



(19) **HU**

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: **224 222**

(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 00 00829**

(22) A bejelentés napja: **1997. 12. 23.**

(40) A közzététel napja: **2000. 07. 28.**

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2005. 06. 28.**

(51) Int. Cl.⁷: **A 61 K 47/18**

A 61 K 9/08

A 61 K 38/21

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 97/23817

(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9828007**

(30) Elsőbbségi adatok:

60/034,353 1996. 12. 24. US

(72) Feltalálók:

**Chung, Wen-Li, Arlington, Massachusetts (US);
Dibiasi, Mary D., Wellesley, Massachusetts (US);
Scharin, Eric, Cambridge, Massachusetts (US);
Staples, Mark, Cambridge, Massachusetts (US)**

(73) Jogosult:

BIOGEN Inc., Cambridge, Massachusetts (US)

(74) Képviselő:

**dr. Láng Tivadarné, S. B. G. & K. Szabadalmi
Ügyvivői Iroda, Budapest**

(54) **Stabil folyékony interferonkészítmény-formák és eljárás interferon stabilizálására**

(57) Kivonat

A találmány olyan folyékony készítményre vonatkozik, amely interferont és 0,3%–5% (t/tf) mennyiségben egy aminosav-stabilizálószeret tartalmaz, melyet savas jellegű aminosavakból, argininből és glicinből álló aminosavcsoportból választanak ki, ahol a folyékony készítmény nem liofilizált interferonból van előállítva, és a

folyékony készítmény utólag sem kerül liofilizálásra. A találmány a fenti készítmények előállítására is vonatkozik. A folyékony készítményt előnyösen egy olyan tartály tartalmazza, melynek legalább az egyik felülete egy, az interferonra nézve inert anyaggal van bevonva.

HU 224 222 B1

A találmány a humán béta-interferon stabilizálására szolgáló eljárásokra és stabil béta-interferon folyékony készítményformákra vonatkozik.

Az interferonok olyan proteinek, amelyek számos biológiai hatást fejtenek ki, például antivirális, immunmoduláló és antiproliferatív hatást. Az interferonok fajspecifikus, viszonylag kis, egyláncú polipeptidok, amelyeket emlőssejtek termelnek különböző induktív anyagok – mint a vírusok, polipeptidok, mitogének és hasonlók – hatására adott válaszként. Az interferonok az állati szöveteket és sejteket megvédik virális támadások ellen, és fontos szerepet töltenek be a gazda védekezésmechanizmusában. A legtöbb esetben az interferonok jobb védelmet biztosítanak azon faj szöveteinek és sejteinek, amely az interferonokat termeli, mint más típusú szöveteknek és sejteknek, és ez azt jelenti, hogy a humán eredetű interferon sokkal hatásosabbnak bizonyul az emberi betegségek kezelésében, mint a más fajokból származó interferonok.

A humán interferonoknak több megkülönböztethető típusa van. Ezeket általában leukocita (alfa-interferon), fibroblaszt (béta-interferon) és immun (gamma-interferon) interferonként osztályozzák, nagyszámú variánsaikkal együtt. Az interferonok általános ismertetése megtalálható különféle közleményekben és monográfiákban. Például: „The Interferon System” [W. E. Stewart, Springer Verlag, N. Y., 1979] és „Interferon Therapy” [World Health Organization Technical Report Series 676, World Health Organization, Genf, 1982], melyet referenciának tekintünk.

Az interferon alkalmazásának módja lényeges tényező ezen fontos terápiás szer klinikai felhasználásánál. Az interferont leggyakrabban szisztémásan adják be, intravénás, intramuszkuláris vagy szubkután injekcióban némi eredménnyel olyan rendellenességek kezelésében, mint a hajas sejtés leukémia, szerzett immunhiányos szindróma (AIDS) és az ezzel összefüggő Kaposi-szindróma. Ismeretes azonban, hogy a proteinek tisztított formában különösen hajlamosak a degradációra. Ami a béta-interferont illeti, az interferondegradáció primer mechanizmusa(i) oldatban az aggregáció és a dezamidáció. Az interferon instabilitása oldatokban és más termékekben korlátozza a felhasználhatóságát.

A klinikai használatra előállított interferon-gyógyszerkészítmények az interferont szokásosan liofilizált (azaz fagyasztva szárított) készítmény formájában tartalmazzák komplex szerves vivőanyagokkal és stabilizátorokkal együtt, ilyenek például a nemionos felületaktív anyagok, a különböző cukrok, szerves polialkoholok és/vagy a humán szérumalbumin. Ilyen liofilizált készítményeket ismertetnek például az alábbi szabadalmi dokumentumokban.

A WO 88/09674 számú nemzetközi közzétételi iratban gamma-interferon stabilizált készítményeit ismertetik, amelyek laktobionsavat és egy acetát/glicin puffert tartalmaznak. A laktobionsav hozzáadása megelőzi a magasabb rendű aggregátumok képződését a liofilizált készítmény rekonstitúciója során.

Az EP 0 163 111 számú európai szabadalmi leírásban olyan aminosavakat ismertetnek, mint például az

arginin és glutamin, melyek képesek növelni a liofilizált interferonkészítmények oldhatóságát vízben a rekonstitúció során.

Az EP 0 284 249 számú európai közrebecsátási iratban olyan liofilizált interferonkészítményeket írnak le, melyek glicint vagy humán szérumalbumint (HSA), egy puffert (például acetát) és egy izotóniás szert (például NaCl) tartalmaznak. Ezek mindegyike szükséges egy stabil, liofilizált készítmény létrehozásához.

A US 4,496,537 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban liofilizált interferonkészítményeket ismertetnek, melyek foszfát-puffert, glicint és humán szérumalbumint tartalmaznak. A kitanítás szerint a glicin és a humán szérumalbumin együttes alkalmazása megnöveli a liofilizált készítmény rekonstitúcióját, azaz újra oldatba vitelét.

A liofilizált készítményeknek az a hátránya, hogy komplex csomagolást igényelnek, mivel külön hozzájuk kell csomagolni az injekcióhoz való steril vizet. Ezenkívül a liofilizált készítmények használat előtt számos manipulációt igényelnek, ennél fogva az injekció elkészítése során növekszik a tűszúrások eshetősége és a komponensek elcsöppenése. Ezek a manipulációk különösen azoknál a betegpopulációknál problematikusak, amelyeknél gyenge az izomzat és rossz a koordinációs készség, ilyenek a szklerózis multiplex (multiple sclerosis=MS) betegek. Az MS betegek saját maguknak is beadhatják az interferont, ezért egy olyan adagolási forma, amelyet sokkal könnyebb beadni, mint a jelenleg forgalmazott liofilizált termékeket, fontos hozzáadott értéket jelent a megcélzott betegpopuláció számára. Az interferon egyszerű folyékony készítményformái szerfelett kívánatosak azért, hogy elkerüljük a készítmény feloldását, ami akkor szükséges, amikor liofilizált készítmények használatára kerül sor.

Az interferont tartalmazó, nemliofilizált készítményformák szintén tartalmazhatnak komplex vivőanyagokat, például humán szérumalbumint, polialkoholokat, cukrokat és anionos felületaktív stabilizálóanyagokat. Lásd például: WO 89/10756 számú nemzetközi közzétételi irat (Hara et al.; polialkohol és p-hidroxi-benzoát használatát ismertetik).

A találmány a fenti problémákat annak a felismerésnek a nyomán oldja meg, hogy ugyanis a béta-interferon stabilizálható, amennyiben olyan puffertolt oldatokban készítik el, amelyek pH-ja 4–7,2 közé esik, és az oldatok stabilizálószerként aminosavat tartalmaznak, és néhány esetben sót is (ha az aminosav nem tartalmaz töltéssel rendelkező oldalláncot). A béta-interferont nem liofilizáljuk, hanem mihelyt az általános gyakorlattal rendelkező szakemberek az ismert eljárások alkalmazásával az alapanyagokból előállítják, közvetlenül a találmány szerinti készítményformába visszük be.

A találmány tárgyát tehát – egyik kiviteli alakban – egy olyan folyékony készítmény képezi, amely egy interferont és egy stabilizálószeret – körülbelül 0,3–5 t/ff-százalék közötti mennyiségben – tartalmaz. A stabilizálószer egy aminosav, amelyet savas jellegű aminosavak, arginin és glicin közül választunk ki. A fo-

lyékony készítményt utólag nem liofilizáljuk. Ezenkívül előnyös, ha a folyékony készítmény egy olyan tartályban van – például fecskendőben – amelynek a folyadékkal érintkező felülete olyan anyaggal van bevonva, amely inert az interferonra nézve, mint például a szilikon vagy a poli(tetrafluor)-etilén. Az előnyös készítmények béta-interferont vagy rekombináns technikával előállított interferont tartalmaznak olyan pufferben, amelynek a pH-ja körülbelül 4,0 és körülbelül 7,2 között van. A találmány szerinti további készítményformák például a következők:

(1) 20 mM acetátpuffer (pH 5,0) – a puffert előzőleg nem liofilizáljuk – amely béta-interferont plusz egy további alkotórészt tartalmaz, amelyet a következők közül választunk ki: a) 150 mM arginin.HCl; b) 100 mM nátrium-klorid és 70 mM glicin; c) 150 mM arginin.HCl és 15 mg/ml humán szérumalbumin; d) 150 mM arginin.HCl és 0,1% Pluronic F-68; e) 140 mM nátrium-klorid; f) 140 mM nátrium-klorid és 15 mg/ml humán szérumalbumin; és 140 mM nátrium-klorid és 0,1% Pluronic F-68.

(2) béta-interferont 170 mM L-glutaminsavat és 150 mM nátrium-hidroxidot tartalmazó oldat (pH 5,0), az oldatot előzőleg nem liofilizáljuk;

(3) 20 mM foszfátpuffer (pH 7,2) – a puffert előzőleg nem liofilizáljuk – amely béta-interferont plusz egy további alkotórészt tartalmaz, amelyet a következők közül választunk ki: a) 140 mM arginin-HCl és b) 100 mM nátrium-klorid és 70 mM glicin.

A találmány egy másik kiviteli alakját egy folyékony interferonkészítmény-forma parenterális bevitelre alkalmas készlete képezi. A készlet egy folyékony készítményformát – pH 4–6 között – tartalmazó tartályból áll, amelyben az említett folyadék a béta-interferon – amelyet előzőleg nem liofilizáltunk – gyógyszerészetileg hatásos mennyiségét és egy aminosav-stabilizálószer 5 tömegszázaléki mennyiségét vagy ennél kisebb mennyiségét tartalmazza; továbbá használati utasításokat tartalmaz.

A találmány egy további kiviteli alakjában egy elősőknel parenterális bevitelre alkalmas gyógyszerkészítményt ismertetünk, amely lényegében a béta-interferon – amelyet előzőleg nem liofilizáltunk – hatásos mennyiségét tartalmazza egy olyan pufferben, amely a pH-t 4,0–6,0 közötti tartományban tartja és egy aminosav-stabilizálószer tartalmaz, megfelelő ionerősség mellett. A) készítményt tárolótartály – például fecskendő – tartalmazza. Előnyös, ha a tárolótartályban nincs oxigéntartalmú gáz/folyadék határfelület (azaz az interferonoldat nem lehet kiteve oxigént tartalmazó gáz hatásának a készítés és a tárolás alatt). A béta-interferon lényegében megtartja antivirális aktivitását körülbelül 2 °C és körülbelül 25 °C közötti hőmérsékleteken való tárolás alatt legalább 3 hónapig.

Folyékony gyógyszerkészítményekben a béta-interferon stabilizálására szolgáló találmány szerinti eljárás – amikor is a készítmény lényegében legalább 3 hónapig megtartja fizikai stabilitását körülbelül 2–25 °C közötti hőmérsékleten való tárolás alatt – abból áll, hogy a következő alkotórészeket keverjük

össze: a) a béta-interferon hatásos mennyiségét; b) egy puffert, amely a pH-t 4,0–7,2 között tartja megfelelő ionerő mellett; és c) egy aminosav-stabilizálószer. A) készítményben lévő folyadékot előzőleg nem liofilizáljuk és nem tesszük ki oxigéntartalmú gáz hatásának a készítés és tárolás alatt.

A folyékony készítményformáknak számos előnye van a liofilizált készítményformákhoz képest. Az előnyök a következők: (i) a folyékony készítményformához szükséges kisebb injekciós térfogat kevesebb kényelmetlenséggel jár, mint egy nagyobb térfogat; (ii) a komplex vivőanyagok helyettesítése egyszerű aminosavakkal lehetővé teszi, hogy a késztermék minőségét szigorúbban ellenőrizzük; (iii) a csomagolást nagymértékben egyszerűsíti, hogy kiküszöbölhető külön oldószer (injekcióhoz való desztillált víz=water for injection=WFI), valamint külön fecskendő és üvegcsé hozzácsomagolása; (iv) az adagolás pontossága javul, ugyanis kevesebb folyadék átvitelére van szükség; és (v) a termék biztonságos volta javul, mivel az egyszerű beadás csökkenti a tűszúrások eshetőségét és az injekció elkészítésekor a komponensek elcsöppenését.

A találmány tárgyát képezi tehát, hogy rendelkezésre bocsátjuk a béta-interferon biológiailag aktív, stabil, folyékony készítményformáját injekciós alkalmazásokban való felhasználásra.

A találmány egy másik tárgyát egy olyan készítményforma képezi, amely nem igényli a béta-interferonkészítmény előzetes liofilizálását.

A találmány további tárgyát egy olyan eljárás képezi, amellyel meggátoljuk egy béta-interferon folyékony készítményforma stabilitásának megszűnését azáltal, hogy a) elkerüljük kavitáció (cavitation) és/vagy légtér (head space) képződését a folyékony készítmény előállítása folyamán vagy b) a folyékony készítményformát olyan légtérrel tároljuk, amely inert gázból – ilyen az argon vagy a nitrogén – áll.

