípravku
je 5,0.

32. Kapalný přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že je sterilní.

33. Kapalný přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že je isotonický s krví.

34. Kapalný přípravek podle nároku 23
v y z n a č u j í c í s e t í m, že inerferon-beta je
lidský rekombinantní inerferon-beta.

35. Kapalný přípravek podle nároku 24
v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivita lidského
rekombinantního inteferonu-beta je v rozmezí od 6 do
50 IMU/ml proteinu.

36. Zamražený kapalný přípravek v y z n a č u j í c í
s e t í m, že obsahuje interferon a stabilizující činidlo
v rozmezí 0,3 % až 3,13 % (hmot.), kteréžto činidlo je
aminokyselina vybraná ze skupiny obsahující kyselé
aminokyseliny, arginin a glycin, přičemž kapalný přípravek
nebyl předtím lyofilizován.

37. Souprava pro parenterální podávání kapalného
interferonového přípravku v y z n a č u j í c í s e t í m,
že obsahuje a) nádobku obsahující kapalný přípravek s pH mezi
4 a 6, který obsahuje farmaceuticky účinné množství
inteferonu-beta, a který nebyl předtím lyofilizován,
a aminokyselinové stabilizující činidlo v množství menším než
3,1 % (hmot.), a b) návod k použití soupravy.

38. Souprava podle nároku 37 v y z n a č u j í c í s e
t í m, že dále obsahuje c) alkoholový tampon, d) jehlu
a alespoň jednu náplast.

39. Souprava podle nároku 37 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nádobka je injekční stříkačka, která má alespoň jeden povrch, který je v kontaktu s kapalným přípravkem, potažený materiálem vybraným ze skupiny obsahující silikon a polytetrafluoretylén.

40. Souprava podle nároku 39 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nádobka je injekční stříkačka a kapalný přípravek obsažený uvnitř stříkačky nemá rozhraní prostředí obsahující kyslík/kapalina.

41. Způsob stabilizace interferonu-beta v kapalném farmaceutickém přípravku, takže si v podstatě uchová svou antivirovou účinnost během skladování při teplotě 2 až 25 °C po dobu alespoň 3 měsíců, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se smíchá a) inteferon-beta, b) pufr udržující pH v rozmezí 4,0 až 7,2 a c) aminokyselinové stabilizující činidlo, přičemž kapalina nebyla předtím lyofilizována ani nebyla kavitována.

42. Způsob podle nároku 42 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje krok, kdy se přimíchá sůl, aby se dosáhlo vhodné iontové síly.

43. Způsob podle nároku 42 v y z n a č u j í c í s e t í m, že sůl je chlorid sodný.