A találmány tárgyát képezi ezenkívül egy olyan folyékony készítményforma, amely folyékony állapotban hosszú ideig való tárolást tesz lehetővé, és ezzel megkönnyíti az alkalmazás előtti tárolást és szállítást. A találmány másik tárgyát olyan folyékony készítményforma képezi, amely – tekintve, hogy kiküszöböljük a liofilizálás és a feloldás lépéseit – könnyen elkészíthető és beadható.

Vonatkozik a találmány az egyszerű aminosavaknak, mint alternatív stabilizátoroknak a használatára, az általánosan alkalmazott szérumalbumin helyett vagy mellett, ami könnyebbé teszi a termék minőségének ellenőrzését.

A találmány vonatkozik még olyan gyógyszerkészítmény előállítására, amely nem liofilizált béta-interferont tartalmaz, és ezért kisebb költséggel állítható elő.

A találmány további előnyei részben megtalálhatók az alábbi leírásban, részben a leírásból válnak nyilvánvalókká, vagy a találmány szerinti gyakorlatból lesznek megismerhetők. A mellékelt ábrák – amelyek az ismerettséghez tartoznak és ennek részét képezik – a találmány elvét szemléltetik, és a leírással együtt annak magyarázatául szolgálnak.

Az alábbiakban az ábrák rövid ismertetése következik.

1. ábra: A diagram a bulk-ban előállított folyadékban maradt béta-interferonmonomer százalékat mutatja a folyadékban oldott oxigén százalékanak függvényében.

2. ábra: A diagram a proteinkoncentrációt ábrázolja a kiindulási anyag koncentrációjának százalékában a BG9589-1 folyékony készítményforma tárolási idejének függvényében. A „4 °C” (betöltött négyszögek) jelű mintákat 2–8 °C között inkubáltuk. A többi mintát 25 °C-on (betöltött körök), 33 °C-on (betöltött háromszögek) és 40 °C-on (betöltött rombuszok) inkubáltuk.

3. ábra: A diagram a proteinkoncentrációt ábrázolja a kiindulási anyag koncentrációjának százalékában a BG9589-3 folyékony készítményforma tárolási idejének függvényében. A „4 °C” (betöltött négyszögek) jelű mintákat 2–8 °C között inkubáltuk. A többi mintát 25 °C-on (betöltött körök), 33 °C-on (betöltött háromszögek) és 40 °C-on (betöltött rombuszok) tároltuk.

A találmány a jelenlegi stratégiákkal és konstrukciókkal kapcsolatos problémákat és hátrányokat leküzd, és az interferon stabilizálására egy egyszerű eljárást és egy javított tárolási stabilitással rendelkező egyszerű interferonkészítmény-formát bocsát rendelkezésre. A találmány részben azon felismeréseinken alapul, miszerint

a) a béta-interferon különösen instabil, és aggregálódik amikor oxigénnel érintkezik, akár, amikor aktívan átbuborékol a folyadékon, akár, amikor statikusan érintkezik vele, például egy légtérben (head space);

b) a folyékony béta-interferonkészítmények, amelyekben nincs vívőanyag – például humán szérumalbumin – különösen hajlamosak üvegfelülethez adszorbeálódni (akár kémiai reakció, akár fizikai kötődés révén); és

c) a béta-interferon alacsony ionerő mellett aggregálódik, folyékony állapotban pedig ionos közege van szüksége a stabilitáshoz.

A találmány ezért humán béta-interferon stabilizálására szolgáló olyan eljárásokra vonatkozik, amelyek elkerülik ezeket a keletkezőket, és stabilizált béta-interferonból előállított folyékony készítményformákra.

A) Definíciók

A „puffer” kifejezés gyenge sav és egy só oldataira vonatkozik, amelyek a sav anionját tartalmazzák vagy egy gyenge bázis és sójának oldataira. Pontosabban, az „acetát” kifejezés – amikor ebben a leírásban használjuk (lásd még az 1. táblázatot) – egy olyan pufferrendszerre vonatkozik, amely előnyösen nátrium-acetátot és ecetsavat tartalmaz és a „foszfát” kifejezés egy olyan pufferrendszerre vonatkozik, amely előnyösen dinátrium-hidrogén-foszfátot (7 H₂O), illetve nátrium-dihidrogén-foszfátot (1 H₂O) tartalmaz. Ezenkívül a 2. táblázatban szereplő azon oldatokat, amelyek egy sa-

vas jellegű aminosavat tartalmaznak nátrium-hidroxiddal kombinálva, noha olyan értelemben nem tekintjük puffereknek, mint ahogy ez a kifejezés a szakterületen ismert, mégis ehhez a definícióhoz soroljuk.

A „vivőanyag” kifejezés minden olyan vegyületre vonatkozik, amelyeket a feldolgozás és/vagy tárolás alatt hozzáadunk egy folyékony készítményhez abból a célból, hogy megváltoztassuk a bulk tulajdonságait, növeljük stabilitását és/vagy beállítsuk ozmolalitását.

A „stabilizálószer” kifejezés egy olyan vívőanyagra vonatkozik, amely javítja vagy más módon fokozza a stabilitást.

A „stabilitás” kifejezésnek szükségből formai definíciója van, és az interferonaktivitás – például anti-virális aktivitás – és/vagy interferonstruktúra viszonylagos időbeli állandóságát jelenti.

A „kavitáció” („cavitated”) kifejezés bármilyen olyan folyékony interferonkészítmény-formára vonatkozik, amely nyomásváltozások vagy fizikai rázás miatt oxigént tartalmazó buborékokkal (például levegővel) érintkezett, legalábbis a termelés és tárolás folyamán. A „kavitáció” („cavitation”) kifejezés arra vonatkozik, hogy oxigéntartalmú gáz/folyadék határfelület képződött a folyékony interferonkészítmény-forma előállítás, tárolása és felhasználása néhány pontján. A „kavitáció” kifejezés azt is jelenti, hogy a folyékony interferonkészítmény-formákban az oldott oxigén-szintek túllépik a körülbelül 10%-os légtéri egyensúlyi értékeket olyan hőmérsékleteken, amelyek általában előfordulnak legalábbis az előállítás és tárolás folyamán.

A „parenterális” kifejezés ebben a leírásban magában foglalja a szubkután, intravénás, intramuszkuláris, iontraszternális, intraperitoneális, oftalmikus, intraspinális injekciós vagy infúziós technikákat.

A „gyógyszerészetileg elfogadható só” kifejezés minden olyan szerves vagy szervetlen hozzáadott sóra vonatkozik, amelyek viszonylag nem toxikusak, és betegre nézve ártalmatlanok olyan koncentrációkban, amelyek összhangban vannak az effektív aktivitással úgy, hogy a sónak tulajdonítható mellékhatások ne veszélyeztessék az interferon jótékony hatását.

Egy vegyület „hatásos mennyisége” az a mennyiség, amely eredményre vezet, vagy amely a kezelendő speciális állapotra befolyást gyakorol. Egy „hatásos mennyiség” azt is jelenti, hogy az antivirális aktivitásra végzett CPE-tesztben pozitív eredményt ad (azaz antivirális hatást fejt ki).

Az interferon „gyógyszerészetileg hatásos mennyisége” ebben a leírásban egy olyan szernek a koncentrációját jelenti (százalékban), amely az orvos- és gyógyszerésztudomány ismerete szerint speciális állapotok kezelésében biztonságos és hatásos.

A „vérrel izotóniás” (váltkozva az „izotonicitás” kifejezést is használják) kifejezés olyan folyékony interferonkészítményre vonatkozik, amelyben a komponensek koncentrációja elégséges ahhoz, hogy ozmotikus tulajdonsága lényegében azonos legyen a vérével, azaz a készítményformával érintkező sejtek megtartják alakjukat, és ozmózisnyomás következtében lényegében nem szenvednek el nettó víztranszportot.

A „poliionos szerkezetű” (váltakozva a „polielektrolit tulajdonságú” kifejezés is használatos) kifejezés egy olyan nagy molekulatömegű anyagra vonatkozik, amely, amennyiben a találmány szerinti készítményformákban használjuk, elektrolitként viselkedik, és maximalizálja az ionerőt egy adott ozmolalitáshoz. Ez a meghatározás azon alapul, hogy felismertük, miszerint a béta-interferont a magas ionerősség stabilizálja, ám-
bár az öszzionerőt behatárolja, hogy az oldatnak izotóniásnak kell lennie a vérrel (lásd a 7. példát). Az ionerő
adott ozmolalitás melletti maximalizálásának előnyös módja egy olyan vívőanyag használata, amely poli-
ionos szerkezetű.

Egy anyag, amely „inert az interferonra nézve” egy olyan anyagot jelent, amely legalább olyan tulajdonságú, hogy fizikailag és/vagy kémiailag nem reagál az interferonnal.

B) Interferonok előállítása

A találmány minden interferontípusra általában alkalmazható, beleértve a természetes interferont, a rekombináns DNS-technikával előállított interferont és a kémiai szintézissel vagy módosítással előállított interferont. A találmány fibroblasztokból, leukocitákból és limfocitákból származó, vagy emberi vagy bármilyen más megfelelő fajból származó interferontartalmú vagy interferontermelő szöveteredetű nyers, részlegesen tisztított és tisztított interferonra alkalmazható. A találmány a legelőnyösebben humán fibroblasztinterferonra (béta-interferonra) alkalmazható.

A legelőnyösebb béta-interferon a rekombináns forma. A proteinek – beleértve a különböző interferonokat – termelésére használt rekombináns DNS-technikák ismertek, és semmilyen módon nem korlátozzák a találmányt. Lásd például a 4,399,216, 5,149,636, 5,179,017 (Axel et al.), és 4,470,461 (Kaufman) számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat. A béta-interferon rekombináns technikával való termelése vonatkozásában lásd például: 0 42313 számú európai szabadalmi leírás (Fiers; béta-interferonexpresszió); 4,966,843 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (McCormick et al.; interferon expressziója CHO-sejtekben); 5,326,859 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (Sugano et al.; béta-interferonkódoló DNS). A béta-interferon akár rekombináns technikával, akár kémiailag módosítható és akár szérumtartalmú, akár szérummentes táptalajban termelhető. A béta-interferonformák variánsokat is magukban foglalnak, ilyenek a ciszteinre kimerített mutánsok [4,588,585 és 4,737,642 (Mark et al.) számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások] és a metioninra kimerített mutánsok (EP 260 350 számú európai szabadalmi leírás; Wang et al.). A protein elsődleges aminosavszekvenciája megnövelhető cukor-
részekkel (glikozilálás) végzett módosítással vagy más
kiegészítő molekulákkal. Egyéb módosulások mehet-
nek végbe a gazdasejt posztranszlációs feldolgozó-
rendszerei révén. A láncban lévő individuális amino-
savmaradékok tovább módosíthatók oxidációval, re-
dukcióval vagy másféle módosítással, és a protein el-

hasítható aktív fragmentumok előállítása céljából. Egy speciális rekombináns béta-interferon valódi kémiai szerkezete ennél fogva számos faktortól függ, és ez nem korlátozza a találmány oltalmi körét. Az itt leírt készítményekben felhasznált minden ilyen béta-interferonprotein megtartja bioaktivitását, amennyiben ezeket alkalmas környezeti feltételek közé helyezzük.

A rekombináns béta-interferontermelés egyik módszere szerint úgy járunk el, hogy humán béta-interferongénnel transzfektált kínaihörcsögpetefészek-
(CHO=Chinese hamster ovary) sejteket tenyésztünk. A CHO-sejtek, amelyek fetális borjúszérumot tartalmazó szuszpenziós állótenyészetben növekednek, rekombináns béta-interferont szekretálnak. A sejtek körülbelül 35 °C hőmérsékletű CO₂-inkubátorban (5% CO₂) elhelyezett hengeres palackokban is tenyésztethetők. Több hengeres palack tartalmát egyesíthetjük, és ezzel nagyméretű fermentorokat olthatunk be, amennyiben megkívánt a léptéknövelés. Egy adott fermentorban a tenyésztést körülbelül 6 napig folytatjuk, és ekkorra az aktív béta-interferontermék felszaporodik a táptalajban. A tenyészetet ezután learathatjuk, majd a sejteket eltávolítjuk a terméket tartalmazó táptalajból, például tangenciális folyadékszűréssel.

C) Interferonok tisztítása

Az interferontisztítási sémák jól kidolgozottak és rendelkezésre állnak a szakterületen átlagos gyakorlatilag rendelkezők számára. Ezek az eljárások magukban foglalnak egy- vagy többlépéses eljárásokat, beleértve a különböző kromatográfiás elválasztási lépéseket. Lásd például az 5,015,730 számú (Friesen et al.; affinitáskromatográfia és HPLC); a 4,541,952 számú (Hosoi et al.; kelátképzéses kromatográfia) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat.

Az egyik módszer például kihasználja a béta-interferonmolekula rendkívül hidrofób és viszonylag bázikus tulajdonságát, valamint erős affinitását a fémionok megkötéséhez. [Lásd például: Knight, Fahey: „Human Fibroblast Interferon, an Improved Purification”, J. Biol. Chem., 256, 3609–3611 (1981) és Edy et al.: „Purification of Human Fibroblast Interferon by Zinc Chelate Chromatography”, J. Biol. Chem., 232, 5934–5935 (1981); mindkét közleményt referenciának tekintjük].

Röviden összefoglalva: az izolálási és tisztítási lépések folyamán a béta-interferont egy sor Sepharose oszlophoz (Pharmacia Biotech) kötjük, majd sókkal és polialkohollal oldjuk ki. Mihelyt a végső Sepharose eluátumot felhígítottuk és alacsony pH-ra állítottuk, az oldatban lévő béta-interferon SP Sepharose-hoz (Pharmacia Biotech) kötődik. Az oszloptöltetben maradt proteinek sokkal bázikusabbak, mint a monomer béta-interferon, tehát sokkal szorosabban kötődnek az oszlophoz, mint az interferon. A béta-interferont ez az oszlop elválasztja a DNS-től és a vírusoktól. Az oszlopot ezután egy sorozat nátrium-klorid-tartalmú pufferrel mossuk.

Az interferonterméket most egy olyan kelátképző Sepharose oszlophoz (Pharmacia Biotech) kötjük, amelyre előzőleg cinket vittünk fel (lásd fentebb: Edy et

al.). Ezt az oszlopot oxigénmentes atmoszférában működtetjük, hogy a molekulában lévő szabad szulfhidrilcsoportot megvédje. Ugyanígy végezzük a további lépéseket is. A tisztított interferont megsavanyítjuk és alacsony pH-n tartjuk a visszamaradt vírusok inaktiválása végett. Semlegesítés után az interferont átszűrésel (cross flow filtration) koncentrálnak és a puffert semleges pufferoldatra cseréljük. A puffercsere csökkenti a cink és a szerves vegyületek koncentrációját. Ezután a bulk interferon $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolható a formulálási lépésekig.

D) Interferonok formulálása

A példaként fent leírt tisztítási eljárásban, és az első puffercsere után, egy második puffercserét indítunk el, kivételt képez, ha a semleges pufferoldatot egy olyan pH 4 és 7,2 közötti pufferrel helyettesítettük, amely stabilizálószeret tartalmaz. Részletesebb leírását lásd alább. A kapott interferontartalmú készítményt „gyártásközi termék”-nek („process intermediate”) nevezzük és lefagyaszttva tároljuk. Lásd a 7. példát.

Amennyiben fagyaszttott állapotban tároljuk az inerferont (inert gáz – ilyen az argon vagy a nitrogén – atmoszféra alatt), felolvaszthatjuk, majd átnyomhatjuk 0,22 mikronos szűrőn egy kitáralt edénybe, előnyösen rozsdamentes acéledénybe, amelyben a gyártásközi termékhez egy előzőleg szűréssel sterilizált oldószerből annyit adunk, ameddig a kívánt végterméksúlyt el nem érjük. Az oldószer azonos azzal a pufferrel, amelyet a második puffercseréhez használtunk, a folyékony végterméket ezután szűréssel sterilizáljuk – aszeptikus körülmények melletti eljárásokkal, például sorba kötött két 0,22 mikronos szűrő használatával – és egy zárt edénybe töltjük le, előnyösen olyan rozsdamentes edénybe, amely az inert gáz számára egy bemeneti nyílással, egy gáztalanító szelep/szűrő kombinációval és egy befolyó/kifolyó bemezőcsővel van ellátva. A végterméket benyomatjuk a bemezőcsőön keresztül a zárt edénybe. Inert gáz, például nitrogén használatával, nyomással szállítjuk a végterméket egy olyan készülékhez – a szivattyúfejhez – amely alkalmas steril fecskendőket aszeptikus töltésére.

Steril fecskendőket aszeptikus töltéséhez több módszer áll rendelkezésre, és a használt speciális módszerrel nem szándékozunk korlátozni a találmány oltalmi körét. Az egyik módszer szerint például egy HYPAK autoklávozható fecskendőtöltő készüléket (Becton Dickinson Pharmaceutical Systems, Franklin Lakes, NJ) használunk. A fecskendőket hegyükre helyezett sapkával autoklávozzuk. Az ilyen típusú készülék általában magában foglal egy vákuumkamrát, amely az interferonkészítménnyel megtöltendő fecskendőket tartalmazza. A kamrát aszeptikus környezetben helyezük el. Minden fecskendő nyitott végével függőlegesen helyezkedik el a kamrában, és egy dugattyúszárral vannak párosítva, amely a fecskendőhenger nyitott végébe illik. A szár úgy van szerkesztve, hogy záróelemet vigyen be a hengerbe, hogy a folyadékot belül tartsa. A behelyezés után egy kis légtér (head space) marad a fecskendőben. A kamrát evakuáljuk és inert, oxigén-

mentes gázzal (például: argon, nitrogén) többször visszaöblítjük, és ha a végső vákuumot elérjük, a szarakat egy rövid távolságra mechanikusan betoljuk a nyitott fecskendőhengerbe, és a záróelemek automatikusan bejutnak a megfelelő fecskendőbe. A kamrát ezután szűrt levegővel szellőztetjük át, hogy a kamrán belüli nyomás újra elérje az atmoszferikus szinteket. A vákuum nagysága határozza meg az inert gázt tartalmazó légtér méretét.

Az általánosan használt speciális rendszerben a fecskendők függőleges helyzetűek és egy forgótányéron lévő fog tartja őket ebben a helyzetben. A fecskendők először egy tű alá kerülnek, amely behatol a fecskendőbe. A tű inert gázzal (például: argon, nitrogén) tölti meg a fecskendő belsejét. A tű ezután visszahúzódik a fecskendőből. A fecskendő ezután egy második tű alá helyeződik, amely behatol a fecskendőbe. Ez a tű egy olyan szivattyúhoz kapcsolódik, amely a terméket a fecskendőbe tölti. A második tű ezután visszahúzódik a fecskendőből. A fecskendő ezután egy harmadik tű alá kerül, amely behatol a fecskendőbe. A dugattyút (előzőleg autoklávozva) ezután inert, oxigénmentes gázzal (például nitrogénnel vagy argonnal) nyomjuk be a fecskendőbe, majd a tű visszahúzódik a fecskendőből. A dugattyú úgy helyezkedik el, hogy inertgáz-tér maradjon a folyadék teteje és a dugattyú alja között.

1. Vívőanyag

Előnyös, ha a vívőanyag egy poliionos anyag, amely maximalizálja az ionerőt egy adott ozmolalítás mellett, például ilyen egy polielektrolit, amely heparint vagy más polimerféleséget is tartalmazhat. Amint ezt a 4. példában megtárgyaljuk, a béta-interferont a magas ionerő stabilizálja, de az összionerőnek határt szab, hogy az oldatnak a vérrel izotóniásnak kell lennie. Ezért egy adott ozmolalításnál az ionerő maximalizálásának előnyös útja egy poliionos anyag használata. A találmány szerinti béta-interferonoldatok a vérrel izotóniásak (körülbelül 290 milliozmol/kg).

A találmány számára legelőnyösebb stabilizálószer egy olyan aminosav, amely bármelyik savas jelleget, vagy egy olyan aminosav, amelyet az arginin és glicin közül választunk ki. A legelőnyösebb aminosav-stabilizálószer az arginin, amelynek savas jellegű formáját (arginin.HCl) használjuk pH 5,0 oldatokban. Előnyös a savas jellegű L-glutaminsav is. Anélkül, hogy bármelyik elmélethez kívánnánk csatlakozni, tény, hogy a poliionos vívőanyagokat részesítik előnyben, és ennek valószínűleg az az oka, hogy az arginin és a lizin (három töltéssel rendelkező csoportot tartalmaznak) jobban stabilizálja az interferont, mint a glicin (két töltött csoporttal rendelkezik, másfelől azonban jobban stabilizál, mint bármelyik vizsgált, töltés nélküli anyag).

Amennyiben a vívőanyag arginin.HCl, koncentrációja 0,5–5% (tömeg/térf.) között lehet és a legelőnyösebb koncentráció a 3,13% (150 mM arginin.HCl-nak felel meg). Amennyiben a vívőanyag glicin, koncentrációja 0,5–2% (tömeg/térf.) között lehet, a legelőnyö-

sebb koncentrációja pedig 0,52% (azaz 66,7 mM és 266,4 mM között és legelőnyösebben 70 mM). Ha a vívíóanyag glutaminsav, koncentrációját 100 mM és 200 mM közé állítjuk be. A legelőnyösebb koncentrációja 170 mM (azaz 1,47%-tól 2,94%-ig (tömeg/térf.)

Folyékony béta-interferonkészítmény-formák stabilizálószerüként különböző vívíóanyagokat analizáltunk a következő pufferrendszer alkalmazva: 50 mM nátrium-acetát és jégecet 100 mM nátrium-kloriddal kombinálva (pH 5,0). A folyékony interferonmintákat vagy hővel terheltük 37 °C-on 1–3 héten át, vagy 1–3 napig rotátorra helyezve, mechanikai terhelésnek tettük ki. A kezelt mintákat a béta-interferon stabilitására nézve teszteltük, mégpedig az 1. példában leírt módszerekkel. Mint a 7. példában részletesebben leírjuk, azok a készítmények mutatták a legjobb stabilitást, amelyeket pH 5,0 mellett aminosav vívíóanyagot (adott esetben nátrium-klorid-tartalommal) tartalmazó nátrium-acetát-pufferoltunk.

2. Az interferon

Előnyös interferon a fibroblaszt béta-interferon, a legelőnyösebb az emlőssejtek által termelt rekombináns humán interferon. A rekombináns humán béta-interferon egy szabad szulfhidrilcsoportot és legalább egy diszulfidkötést tartalmazhat. Egy különösen kedvelt molekula egy szabad szulfhidrilcsoportot tartalmaz a 17. pozícióban és molekulánként egy diszulfidkötést a 31. és 141. pozíció között. Ismeretes, hogy a természetes humán IFN β esetében N-glikoziláció fordul elő az Asn-80-nál. A találmány szerinti folyékony készítményformák koncentrációtartománya körülbelül 30 μ g/ml-től körülbelül 250 μ g/ml-ig terjed. Az előnyös koncentrációtartomány 48–78 μ g/ml közé esik, és a legelőnyösebb koncentráció körülbelül 60 μ g/ml. A nemzetközi Standardértékekkel kapcsolatos kikötés szerint a Biogen belső standardot a Világégeszségügyi Szervezet nemzetközi interferonstandardjához (WHO International Standard for Interferon; természetes Gb-23-902-531) standardizáltuk úgy, hogy a koncentrációtartomány IU-ban (nemzetközi egység) kifejezve (0,5 ml injekció-térfogatra) körülbelül 6 MIU-tól 50 MIU-ig terjed és a legelőnyösebb koncentráció a 12 MIU.

3. Puffer

A találmány szerint használandó szerves sav és foszfát-pufferek – amelyek a pH-t körülbelül 4,0–7,2 tartományban, előnyösen körülbelül 4,5–5,5 tartományban, a legelőnyösebben pedig pH 5,0-en tartják – hagyományos, szerves savakból és ezek sóiból készített pufferek lehetnek. Ilyenek a citrát-pufferek (például: mononátrium-citrát – dinátrium-citrát keverék; citromsav – trinátrium-citrát keverék; stb.), szukcinát-pufferek (például: borostyánkősav – mononátrium-szukcinát keverék; borostyánkősav – nátrium-hidroxid keverék; borostyánkősav – dinátrium-szukcinát keverék stb.), tartarát-pufferek (például: bórkősav – nátrium-tartarát keverék; bórkősav – kálium-tartarát keverék; bórkősav – nátrium-hidroxid keverék; stb.), fumarát-pufferek (például: fumársav – mononátrium-fumarát keverék; fumársav –

dinátrium-fumarát keverék; mononátrium-fumarát – dinátrium-fumarát keverék; stb.), glükonát-pufferek (például: glükonsav – nátrium-glükonát keverék; glükonsav – nátrium-hidroxid keverék; glükonsav – kálium-glükonát keverék; stb.), oxalát-pufferek (például: oxálsav – nátrium-oxalát keverék; oxálsav – nátrium-hidroxid keverék; oxálsav – kálium-oxalát keverék; stb.), laktát-pufferek (például: tejsav – nátrium-laktát keverék; tejsav – nátrium-hidroxid keverék; tejsav – kálium-laktát keverék; stb.), foszfát-pufferek (például: egybázisú nátrium-foszfát/kétfázisú nátrium-foszfát) és acetát-pufferek (például: ecetsav – nátrium-acetát keverék; ecetsav – nátrium-hidroxid keverék; stb.).

Az alábbi példákban különböző pufferkoncentrációkat használunk és különböző pH-értékű nátrium-foszfát-, nátrium-citrát-, nátrium-szukcinát-, nátrium-karbonát- és nátrium-acetát-puffereket alkalmazunk a legmegfelelőbb puffer meghatározása érdekében. A béta-interferonmintákat vagy 37 °C-ra helyezzük 6 naptól 20 2 hétig, vagy rotátorra helyezzük 7–9 órára, hogy sietessük a degradációs folyamatokat. Ezután meghatározzuk a minták kémiai tulajdonságait. A minták vizsgálatát optikai sűrűségmegtározással, peptidterképezéssel, méretkizárásos HPLC-vel, redukáló és nemredukáló SDS-PAGE/Western-blot analízissel és izoelektromos fókuszálás/Western-blot analízissel (IEF) végezzük. A vizsgálatok leírását alább, az 1. példa tartalmazza. Minden kísérleti béta-interferonmintát a kiindulási béta-interferonanyaggal vagy a 2–8 °C közé helyezett béta-interferonmintákkal hasonlítottuk össze. Adataink azt mutatták, hogy a pH a legfontosabb faktor, amely meghatározza a béta-interferonminták stabilitását és hogy a minták pH 4,0–5,0 között stabilabbak, mint pH 7,0-en, vagy ennél magasabb pH-n. Mindazonáltal számos béta-interferonkészítmény-formát tudunk kidolgozni fiziológiás pH (pH 7,2) mellett is. Lásd a 6. példát.

4. Kavitáció

Magas pH-n (pH >8,0) a béta-interferonban a legtöbb szabad szulfhidrilcsoport oxidálódik. Ezen a pH-n a diszulfidkötések átrendeződnek. Bulk közti termékekben a béta-interferon némi aggregálódását mutatuk ki méretkizárásos kromatográfiával, nemredukáló SDS-PAGE módszerrel és lézerefényviszós módszerrel. Ezután észrevettük, hogy az aggregált béta-interferon képződése valószínűleg az oldottoxigén-szintjétől függ. Kidolgoztuk az eljárás azon kritériumait, amelyek biztosítják, hogy a folyékony interferonkészítmény-formákban ne forduljon elő kavitáció, és pedig: a) ha lehetséges, ne legyen jelen oxigéntartalmú gáz/folyadék határfelület az előállítás és tárolás folyamán; és/vagy b) ne képződjenek buborékok az előállítás és tárolás alatt; és/vagy c) a készítményformákban az oldottoxigén-szinteket az atmoszferikus egyensúlyi helyzet 10%-a alatt kell tartani az előállítás és tárolás hőmérséklete mellett. Lásd a 3. példát.

5. Az interferon adszorpciója felületekhez

Azt is megállapítottuk, hogy az interferon bizonyos felületekhez adszorbeálódik, és amennyiben üveg-edényben tartjuk, az edénynek legalább azt a felületét,

amely az interferonnal érintkezik, be kell vonni vagy valahogyan be kell fedni egy olyan anyaggal, amely megátolja vagy lényegében kiküszöböli az adszorpciót. Ez a felület az adszorpcióval szemben vagy kémiailag, vagy fizikailag lehet inert. Az erre a célra szolgáló anyagokat a szakterületen jártas szakemberek ismerik. Ilyenek például a porlasztott vagy égetett szilikon, poli-propilén vagy poli(tetrafluor-etilén) (PTFE). Az általunk előnyösnek tartott 60 µg/ml-es folyékony készítményformákat (BG9589-1, 2, 3 és 4; lásd alább az 1. táblázatot) 1 ml-es I típusú üvegből készített, porlasztott szilikonnal (Becton Dickinson) bevont fecskendőbe és 0,75 ml-es I típusú üvegfialákba töltöttük le. A mintákat ezután reverz fázisú HPLC-vel (rpHPLC) analizáltuk proteinkoncentráció meghatározás céljából. Az adatok azt mutatták, hogy kevesebb protein volt oldatban azokban a mintákban, amelyeket az üvegfialákba töltöttünk, mint a szilikonnal bevont, letöltött fecskendőkben. Lásd az 5. példát.

6. Előnyös készítményformák

Elvégeztük a protein stabilitásának kinetikai vizsgálatát. Erre a célra négy folyékony készítményt használtunk, ezek végső koncentrációit az alábbi 1. táblázat tartalmazza. Mindegyik készítmény 60 µg/ml béta-interferont tartalmazott. A 2. táblázatban egyéb módon formulált készítményeket ismertetünk, amelyek közül néhány például Pluronic F-68-at (gyártja: BASF) tartalmaz felületaktív anyagként.

1. táblázat

pH-rendszer	Vivőanyag	Végső pH
20 mM acetát	150 mM arginin.HCl	5,0 („BG9589-1”)
20 mM acetát	70 mM glicin 100 mM nátrium-klorid	5,0 („BG9589-2”)
20 mM foszfát	140 mM arginin.HCl	5,0 („BG9589-3”)
20 mM foszfát	70 mM glicin 100 mM nátrium-klorid	5,0 („BG9589-4”)

A) készítményformák alkotórészei USP-minőségű anyagok. A részletes összetételt lásd alább.

BG9589-1

Alkotórész (alapanyag)	Mennyiség
Arginin.HCl, USP	15,8 mg
Jégecet, USP	0,167 mg
Nátrium-acetát-víz (1/3), USP	0,972 mg
Béta-interferon-1a	30 µg
Injekcióhoz való víz, USP	0,5 ml

BG9589-2

Alkotórész (alapanyag)	Mennyiség
Glicin, USP	2,628 mg
Jégecet, USP	0,185 mg
Nátrium-acetát – víz (1/3), USP	0,932 mg
Béta-interferon-1a	30 µg
Injekcióhoz való víz, USP	0,5 ml
Nátrium-klorid	2,922 mg

BG9589-3

Alkotórész (alapanyag)	Mennyiség
Arginin.HCl, USP	14,725 mg
Dinátrium-hidrogén-foszfát – víz (1/7)	2,332 mg
5 Nátrium-dihidrogén-foszfát – víz (1/1)	0,359 mg
Béta-interferon-1a	30 µg
Injekcióhoz való víz, USP	0,5 ml

BG9589-4

Alkotórész (alapanyag)	Mennyiség
10 Dinátrium-hidrogén-foszfát – víz (1/7)	1,984 mg
Nátrium-dihidrogén-foszfát – víz (1/1)	0,359 mg
Béta-interferon-1a	30 µg
Glicin	2,628 mg
Nátrium-klorid	2,922 mg
15 Injekcióhoz való víz, USP	0,5 ml

2. táblázat
Alternatív készítményformák

	pH-rendszer	Vivőanyag	Végső pH
20	20 mM acetát	150 mM arginin.HCl és 15 mg/ml humán szérumalbumin	5,0
25	20 mM acetát	150 mM arginin-HCl és 0,1% Pluronic F-68	5,0
30	20 mM acetát	140 mM nátrium-klorid	5,0
	20 mM acetát	15 mg/ml humán szérumalbumin 140 mM nátrium-klorid	5,0
35	20 mM acetát	0,1% Pluronic F-68 140 mM nátrium-klorid	5,0
40	170 mM L-glutaminsav, 150 mM nátrium-hidroxid	15 mg/ml humán szérumalbumin	5,0
45	170 mM L-glutaminsav, 150 mM nátrium-hidroxid	0,1% Pluronic F-68	5,0

A találmány szerinti készítményformákba más anyagokat is bevihetünk. Ilyenek lehetnek például a következő konzerválószer (az előnyös százalékok tömeg/térf.%-ot jelentenek): fenol (körülbelül 0,2%); metil-parabén (0,08%); propil-parabén (0,008%); m-krezol (0,1%); klór-butanol (0,25%); benzil-alkohol (0,1%); Thimerosal (0,1%). A proteinaggregáció és -dezaminálás meghatározására szolgáló analízisre alapozva (az adatokat nem közöltük), a legelőnyösebb konzerválószer a klór-butanol és a benzil-alkohol.

7. Készletek parenterális alkalmazáshoz

A találmány előnyös kiviteli alakjai a folyékony készítményformák parenterális alkalmazásához csomagolt készletet tartalmaznak. A csomag a következőket

tartalmazhatja: a találmány szerinti folyékony készítményformákkal előre megtöltött fecskendőket, több alkoholos tampont, legalább egy tűt, egy vagy több tapadó kötszert és használati utasítást. Értékelendő az is, hogy a találmány szerinti folyékony készítményformák a hagyományos kevés tűt igénylő rendszerekben használhatók.

E) interferonok alkalmazása

A találmány szerinti interferonkészítmények antivirális aktivitással rendelkeznek. Lásd a 7. példát. Ami a klinikai használatot illeti, az interferon mennyisége, amelyet bármilyen speciális esetben beadnak, valamint az interferon alkalmazásának gyakorisága bizonyos faktoroktól függ, mégpedig a használt interferon típusától, a kezelendő betegségtől és a beteg interferonkezelésre adott válaszával.

A folyékony interferonkészítményeket előnyösen használják súlyosbodó szklerózis multiplex kezelésére. A természetes béta-interferon és a rekombináns béta-interferon liofilizált folyékony (azaz feloldott) formáit olyan betegeknek alkalmazzák, akik súlyosbodó szklerózis multiplexből szenvedtek. [Jacobs et al., *Annals of Neurology*, 39, 285–294 (1966); lásd a cikkben idézett referenciákat; Jacobs és Munschauer: „Treatment of multiple sclerosis with interferon” című fejezet (223–250 old.) a „Treatment of multiple sclerosis: trial design results and future perspectives” című kiadványban (szerk.: R. A. Rudnick et al.) London; Springer (1992)]. A szklerózis multiplex kezelésére a jelen találmányban leírt folyékony készítményformák használata ugyanazokat a kezelési módokat és rendszabályokat követi, ugyanazon primer következményváltozatokkal, mint amelyeket Jacobs és munkatársai közleményükben (lásd fent) leírtak.

A találmány szerinti folyékony készítményformák használhatóságának meghatározása végett toxikológiai vizsgálatokat végeztünk a folyékony készítményforma alkalmazásához társult szövetiirritáció megállapítására. A találmány szerinti folyékony készítményformák toxikológiai vizsgálatát nyulakon végeztük. Lásd a 8. példát.

Az alábbi példákat a találmány kiviteli alakjainak szemléltetésére szánjuk, és nem úgy tekintendők, mint amelyek korlátoznák a találmány oltalmi körét.

1. példa

Vizsgáló módszerek

Számos jól ellenőrzött módszert használtunk, hogy folyékony készítményformáinkban meghatározzuk a béta-interferon fizikokémiai tulajdonságait. Ezek a módszerek más interferonok tulajdonságainak monitorozására is használhatók.

Az oldhatatlan aggregátumok jelenlétét/hiányát abszorpcióméréssel – 320 nm-en – és fényáteresztési méréssel – 580 nm-en – monitoroztuk. Az oldott proteinkoncentrációját vagy abszorpcióméréssel, 278–280 nm-en (extinkciós koefficiens: 1,5), vagy reverz fázisú nagy teljesítményű folyadékromatográfiával (HPLC) határoztuk meg, standardként a formulá-

láshoz használt pufferben oldott béta-interferon ismert koncentrációit használtuk. A folyékony készítményformák mintáit a vizsgálat előtt lecentrifugáltuk. Az oldható aggregátum százalékát úgy határoztuk meg, hogy az aggregátumokat méretkizárásos kromatográfiával – TSK-val G2000SWXL oszlop (Toso Haas, Montgomeryville, PA) – választottuk el a béta-interferonmonomertől. A 280 nm-nél kapott csúcsokat használtuk az oldható aggregátum százalékának kiszámításához.

A peptidgerinc stabilitását nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) bizonyítottuk. A béta-interferont merkaptó-etanolal redukáltuk nátrium-dodecil-szulfát jelenlétében, a 10–20%-os gradiéngélben (MiniPlus Sepragel, Integrated Separation Systems, Natick, MA) végzett elektroforézis előtt. A proteineket ezután elektroforetikus úton nitrocellulóz membránra vittük át, majd immunológiai kimutatást végeztünk antibéta-interferon-antitest és torna-peroxidázzal konjugált kecske-antigén antitest használatával. Lásd például: *Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach*, 2. kiadás; B. D. Hames, D. Rickwood, IRL Press.

Az effektív felületi töltésváltozást, amelyet dezamidáció és más kémiai változások okoznak, poliakrilamid gélen izoelektromos fókuszálással (IEF 3–10 MiniPlus Sepragel, Integrated Separation Systems) monitoroztuk (lásd: *Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach*).

A mentionin oxidációját, az aszparaginsav dezamidációját és az egyéb lehetséges kémiai változásokat is monitoroztuk, és pedig peptidterképezéssel. A béta-interferont Endoproteinase Lys-C-vel (Wako Pure Chemicals) emésztettük ditiotreitol jelenlétében, és a kapott peptidfragmentumokat reverz fázisú HPLC-vel választottuk el. Lásd általánosságban: K. Kalgahgi, C. Horvath: „Rapid Peptide Mapping by High Performance Liquid Chromatography”, *J. Chromatography*, 443, 343–354 (1988).

Az N-en kötött oligoszacharidprofil Fluorophore-Assisted-Carbohydrate-Electrophoresis (FACE) rendszerrel (Glyco, Inc., Novato, CA) határoztuk meg. Az aszparaginon kötött (N-en kötött) oligoszacharidokat Peptide N-glycosidase F enzimmel szabadítottuk fel a glükoproteinekből, ezután fluoroforral jeleztük a redukálóségeken redukív aminálással, majd poliakrilamid gélen végeztük az elválasztást és a mennyiségi meghatározást.

Az interferonok antivirális aktivitását többféle módszerrel határozzák meg. Ezek részletesebb leírását lásd W. E. Stewart, *The Interferon System* (Springer Verlag, 2. kiadás, 1981) című kiadványban. A Cytopathic Effect Inhibition Assay (CPE; citopátiás hatás gátlási vizsgálat) különösen jól használható az interferon antivirális aktivitásának meghatározására. Az általunk előnyben részesített módszer a WHO Technical Report Series No. 725 (Annex 1, 1985) füzetben van leírva, amelyet referenciának tekintünk. Röviden összefoglalva: a CPE-módszer azzal indul, hogy béta-interferon házi standard törzsoldatot készítünk, amelyet előzőleg

a WHO-referenciastandardhoz kalibráltunk. A törzsol-
datot, amelynek a koncentrációja 10 000 E/ml, 10%
magzati marhaszérumot és 4 mM L-glutamint tartalma-
zó D-MEM+ táptalajban készítjük el. A vizsgálat napján
a standardot, a kontrollt és a mintákat D-MEM+ tápta-
lajjal hígítjuk, 3 külön hígítási sorozatban:

a) 32 E/ml-rel kezdünk és 2-szeres hígításokkal
folytatjuk;

b) 12 E/ml-rel kezdünk és 1,5-szeres hígításokkal
folytatjuk;

c) 6 E/ml-rel kezdünk és 1,2-szeres hígításokkal
folytatjuk.

A hígításokból 50 µl-eket mérünk be 96 tartályos
mikrotitrálólemezek tartályoszlopaiba. Hígítási sorozat-
tonként egy lemezt használunk. Ezután A549 sejteket
(ATCC katalógusszám: CCL-185, Rockville, MD) –
D-MEM+ táptalajban 5×10^5 sejt/ml – mérünk minden
tartályba. A bemért mennyiség tartályonként 50 µl,
amely mind a sejteket, mint a béta-interferont kétszere-
sére hígítja. A sejteket és az interferont 37 °C-on inku-
báljuk 5% szén-dioxidban, 15–20 órán át. A lemezek
tartalmát fertőtlenítő vödörbe rázzuk és a tartályokhoz
hozzáadunk táptalajjal megfelelően hígított 100 µl EMC
(encephalomyo-carditis)-vírust. A vírust és a sejteket
37 °C-on 5% szén-dioxidban inkubáljuk 30 órán át.
A lemezek tartalmát fertőtlenítővödörbe rázzuk, majd a
lemezekhez 0,75%-os kristályibolya festéket adunk.
Öt-tíz perc múlva a lemezeket desztillált vízzel mossuk
és hagyjuk megszáradni. Minden egyes lemez tartal-
maz sejtnevekedést kontrolláló tartályokat, amelyek
sem interferont, sem EMC-t nem tartalmaznak, továb-
bá vírus-kontrolltartályokat, amelyek EMC-t és sejteket
tartalmaznak, de interferont nem, valamint interferons-
tandard hígítási sort. A lemezeket vizuálisan olvassuk
le, hogy meghatározzuk minden oszlopban az élő sej-
teket tartalmazó utolsó tartályt (>25% összefolyt bíbor
festődés). A kimutatási határt a standardnak az a leg-
alacsonyabb koncentrációja határozza meg, amely véd
a vírus citotoxicitásától. Az utolsó pozitív tartályban
lévő minta hígítását megszorozzuk a standardra meg-
határozott kimutatásihatár-koncentrációval és a minta
hígítási faktorával, és így megkapjuk a minta interfero-
naktivitását (MU/ml). A geometriai középérték meg-
határozásához és a 95%-os konfidenciaintervallumok ki-
számításához az egyes lemezekon kapott eredményeket
logaritmikus egységekre számítjuk át.

2. példa

A pufferrendszer kiválasztása

Három pufferkészletet készítettünk, mindegyik
9-10 különböző alkotórészt tartalmazott. Az I készlet
egy sorozat nátrium-foszfát és/vagy 100 mM ná-
trium-klorid-oldatot tartalmazott, pH 4,0–7,2 között. A II
készlet nátrium-citrát puffersorozatot tartalmazott pH
4,0–7,0 között. A III készlet nátrium-szukcinát-ná-
trium-acetát és nátrium-karbonát pufferoldat-sorozatot
tartalmazott 100 mM nátrium-kloriddal kombinálva, a
pH-értékek 4,0-től 7,2-ig terjedtek. Két másik oldatban
a nátrium-kloridot 50 mM nátrium-szulfáttal helyettesít-
tük, és az oldatok pH-ja 4,0 és 7,2 volt.

A felolvasztott béta-interferon bulk-ot a különböző
pufferekkel dializáltuk egy éjszakán át 2–8 °C-on, leg-
alább kétszeri puffercserével, majd használat előtt ste-
rilre szűrtük az oldatot. A proteinkoncentrációkat a
278 nm-en mért abszorpcióval (extinkciós koeficiens:
 $1,5 \text{ mg}^{-1} \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-1}$) határoztuk meg. Minden minta
140 µg/ml vagy 150 µg/ml béta-interferont tartalmazott.
A mintákat megszürtük és négy készletre osztottuk
úgy, hogy 2,2 ml-es Eppendorf-csővekbe töltöttük (a
csöveket nem töltöttük tele). Az egyik készletet
2–8 °C-ra helyeztük; a másikat 37 °C-on tartottuk
6 naptól 2 hétig, a harmadikat rotátorra helyeztük
7–9 óra hosszat, az utolsó készletet zéróidő-kontroll-
nak használtuk. Az oldhatatlan aggregátumoknak tulaj-
donítható proteinvesztés százalékát úgy számítottuk
ki, hogy a különböző kezeléseket folytán bekövetkező
proteinkoncentráció-vesztéséget elosztottuk a kiindulá-
si koncentrációval.

Eredmények

Az oldhatatlan aggregátumok miatt bekövetkezett
proteinvesztés százalékát úgy számítottuk ki, hogy a
proteinkoncentráció-vesztéséget elosztottuk a kiindulá-
si proteinkoncentrációval. Az összes adat statisztikai
analízise azt mutatta, hogy a pH 4,0 és 5,0 pufferekkel
készített interferonmintákban az aggregáció miatti pro-
teinvesztés százaléka alacsonyabb, mint a maga-
sabb pH-értékű mintáké. A 37 °C-on inkubált interfe-
ronmintákban – pH 4,0 és 5,0 mellett – az aggregáció
miatti vesztés körülbelül 10–15% között volt; 6,0-nál
magasabb pH-értékek mellett a vesztések
40–50%-ra nőttek. Kimutattuk, hogy az interferonmin-
tákban 6,0-nál magasabb pH-értékek mellett több az
oldható aggregátum. Ezenfelül peptidterképezéssel
meghatároztuk, hogy ahogyan a pH-t 4,0-től 7,2-ig nö-
veljük, lényegében lineárisan növekszik a dezamidált
interferon mennyisége is; pH 7,0-en és magasabb
pH-n az interferon több, mint 85%-a dezamidálódott a
vizsgálat során. A mintákban lévő proteinfajta izoelekt-
romos pontját (pI; azaz azt a pH-t, amely mellett a pro-
tein nem vándorol elektromos térben és a proteinen a
töltés középértéke zéró) IEF/Western-blot módszerrel
mértük. A blotok azt mutatták, hogy a nátrium-citrátos
mintákban extra pI sávok vannak, és hogy a ná-
trium-szukcinátos mintákban a sávintenzitás eltolódott.
A foszfátnak nem volt pufferkapacitása pH 5,0-ön.
A nátrium-acetát nátrium-kloriddal pH 5,0 mellett nem
mutatott változást a sávmintázatban vagy sávintenzi-
tásban.

3. példa

A kavitáció hatása

A 2. példában leírt pH-változtatási kísérlet folyamán
felfedeztük, hogy a tárolt csövekben lévő légtér lénye-
gesnek tűnt néhány mintában a proteinvesztés
szempontjából. Amikor a 2,2 ml-es csövek 1,5 ml min-
tát tartalmaztak, nem észleltünk proteinvesztéséget.
Ezzel szemben az 1,2 ml-es töltés jelentős aggregá-
tumnövekedést okozott. Ez egybevág azokkal a megfi-
gyeléseinkkel, miszerint a tisztítási eljáráskor végzett
virusinaktiválási lépés alatt az aggregált béta-interfe-

ronképződés az ezen lépés folyamán oldottoxigén-szintjétől függ.

Röviden összefoglalva: a vírusinaktiválási lépésben a kelátképző Sepharose eluátum pH-ját (lásd a C fejezetet) 7,85 ($\pm 0,25$)-ről 2,5–3,5-re állítjuk be 5 15%-os foszforsavval, a megsavanyított eluátumot 120–135 percig ezen a pH-n tartjuk és ezután 0,5 n nátrium-hidroxiddal visszaállítjuk a pH-t 6,7 ($\pm 0,7$)-re. Ezeket a lépéseket 2–8 °C-on végezzük. Megtervezünk egy vizsgálatot annak meghatározására, hogy 10 van-e összefüggés a béta-interferon aggregátumképződés és az oldott oxigén mennyisége között ebben a lépésben.

Anyagok és módszerek

A kelátképző Sepharose oszlopról kapott eluátumot 50 ml-enként vagy 100 ml-enként 100 ml-es hengeres palackokba osztottuk el. A palackokhoz 1 ml, argonnal kevert, 15%-os foszforsavat adtunk. A palackokat ezután 2 percig enyhén kevertettük, majd keverés nélkül 2 órán át 2–8 °C-on tartottuk. Ezt követően a palackokhoz 6,5 ml argonnal kevert nátrium-hidroxidot adtunk, majd a mintákat méretkizárásos kromatográfiával analizáltuk különböző időpontokban. A folyadékban oldott oxigént egy oxigénszondával (Orion, Model 860) folyamatosan mértük és a bázis hozzáadásakor regisztráltuk. Azokban a mintákban, amelyekben az oldott oxigén szintje 10% volt, vagy kevesebb, az argongáz átseperete a reakcióedény légtérét.

Eredmények

Az adatok, amelyeket az 1. ábrán mutattunk be, világos összefüggést mutatnak a nátrium-hidroxid hozzáadásának időpontjában jelen lévő oldott oxigén és a béta-interferonmonomer kihozatala között a vírusinaktiválási lépés folyamán. A 10%, vagy ennél alacsonyabb oldottoxigén-koncentrációnál kapott kihozatali értékek jelentősen eltértek minden más olyan kihozataltól, amelyet más oxigénkoncentrációnál kaptunk. Az aggregátumot is vizsgáltuk (ezeket az adatokat itt nem közöljük) és megállapítottuk, hogy specifikus aktivitása 30–40-szeresére csökkent a bulk közti termékhez képest. Meghatároztuk, hogy az aggregátum több, mint körülbelül 90%-a rezisztens az SDS denaturáló hatásával szemben, nemredukáló körülmények mellett, ami kovalens keresztkötésre enged következtetni. Redukáló körülmények mellett (2% béta-merkaptó-etanol) az aggregátum a monomerhez közelít, és ez diszulfidkötéseket tartalmazó keresztkötést feltételez.

4. példa

Vivőanyag kiválasztása

Készítettünk egy sor béta-interferon (60 $\mu\text{g/ml}$) készítményformát különböző vivőanyagokkal egy előnyös pH 5,0 pufferben, amely 50 mM nátrium-acetátot és 100 mM nátrium-kloridot tartalmazott. A vivőanyagok glicint, arginin.HCl-ot, lizin.HCl-ot, szacharózt, glicerin, PEG3350-et, glutationt és Pluronic F–68-at tartalmaztak. A béta-interferon bulk közti terméket 50 mM nátrium-acetátot és 100 mM nátrium-kloridot tartalmazó oldatban (pH 5,0) dializáltuk egy éjszakán át 2–8 °C-on, legalább kétszeri puffercserével, majd

használat előtt megszürtük. A béta-interferonkoncentrációkat a 278 nm-en mért abszorpcióból – a háttér levonásával – határoztuk meg. A mintákat a végső interferonkoncentrációra – körülbelül 60 $\mu\text{g/ml}$ – hígítottuk.

Az elkészített mintákat megszürtük, 2 ml-enként 4 ml-es üvegfialákba (nem szilikonozott) töltöttük, a légtérrel argonnal seprítettük ki és a fialákat lezártuk. A minták egy részét 2–8 °C-ra és 37 °C-ra helyeztük 2 hétig. A minták másik részét mechanikai stressznek vetettük alá úgy, hogy szobahőmérsékleten forgattuk 3 napon át.

A mintákat az 1. példában leírt módszerek szerint analizáltuk. Ezenkívül mértük az oldott oxigén százalékát egy Ciba–Corning Model 248 vérgáz-analizátorral.

„Kísérleti” érték: a minták oxigén-parciálisnyomása mínusz a nitrogénnel kihajtott vakpufferben az oxigén parciális nyomása. „Kontroll”-érték: a szobahőmérsékleten tárolt vakpufferben az oxigén parciális nyomása mínusz a nitrogénnel kihajtott vak pufferben az oxigén parciális nyomása. Az oldott oxigén százaléka („kísérleti”/„kontroll”) mindig kisebb 30%-nál.

Eredmények

A 37 °C-on két hétig inkubált minták IEF/Western-blot és SDS-PAGE/Western-blot analízise sáveltőlódást és intenzitásvesztést mutatott, valamint a PEG3350-et és glutationt tartalmazó mintákban interferonmultimerek jelenlétét. Egy további hét 37 °C hőmérsékleten a glicerin vivőanyagnál extra sáv mutatkozott a blotokban. A szacharóz vivőanyag sáv-intenzitásvesztést mutatott. Ezen első szűrési eljárás lehetővé tette számunkra, hogy számításba vegyük az arginin.HCl, glicin, nátrium-klorid és mannit részletesebb vizsgálatát.

5. példa

Az interferon adszorpciója

Felolvasztott béta-interferon bulk-ot dializáltunk a BG9589-1, 2, 3 és 4 jelű készítményformák előállításához (lásd az 1. táblázatot) egy éjszakán át 2–8 °C-on, legalább kétszeri puffercserével. A dializátumokat használat előtt megszürtük. A proteinkoncentrációkat a 280 nm-en mért abszorpcióból (extinkciós koefficiens: 1,5 $\text{mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$) határoztuk meg. A mintákat a végső koncentrációra – 60 $\mu\text{g/ml}$ – hígítottuk. A hígított mintákat szürtük és 1,0 ml hosszú, szilikonnal bevont BD fecskendőbe (I típusú üveg) – a légtérrel nitrogénnel öblítettük át – töltöttük 0,5 ml-enként, három párhuzamossal, vagy 0,75 ml-enként töltöttük le, három párhuzamossal, 0,75 ml-es I típusú üvegfialákba, amelyek légtérét argonnal öblítettük át. A proteinkoncentrációkat reverz fázisú HPLC-vel (1. példa) határoztuk meg.

Eredmények

Az alábbi 3. táblázat a reverz fázisú HPLC-vel meghatározott proteinkoncentrációkat tartalmazza. Az adatok azt mutatják, hogy kevesebb protein van az üvegfialákba töltött mintákban, mint a szilikonnal bevont letöltött fecskendőkben. Tehát szilikonozott fecskendőket használunk a folyékony interferon formulálásához.

3. táblázat

	Üvegfiola ($\mu\text{g/ml}$) (S.D.)	Szilikonozott fecskendő ($\mu\text{g/ml}$) (S.D.)
BG9589-1	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)
BG9589-4	55,5 (0,7)	59,3 (0,5)

6. példa

Készítményformák fiziológiás pH-n
ionerő/foszfát

Előzetes vizsgálatokat végeztünk változó pufferkomponens-koncentrációk mellett foszfát/nátrium-klorid (pH 7,2) pufferrendszerekben, amelyekben a foszfátkoncentráció 10, 50 és 75 mM között változott, 0,2, 0,4 és 0,6 ionerő ($I = \sum c_i Z_i$, ahol c_i és Z_i az i ionfajta moláris koncentrációját, illetve vegyértékeltetését jelenti) mellett, amelyet nátrium-klorid hozzáadásával állítottunk be.

Részletes munkatervet (full factorial design) használtunk a foszfátkoncentráció (10, 50 és 75 mM) és az ionerő ($I=0,2, 0,4$ és $0,6$) változatok vizsgálatára. A pufferekben a nátrium-dihidrogén-foszfát, dinátrium-hidrogén-foszfát és nátrium-klorid összetételeket egy olyan táblázat (spreadsheet) felhasználásával számítottuk ki (a kívánt ionerő elérése céljából), amelyet Ellis és Morrison: „Buffers of Constant Ionic Strength for Studying pH-dependent Processes” [Methods Enzymol., 87, 405–426 (1982)] című közleményéből vettünk át. Az egyenletek lehetővé tették, hogy adott pH-hoz, foszfátkoncentrációhoz és ionerőhöz az egyes pufferkomponensekből szükséges mennyiségeket meghatározzuk. A kísérletben használt kilenc oldat mindegyikét úgy kaptuk, hogy a béta-interferon bulk félkésztermékben puffercserét végeztünk Pharmacia PD–10 sóalanító oszlopokon. A kapott oldatok pH-ja 7,20 ($\pm 0,15$) volt. A koncentrációkat a 280 nm-en mért abszorpciókból számítottuk ki, majd a megfelelő pufferrel való hígítással 150 $\mu\text{g/ml}$ béta-interferonra állítottuk be. A kapott oldatokat argon alatt, 0,22 mikronos szűrőkön sterilre szűrtük és 1,3 ml-enként 5 ml-es üvegfiolákba töltöttük argon légtérrel. A mintákat 37 °C-on 6 napon át inkubáltuk. A vizsgálatot három párhuzamossal végeztük. A mintákat az 580 nm-en mért fényáteresztés százaléka, a kinyert protein százaléka és IEF-PAGE/Western-blot vizsgálata alapján analizáltuk.

Eredmények

A százalékos fényáteresztés analízise az ionerősség változtatása vonatkozásában az áteresztés növekvő tendenciáját mutatta (azaz az oldhatatlan protein-aggregátumok csökkenő mennyiségét) növekvő ionerősség mellett. A kinyert proteinszázalék hasonló tendenciát mutatott, jöllehet az IEF-PAGE/Western-blot analízis nem mutatott trendet az ionerő változtatásától függően a dezamidációban, minthogy minden minta egyformán dezamidálódott. Tehát, 37 °C-on 6 napig

való tárolás után a minták csökkenő foszfátkoncentráció és növekvő ionerősség mellett, kevésbé mutattak hajlamot aggregációra. Azok a kísérleti eredmények, amelyeket a százalékos fényáteresztésre és a százalékos proteinkinyerésre kaptunk a változó foszfátkoncentráció függvényében (nem mutatjuk be), azt mutatták, hogy növekvő foszfátkoncentrációval csökken a százalékos fényáteresztés trendje, de egy varianciaanalízis kimutatta, hogy a különböző foszfátkoncentrációjú minták középértékeiben nincs szignifikáns különbség. A százalékos kinyerésre vonatkozó adatok javuló proteinkihozatalt mutattak alacsony foszfátkoncentrációknál (szignifikáns különbség volt 94% konfidenciaszint mellett). A foszfátkoncentráció változtatásával IEF-PAGE/Western-blotokon nem mutatkozott észrevehető trend.

Vivőanyag/só arány

Előzetes vizsgálatok (nem közöljük) arra mutattak, hogy néhány vivőanyaghoz feltehetően sókat kell hozzáadni (például nátrium-kloridot), hogy fennmaradjon a magas ionerő és hogy stabilizálhatóast fejtessen ki pH 7,2 mellett. Olyan (factorial) tanulmányt terveztünk, amelyben vivőanyagokat (glicin, lizin, arginin, szacharóz és mannit) és a nátrium-klorid tört részeit (frakcióit) – amelyek az izotonicitást befolyásolják – használtuk ($f_{s0}=0,025, 0,75$ és $1,0$). A frakciót a következő egyenlettel számítottuk ki: $f_{s0} = O_{s0} / (O_{s0} + O_{\text{vivőanyag}})$, amelyben O_{s0} és $O_{\text{vivőanyag}}$ a nátrium-klorid, illetve a vivőanyag ozmolalitását jelenti az oldatban, mOsm/kg-ban kifejezve. A sófrakció eszközül szolgál a só hatásainak összehasonlítására különböző vivőanyagok esetén. Minden minta tartalmazott adalékot az izotonicitás végett, különböző vivőanyag:só hányadossal (meghatározva az F_{s0} egyenlettel).

Az egyes vivőanyagokból 10%-os (tömeg/térfogat) törzsoldatot készítettünk 20 mM foszfátpufferben (pH 7,2). Az oldatokat gáztalanítottuk, majd argonnal átszellőztettük. Készítettünk egy 250 mM nátrium-klorid, 20 mM foszfát összetételű (pH 7,2) törzsoldatot, amelyet gáztalanítottunk, majd argonnal átszellőztettünk. Egy béta-interferon bulk közti terméket argonnal átszellőztetett 20 mM foszfátpufferrel (pH 7,2) szemben alaposan kidializáltunk. A kapott oldat béta-interferonkoncentrációját a 280 nm-en mért abszorpcióból határoztuk meg és foszfátpufferrel és a megfelelő vivőanyagot és sőt tartalmazó törzsoldattal hígítottuk 60 $\mu\text{g/ml}$ béta-interferonkoncentrációra és a kívánt só és vivőanyag feltételek elérése végett. A kapott mintákat szűréssel sterilizáltuk (0,22 mikronos szűrővel) és 1,0 ml-es – porlasztott szilikonos – Becton Dickinson I típusú üvegfecskendőbe töltöttük 0,5 ml-enként, nitrogén gáztérrel. A mintákat 40 °C-on tároltuk.

A 6. napon az arginin-, glicin- és szacharózmintákat abszorpcióméréssel – 320 és 280 nm-en – analizáltuk. Mindkét mérést a 0,22 mikronos szűrőn való szűrés előtt és utána is elvégeztük. A 2. héten az arginin-, lizin- és mannitmintákat hasonlóan analizáltuk, IEF-PAGE, redukáló SDS-PAGE és nemredukáló SDS-PAGE segítségével. A kontrollmintákat 2–8 °C között tároltuk és hasonlóan analizáltuk.

Eredmények

Az la-béta-interferonkihozatal (a kontroll százalékában) növekszik a szacharózra és mannitra vonatkozó növekvő f_{s0} értékkel és a maximális kihozattal $f_{s0}=1$ (130 mM nátrium-klorid) értéknel éri el. Argininre és lizinre vonatkoztatva a kihozatal növekvő f_{s0} -val csökken. A maximális kihozatal a glicines készítményformáknál pH 7,2-nél körülbelül $f_{s0}=0,75$ -nál érhető el.

A vivőanyag szűrésére végzett tanulmány, amelyben egy pH 7,2 foszfátpuffert használtunk különböző vivőanyagokkal – mint glicin, lizin, arginin, mannit és szacharóz, amelyeket izotonicitásig adagoltunk – az összes töltéssel nem rendelkező vivőanyag esetén gyenge kihozattal mutatott. A dezamidálódás mértékét nem befolyásolták ezek az adalékok. Például: a redukáló és nemredukáló SDS-PAGE mindegyik készítményformában a nem glikozilált típusú béta-interferon vesztességét mutatta ki, és nagyobb multimersávokat mutatott ki izotóniás nátrium-klorid egyedüli használata és mannit használata esetén. Összefoglalva, szoros összefüggés van a vivőanyag ionos karaktere és azon tulajdonsága között, hogy mennyire képes stabilizálni ezekben a pufferrendszerekben a béta-interferont az aggregációval szemben, fiziológiás pH mellett. A nem-ionos adalékanyagok, mint a szacharóz és a mannit, úgy tűnik, nem adnak védelmet, vagy pedig ténylegesen elő is segíthetik a proteinvesztés fiziológiás pH-n. A nátrium-klorid – oldott formában egyetlen töltéssel rendelkezik – jobban megfelel, mint akár a mannit vagy a szacharóz. Az aminosavak fiziológiás pH-n molekulánként két töltéssel rendelkeznek. A glicin esetében, a molekula zwitterionos tulajdonsága egymaga nem látszik elégségesnek a béta-interferon stabilizálására. Az arginin és a lizin – molekulánként mindegyik három töltéssel rendelkezik – jobban stabilizálja a béta-interferont, mint a csak nátrium-klorid vagy a glicin/nátrium-klorid tartalmú készítményformák.

7. példa

Stabilitási és kinetikai vizsgálatok

A) készítményformákat aseptikusan töltöttük le, inert atmoszférában. A fecskendőket különböző hőmérséklet-tartományban változó időtartamokig inkubáltuk és a fecskendők tartalmát analizáltuk. Röviden összefoglalva: a felolvasztott bulk béta-interferont BG9589-1, -2, -3 és -4 oldatok készítése végett egy éjszakán át 2–8 °C-on dializáltuk legalább két pufferváltással. A proteinkoncentrációkat a 280 nm-en mért abszorpciókból határoztuk meg (abszorpciókoefficiens: 1,5 ml/mg/cm). A mintákat egy végső, körülbelül 60 µg/ml-nek megfelelő la-béta-interferon-koncentrációra hígítottuk. Az 1. táblázat szerinti négy la-béta-interferonkészítmény-formát megszürtük és 0,5 ml-enként 1,0 ml-es Becton Dickinson (BD) fecskendőbe töltöttük, amelyeknek a belső felülete égetett szilikonnal vagy porlasztott szilikonnal volt bevonva. A mintákat OD, méretkizárásos HPLC (SEC=sice exclusion chromatography), izoelektromos fókuszáló gélelektroforézis (IEF)/Western-blot, redukáló nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PA-

GE)/Western-blot, peptidterképezés, Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE) és CPE bioassay segítségével analizáltuk. A fecskendő légterét nitrogéngáz töltötte ki. A fecskendőket 2–8 °C-on, 25 °C-on és 40 °C-on inkubáltuk 90 napig. A mintákat az 1. példában leírt módszerekkel analizáltuk.

Eredmények

Mintáink proteinkoncentrációjának analizésekor a koncentrációkat a különböző hőmérséklet mellett 90 napig tartott kiindulási anyag koncentrációihoz viszonyítottuk. A 2. ábrán látható, hogy a BG9589-1 teljes proteinstabilitást mutatott (nem volt proteinvesztés) 3 hónap múlva 2–8 °C hőmérséklet-tartományban (közéérték 4 °C) és 25 °C-on inkubálva. Egy testhőmérsékletet megközelítő tárolási hőmérsékleten (33 °C) a protein körülbelül 18%-a degradálódott. A testhőmérsékletet meghaladó tárolási hőmérsékleten (40 °C) a harmadik hónap végén a protein körülbelül 30%-a degradálódott. Lényegében azonos eredményeket kaptunk BG9589-2-nél is (nem mutatjuk be). A 3. ábra a BG9589-3 2 hónapos tárolási vizsgálatának eredményeit mutatja. A proteindegradáció 4–25 °C mellett minimális volt, de gyorsan előrehaladt magasabb hőmérsékleteken. A BG9589-4 készítményformával kapott eredmények lényegében azonosak a 2. és 3. ábrán látható eredményekkel. Ezeket az adatokat a redukáló SDS-PAGE/Western-blotok alátámasztották.

Az „égetett” fecskendőkben a vizsgálat időtartama folyamán nem voltak kimutatható oldható aggregátumok. Nem észleltünk jelentős változásokat a proteinkoncentrációban, a citopátiás hatásban (CPE assay), oxidált AP6 százalékában és a szénhidrátprofilban. Nem voltak észlelhető változások a mintákban redukáló SDS-PAGE/Western-blot és IEF/Western-blot vizsgálatok szerint. A dezamidálódás százalékában némi növekedés mutatkozott a kezdeti időpontokhoz viszonyítva. Azonban a fecskendők töltésére használt bulk közti termékben 37%-os volt a dezamidálódás, amely magasabb, mint az anyag fecskendőbe való töltése után mért 33,8%-os érték. Ez utóbbi alacsony érték valószínűleg a vizsgálat variabilitásának tudható be. A „porlasztott” fecskendőkben a vizsgálat időtartama alatt nem tudtunk kimutatni oldható aggregátumokat. Nem észleltünk szignifikáns változásokat a proteinkoncentrációban, a CPE assay-ben, a dezamidáció százalékában, az oxidált AP6 százalékában és a szénhidrátprofilban. A mintákban nem voltak kimutatható változások redukáló SDS-PAGE/Western-blot és IEF/Western-blot analízis szerint. Röviden összegezve, az eddigi eredmények azt mutatták, hogy a BG9589-1 végtermék 3 hónapig stabil 2–8 °C-on „égetett szilikonos” fecskendőkben és 6 hónapig 2–8 °C-on „porlasztott szilikonos” fecskendőkben.

Elvégeztük a BG9589-1 és BG9589-2 készítményformákkal (lásd az 1. táblázatot) az antivirális CPE assay-t, miután a fecskendőket aseptikusan letöltöttük. Mind a BG9589-1-re, mind a BG9589-2-re közölt aktivitás értéke 12,0 MIU/ml. Az antivirális CPE assay-t a minták 2–8 °C-on 3 hónapig való tárolása után megismételtük. BG9589-1-re közölt aktivitás értéke

11,6 MIU/ml (n=8), 10,2–13,3 MIU/ml 95%-os konfidenciaintervállummal.

Az 5 hónapig 2–8 °C-on és 6 hónapig –70 °C-on tartott BG9589-1 bulk köztitermék stabilitását is mértük. Kísérleti diaszűrési vizsgálatokból származó BG9589-1 mintákat analizáltunk az 1. példában leírt módszerekkel. Az eddigi eredmények azt mutatták, hogy a BG9589-1 gyártásközi anyaga 2–8 °C-on 5 hónapig és –70 °C-on 6 hónapig stabil.

Ezen speciális kísérlet időtartama alatt nem mutatunk ki oldható aggregátumokat. Nem észleltünk szignifikáns változásokat a dezamidáció százalékában és a szénhidrátprofilban. (A dezamidáció százalékában kapott különbségek az assay variabilitásán belül voltak.) A mintákban nem észleltünk változásokat redukáló SDS-PAGE/Western-blot és IEF/Western-blot módszerrel végzett analízis szerint. A proteinkoncentrációban csekély csökkenés jelentkezett. A –70 °C-nál kapott proteinkoncentráció csökkenésének az lehet az oka, hogy a minta egy lefagyasztás/felolvasztás cikluson ment át. A proteinkoncentráció csökkenés a kezdeti koncentráció 15%-án belül volt.

8. példa

Preklinikai vizsgálatok

Egyetlen intramuszkuláris (IM) dózis helyi tűrhetőségét vizsgáltuk nyulakon. Ezzel értékeltük az interferon lokális toxicitását, amikor több készítményformában alkalmaztuk. A jelenlegi folyékony készítményforma alkalmazásának vagy a liofilizált és feloldott interferonkészítmény-formák alkalmazásának tulajdonítható helyi injekciós reakciók a normál-konyhasóoldat alkalmazását követően megnyilvánuló reakciókhoz voltak hasonlóak.

1. Négy béta-interferonkészítmény-forma egyetlen IM-dózisban való alkalmazását követő irritációs/biológiai alkalmassági vizsgálat nyúlon

Hús hím újlándi fehér nyulat használtunk. Mind-egyik nyúl egyetlen 30 µg la-béta-interferontartalmú intramuszkuláris (IM) injekciót kapott a következő öt készítményforma egyikéből: BG9589-1 (pH 5,0; acetátpuffer; glicin/NaCl stabilizátor, 0,5 ml/dózis); BG9589-2 (pH 5,0; acetátpuffer; argininstabilizátor, 0,5 ml/dózis); BG9589-3 (pH 7,2; foszfátpuffer; argininstabilizátor; 0,5 ml/dózis); BG9589-4 (pH 7,2; foszfátpuffer, glicin/NaCl stabilizátor; 0,5 ml/dózis); és egy liofilizált béta-interferonkészítmény-formából (pH 7,2; 1,5% HSA; 1,0 ml/dózis) (Jacobs et al.; lásd fentebb).

Négy állat minden kezelést megkapott. Azok az állatok, amelyek a BG9589-1-et vagy a liofilizált készítményformát kapták, azonos mennyiségű normál-konyhasóinjekciót kaptak ugyanazon az oldalon, negatív kontrollként. Az injekció után 72 óra múlva vérmintákat vettünk a szérumok béta-interferonaktivitásának analíziséhez. Az injekció után 6, 12, 24, 48 és 72 óra múlva makroszkóposan vizsgáltuk a bőrterítéma és heg képződésére. Az injekció utáni 72. órás vérvétel után az állatokat leöltük, az injekciók helyét makroszkóposan ellenőriztük szövetkárosodás jeleire, majd 10%-os, semlegesre pufferolt formalinban fixáltuk. Az izommintákat

(injekcióhelyenként hármát) mikroszkóposan vizsgáltuk gyulladásra, elhalásra, bevérzésre és léziókra.

Eredmények

A Primary Irritation Index pontjai (EPA Dermal Classification System) szerinti értékeléssel a fenti folyékony készítményformák csekély bőrirritáción kívül mást nem okoztak. A BG9589-4 injekció helyének makroszkópos ellenőrzése egyik állatnál csekély irritációt (bevérzést) mutatott, a mikroszkópos vizsgálat azonban semmi jelet nem mutatva bevérzésnek, és megállapítottuk, hogy a makroszkópos megfigyelés mesterséges elváltozást határozott meg. Röviden: a mikroszkópos vizsgálatok megállapították, hogy a folyékony készítményforma vizsgálati mintáinak injekciójával kapott helyi reakciók következetesen enyhék voltak, és hogy egyetlen reakció sem volt komolyabb azoknál, amelyeket a liofilizált készítményforma vagy a normálkonyhasó alkalmazása okozott.

Ezenkívül a folyékony készítményformák ismételt IM alkalmazása után a nyúl bőrének irritációja könnyen tesztelhető több nyúlcsoport használatával, amelyek minden másnap 8 napon át a folyékony készítményformákból vagy normál-konyhasóoldatból intramuszkuláris injekciókat (összesen öt adagot) kaptak. A adagokat az egyes állatok hátán egy előre meghatározott területen adtuk be, hogy a vizsgálati mintának való helyi expozíció maximális legyen. A bőr makroszkópos leolvasását mindegyik kezelt csoportban az alkalmazások után 4–6 óra múlva végeztük és az utolsó alkalmazás után 24 óra múlva. Naponta teljes megfigyelést végeztünk a bőriktértekéletek idején. Az utolsó dózis után 24 órával végzett makroszkópos vizsgálatot követően az állatokat leöltük, hogy az injekciók helyét szövethárosodás jeleire ellenőrizhessük. A szöveteket semlegesre pufferolt 10%-os formalinban fixáltuk. A konzervált szöveteket mikroszkóposan vizsgáltuk gyulladásra, nekrozisra, bevérzésre és léziókra. Vérmintákat is vettünk, közvetlenül az első vizsgálati minta beadása előtt és az állatok leölésének idejében, hematológiai vizsgálat és a szérum kémiai vizsgálata céljára.

9. példa

Klinikai vizsgálatok

A találmány szerinti folyékony készítményformák jelentősen különböznek az előző interferonkészítmény-formáktól. Bármelyik klinikai indikáció esetén fennáll annak lehetősége, hogy megváltozik az interferon farmakokinetikai és farmakodinamikai tulajdonsága, ha embereknél alkalmazzák. Sajnálatosan a béta-interferon hatásai nagymértékben fajspecifikusak, és helyes farmakológiai információk humán sejtek tenyészetein, embereken és – kisebb mértékben – Rhesus majmokon végzett vizsgálatokból származnak. Farmakológiai változások – ha egyáltalán vannak – tesztelésének előnybe helyezett módja egy humán bioekvivalenciavizsgálat elvégzése.

A béta-interferon antivirális szintjét szérumban a citopátiás hatásra (CPE) irányuló bioassay-vel határozhatjuk meg, például az 1. példában leírt módon. A hu-

mán bioekvivalenciavizsgálatot bármennyi folyékony és liofilizált interferonkészítmény-formán elvégezhetjük. Szérum analízisével a görbe alatti terület (area under the curve=AUC) és a C_{max} aktivitási paramétereiből bármely normáljárással rendelkező szakember meg tudja határozni, hogy vajon a liofilizált és a folyékony készítményformák bioekvivalensek-e. Egy bioekvivalenciavizsgálati protokollra példaképpen leírunk egy kettős-vakkal, egyetlen dózissal végzett cross-over vizsgálatot, hogy szemléltessük egy találmány szerinti folyékony készítményforma és egy liofilizált béta-interferontermék bioekvivalenciáját egészséges önkénteseken.

Kivétel: A) készítményformákból minden személy azonos adagot (például 60 µg/12 MIU) kapott egy kettős-vak, kétperiódusú cross-over vizsgálatban (4. táblázat). A személyek kora 18 és 45 év között volt és magasságukra és testalkatukra nézve a normál-testtömegtartomány 15%-on belül volt. Hematológiai és kémiai vizsgálatra, valamint a szérum béta-interferonaktivitásának és farmakodinamikai profiljának meghatározásához vérmintákat vettünk közvetlenül a beadás előtt és különböző időpontokban a beadások után 144 órán át. Az injekció okozta fájdalmat és az injekció helyi reakcióit mindvégig figyelembe vettük.

Intézkedés: Az interferonnal társult náthaszindróma elleni profilaxisként minden személy acetamidofént kapott közvetlenül az injekciózási periódusok előtt és alatt.

Farmakokinetika

Szérum-béta-interferonmeghatározások

A szérum szinteket antivirális egységekben mértük, CPE assay-vel. A szérum antivirális szinteket AUC, C_{max} értékekre analizáltuk és a T_{max} ·AUC értékeket az adás idejéből számítottuk ki az utolsó kimutatható szintig (AUC_{0-T}) és az adás után 144 órán át (AUC₀₋₁₄₄). A kezelés adatainak standard leíróanalízisét SAS program használatával végeztük (version 6,08, SAS Institute, Cary, North Carolina).

4. táblázat

Adagolási séma a mintatanulmányhoz

Dózis-csoport	Adagolás módja	Dózis (MIU)	Kezelési periódus	
			1	2
1	IM	12	Liofilizált (60 µg)	Folyékony (60 µg)
2	IM	12	Folyékony (60 µg)	Liofilizált (60 µg)

Farmakodinamika

Vizsgáltuk az interferon által indukált GTP ciklohidrolázenzim termékét, a neopterint. Ez a biológiai marker a makrofág- és T-sejt-aktiválást jelzi [C. Huber et al., J. Exp. Med., 160, 310–314 (1984); 1996, szeptember 20; D. Fuchs et al., Immunol. Today, 9, 150–155 (1988)]. A rekombináns béta-interferonnak úgy a nem

klinikai, mint klinikai vizsgálata azt mutatta, hogy a neopterin indukciója a különböző rekombináns humán béta-interferonkezelések alkalmazása után kapott szérumaktivitás-szintekkel van összefüggésben.

- 5 A neopterin standard laboratóriumi eljárásokkal mérhető. A béta-interferon farmakodinamikai profilja három szérumneopterin-paraméter kiszámításával kvantitatív módon leírható. Az első paraméter – E_{AUC} – a neopterin vs időgörbe alatti terület alapvonalszintre
- 10 korrigálva. A második paraméter az E_{MAX} ; ez a paraméter a kapott neopterin-csúcsható és a neopterin-alapvonalszint közötti különbség; a harmadik paraméter az indukciós hányados: IR (induction ratio); ezt a paramétert úgy számítjuk ki, hogy a neopterin-csúcshatót elosztjuk a neopterin-alapvonalszinttel.

Statiztika

- Két Wilcoxon–Mann–Whitney-féle egyoldalisított-eljárást használtunk az AUC-ra, hogy meghatározzuk az ekvivalenciát. Annak érdekében, hogy a folyékony készítményformából származó interferonhoz viszonyított relatív biológiai alkalmasságát és 90%-os konfidenciahatárait kiértékeljük, az AUC-t varianciaanalízisnek
- 25 (ANOVA) vetettük alá logaritmusrendszerbe való transzformálás után. A „személyek közötti” („between-subject”) variációból a szekvenciákat és a nemeket izoláltuk. A „személyeken belüli” („within-subject”) variációkból a periódusoknak és kezeléseknél tulajdonítható komponenseket izoláltuk.

- 30 Azok számára, akik a szakterületen gyakorlatilag rendelkeznek nyilvánvaló, hogy a találmány itt előadott részletes leírását és gyakorlatát tekintetbe véve, a találmánynak más kiviteli alakjai és alkalmazásai lehetnek. A leírások és példák csupán a szemléltetést szolgálják, a találmány valódi oltalmi körét és szellemét a következő igénypontok tartalmazzák.

40 SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Folyékony készítmény, amely interferont és 0,3%–5% (t/tf) aminosav-stabilizálószer tartalmaz, melyet savas jellegű aminosavak, arginin és glicin közül választunk ki, ahol a folyékony készítmény nem egy liofilizált interferonból rekonstituált készítmény, és utólag sem kerül liofilizálásra.
- 45 2. Az 1. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyben az aminosav-stabilizálószer arginin vagy glicin, és a folyékony készítmény szérumalbumintól mentes.
- 50 3. Az 1. igénypont szerinti folyékony készítmény, melyet egy olyan tartály tartalmaz, amelynek legalább az egyik felülete az interferonra nézve inert anyaggal van bevonva.
- 55 4. Az 1. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyben az interferon béta-interferon vagy rekombináns technikával előállított interferon.
- 60 5. Az 1. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelynek pH-ja 4,0–7,2.

6. Az 5. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelynek pH-ja 4,8–5,2.

7. A 6. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelynek pH-ja 5,0.

8. A 6. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyben a savas jellegű aminosav glutaminsav.

9. Az 1. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyben az arginin arginin.HCl.

10. Az 1. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyben az interferonkoncentráció 6 MIU–50 MIU.

11. Az 1. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyben az interferonkoncentráció 6 MIU–50 MIU/dózis.

12. A 3. igénypont szerinti folyékony készítmény, ahol a tartálynak legalább az egyik felülete szilikonnal vagy poli(tetrafluor-etilén)-nel van bevonva.

13. A 12. igénypont szerinti folyékony készítmény, ahol a tartály egy fecskendő.

14. Az 1. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyben az interferon béta-interferon, az aminosav-stabilizálószer 170 mM L-glutaminsav, és továbbá egy pH 5,0 értékű puffert tartalmaz.

15. Az 1. igénypont szerinti folyékony készítmény, amely aminosav-stabilizálószerként glicint, és továbbá egy só-t tartalmaz.

16. A 14. igénypont szerinti folyékony készítmény, amely továbbá 15 mg/ml humán szérumalbumint és/vagy 0,1 t/ft% Pluronic F–68-at tartalmaz.

17. Az 1. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyben az interferon béta-interferon, az aminosav-stabilizálószer (a) 140 mM arginin vagy (b) 70 mM glicinnel kombinált 100 mM nátrium-klorid, és amely továbbá 20 mM pH 7,2 értékű foszfátpuffert tartalmaz.

18. A 17. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyet egy olyan tartály tartalmaz, melynek legalább a folyadékkal érintkező felülete szilikonnal vagy poli(tetrafluor-etilén)-nel van bevonva.

19. A 18. igénypont szerinti készítmény, ahol a tartály egy fecskendő.

20. Az 1. igénypont szerinti folyékony készítmény, amely emlősnél parenterális beadásra alkalmas, interferonként béta-interferont és továbbá a készítmény pH-ját 4,0–6,0 között tartó puffert tartalmaz.

21. A 20. igénypont szerinti folyékony készítmény, melyet egy olyan tartály tartalmaz, amelynek legalább az egyik felülete az interferonra nézve inert anyaggal van bevonva.

22. A 21. igénypont szerinti folyékony készítmény, ahol a tárolótartályban a folyadék-határfelület oxigéntartalmú gáztól mentes.

23. A 21. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyben a béta-interferon sem a tartályban történő tárolás alatt, sem azt megelőzően nem lett kavitációnak alávetve.

24. A 20. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyben a puffer citrát-, szukcinát-, tartarát-, fumarát-, glukonát-, oxalát-, laktát- vagy acetátpuffer.

25. A 20. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelynek pH-ja 4,5–5,5.

26. A 20. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelynek pH-ja 5,0.

27. A 20. igénypont szerinti folyékony készítmény, amely steril.

28. A 20. igénypont szerinti folyékony készítmény, amely a vérrel izotóniás.

29. A 20. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyben az interferon humán rekombináns béta-interferon.

30. A 29. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyben a humán rekombináns béta-interferon aktivitása 6–50 MIU.

31. Az 1. igénypont szerinti folyékony készítmény, amelyben az aminosav-stabilizálószer 0,3%–3,13% (t/ft) mennyiségben van jelen, és a folyékony készítmény fagyasztott.

32. Folyékony gyógyszerkészítmény, amely (a) interferont, (b) acetátpuffert és (c) arginin tartalmaz, a készítmény pH-ja 4,0–6,0, és a készítmény szérumalbumintól mentes.

33. A 32. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amelyben az arginin arginin.HCl.

34. A 32. vagy 33. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amelyben az interferon béta-interferon.

35. A 34. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amely a béta-interferont 6–50 MIU-ban tartalmazza.

36. A 34. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amely a béta-interferont dózisonként 6–50 MIU-ban tartalmazza.

37. A 32–36. igénypontok bármelyike szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amely 20 mM acetátpuffert tartalmaz.

38. A 32–37. igénypontok bármelyike szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amely 0,3%–5% (t/ft) arginint vagy arginin.HCl-ot tartalmaz.

39. A 32–38. igénypontok bármelyike szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amely továbbá egy felületaktív anyagot tartalmaz.

40. A 39. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amelyben a felületaktív anyag 0,1% (t/ft) Pluronic F–68.

41. A 32–40. igénypontok bármelyike szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amelyben az oldott oxigén szintje alacsonyabb, mint a légköri egyensúlyi szintek 30%-a.

42. A 41. igénypont szerinti folyékony gyógyszerkészítmény, amelyben az oldott oxigén szintje alacsonyabb vagy egyenlő a légköri egyensúlyi szintek 10%-ával.

43. Eljárás interferon stabilizálására egy folyékony gyógyszerkészítményben, *azzal jellemezve*, hogy összekeverünk (a) egy interferont, (b) egy puffert és (c) 0,3%–5% (t/ft) mennyiségben egy aminosav-stabilizálószerrel, melyet savas jellegű aminosavak, arginin és glicin közül választunk ki, ahol a folyékony gyógyszerkészítményt nemliofilizált interferonból rekonstituáljuk, és a készítményt utólag sem liofilizáljuk.

44. Az 43. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az aminosav-stabilizálószer arginin vagy gli-

cin, és a folyékony gyógyszerkészítmény szérumalbumintól mentes.

45. A 43. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a folyékony gyógyszerkészítményt egy olyan tartályba helyezzük, amelynek legalább az egyik felülete az interferonra nézve inert anyaggal van bevonva.

46. A 43. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a folyékony gyógyszerkészítményt egy tartályba helyezzük, és az interferont sem a tartályba helyezés során, sem azt megelőzően nem vetjük alá kavitációnak.

47. A 43. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy interferonként béta-interferont vagy rekombináns technikával előállított interferont alkalmazunk.

48. A 43. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy 4,0–7,2 pH-jú puffert alkalmazunk.

49. A 48. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a puffer pH-ja 4,8–5,2.

50. A 49. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a puffer pH-ja 5,0.

51. A 43. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy aminosav-stabilizálószerként arginint, különösen arginin.HCl-ot alkalmazunk.

52. A 43. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az interferont 6 MIU–50 MIU koncentrációban alkalmazzuk.

53. A 45. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a tartálynak legalább az egyik felülete szilikonnal vagy poli(tetrafluor-etilén)-nel van bevonva.

54. Az 53. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a tartály egy fecskendő.

55. A 43. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy interferonként béta-interferont, pufferként 20 mM 7,2 pH-jú foszfátpuffert és aminosav-stabilizálószerként: (a) 140 mM arginint vagy (b) 100 mM nátrium-kloriddal egyesített 70 mM glicint alkalmazunk.

56. Az 55. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a folyékony készítményt egy olyan tartályba helyezzük, melynek legalább egyik folyadékkal érintkező felülete szilikonnal vagy poli(tetrafluor-etilén)-nel van bevonva.

57. Az 56. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a tartály egy fecskendő.

58. Eljárás interferon stabilizálására egy folyékony gyógyszerkészítményben, *azzal jellemezve*, hogy összekeverünk (a) egy interferont, melyet nemliofilizált interferonból rekonstituáltunk, (b) egy acetátpuffert és (c) arginint, és a folyékony gyógyszerkészítményt utólag sem liofilizáljuk.

59. Az 58. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az argininként arginin.HCl-ot alkalmazunk.

60. Az 58. vagy 59. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy interferonként béta-interferont alkalmazunk.

61. A 60. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az interferont 6–50 MIU koncentrációban alkalmazzuk.

62. A 60. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az interferont dózisonként 6–50 MIU-ban alkalmazzuk.

63. Az 58–62. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 20 mM acetátpuffert használunk.

64. Az 58–63. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az arginint vagy arginin.HCl-ot 0,3%–5% (t/tf) mennyiségben alkalmazzuk.

65. Az 58–64. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy felületaktív anyagot is keverünk a készítményhez.

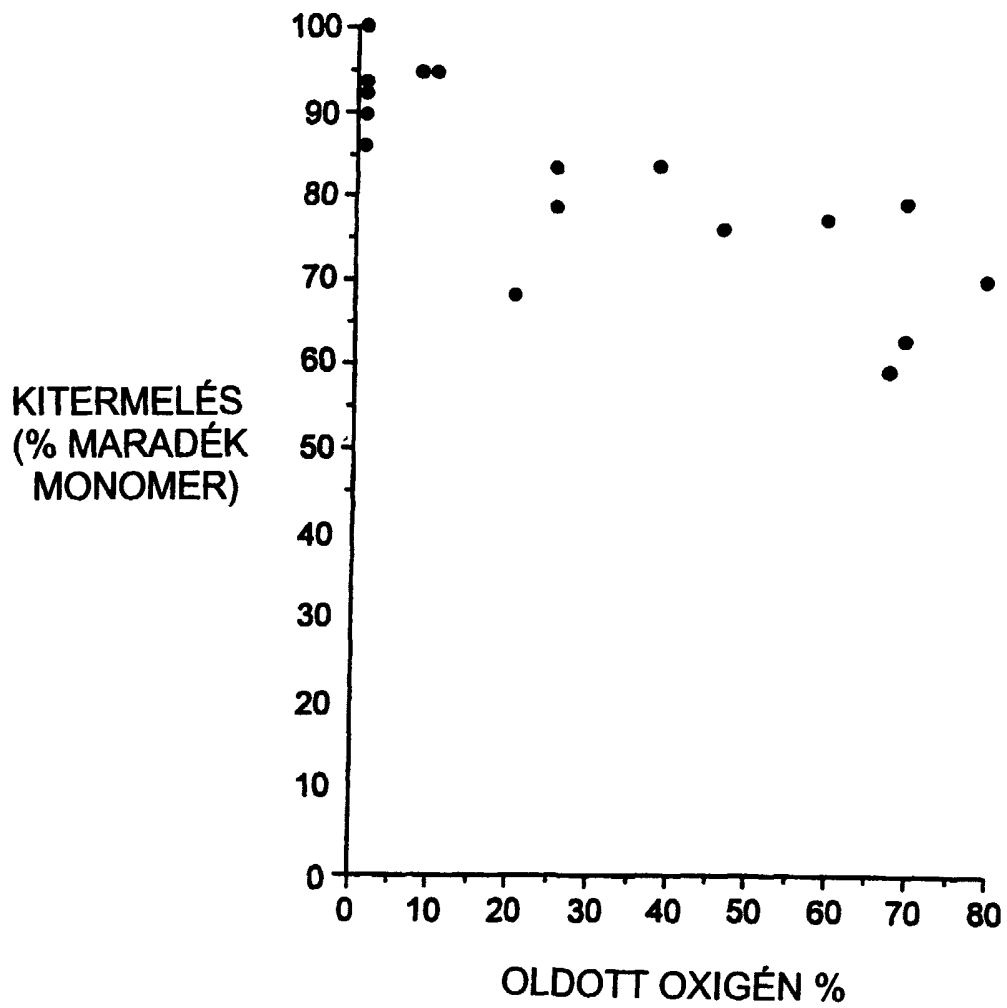
66. A 65. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy felületaktív anyagként 0,1% (t/tf) Pluronic F-68-at alkalmazunk.

67. Az 58–66. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szérumalbumint nem adunk hozzá.

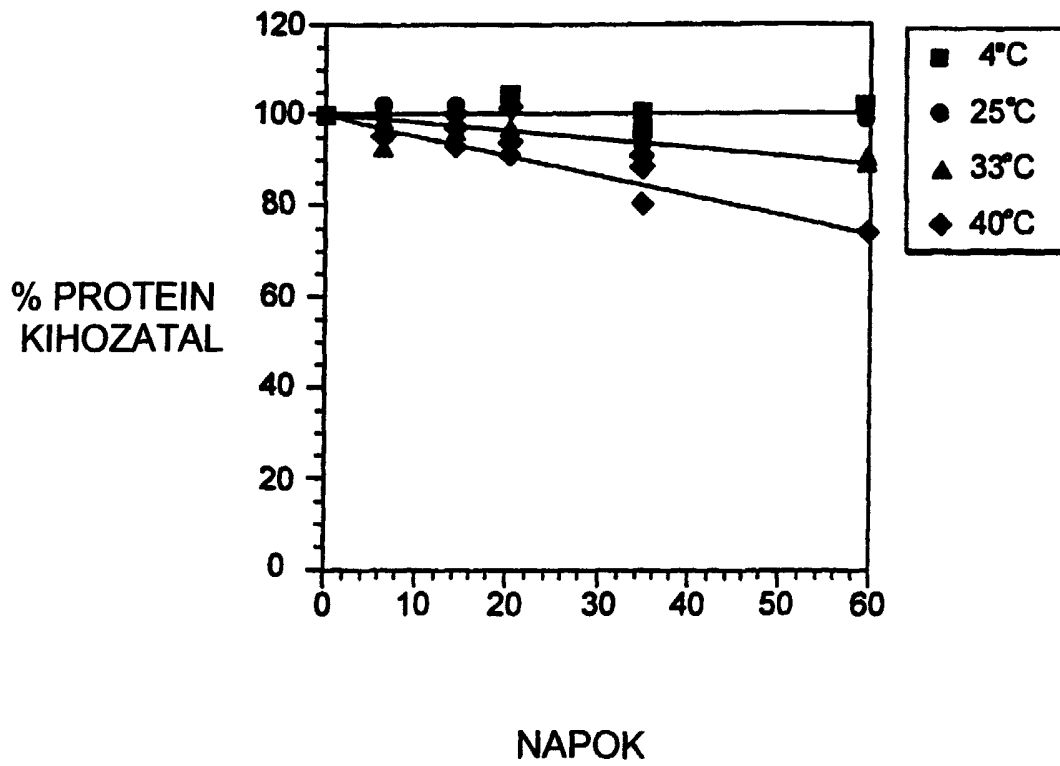
68. Az 58–67. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a folyékony gyógyszerkészítményt egy tartályba helyezzük, és a béta-interferont sem a tartályban történő tárolás során, sem azt megelőzően nem vetjük alá kavitációnak.

69. Az 58–67. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a folyékony gyógyszerkészítményt egy olyan tartályban tároljuk, ahol nincs oxidáns tartalmú folyadék-határfelület a folyékony gyógyszerkészítmény és a tartály között.

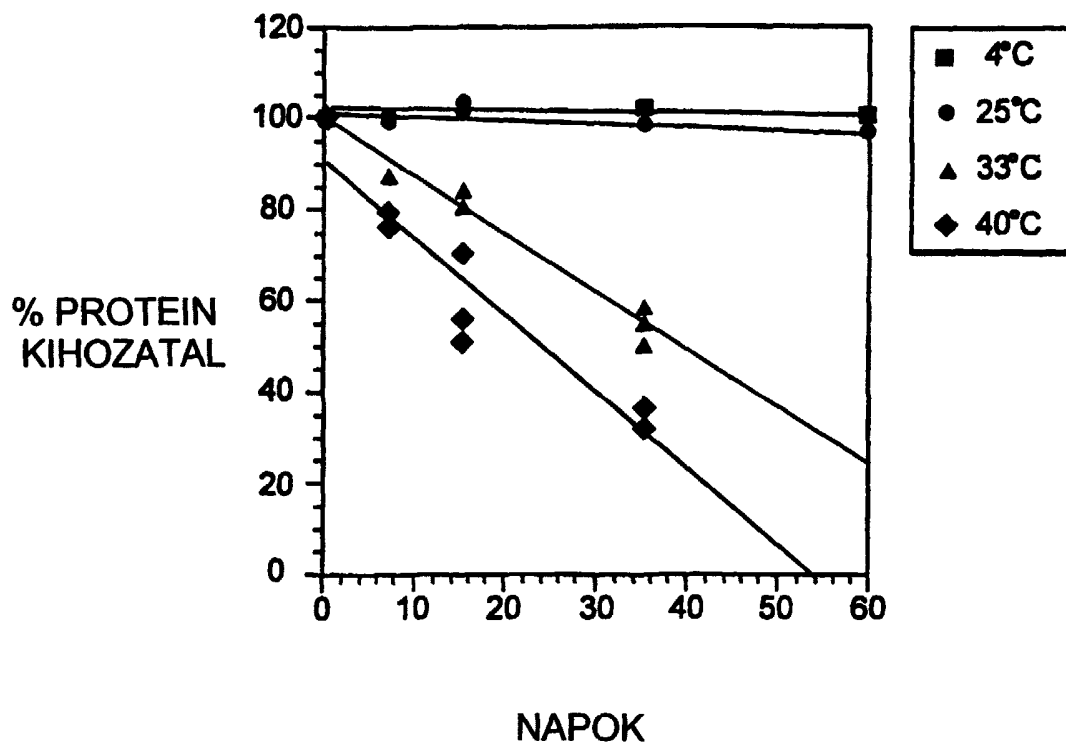
KITERMELÉS A VIRÁLIS INAKTIVÁLÁSI LÉPÉS SORÁN AZ OLDOTT OXIGÉN % FÜGGVÉNYÉBEN



1. ábra



2. ábra



3. ábra