

## K I V O N A T

Fém-alfa-interferon kristályok

SCHERING CORPORATION, KENILWORTH, New Jersey, US

A belentés napja: 1994. 02. 24.

Elsőbbsége: 1993. 02. 25. (08/024,330) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/01729

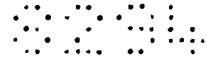
A nemzetközi közzététel száma: WO 94/19373

A találmány tárgyát új, kristályos alakban előállítható alfa-interferon-fém-komplexek képezik, mindenekelőtt monoklin kristályos cink-alfa-2-interferonok (cink-IFN $\alpha_2$ ) — előnyösen cink-alfa-2b-interferon — vagy kobalt-alfa-interferonok, mindenekelőtt kobalt-alfa-2-interferonok (kobalt-IFN $\alpha_2$ ), ezek előállítása és olyan kristályos IFN $\alpha$  készítmény, amelynek a felezési ideje a szérumban legalább 12 óra, ha egy főemlősnek szubkután injekció formájában beadják, ezért lehetővé teszi szabályozott kioldódású gyógyszerforma előállítását.

Jell. 2570. 1111

Gwald

S.B.G. & K.  
Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda  
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.  
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323



61.145/BE

A

2585/95

## KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Fém-alfa-interferon kristályok

SCHERING CORPORATION, KENILWORTH, New Jersey, US

Feltalálók:

REICHERT Paul, MONTVILLE, NJ, US

MCNEMAR Charles, HIGH BRIDGE, NJ, US

NAGABHUSHAN Nagamani, PARSIPPANY, NJ, US

TINDALL Stephen, MADISON, NJ, US

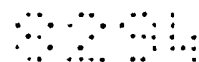
HRUZA Alan, HACKETTSTOWN, NJ, US

A bejelentés napja: 1994. 02. 24.

Elsőbbsége: 1993. 02. 25. (08/024,330) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/01729

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/19373



A találmány tárgyát új, kristályos alakban előállítható alfa-interferon-fém-komplexek, különösen interferonok cinkkel vagy kobalttal képzett kristályos komplexei képezik, vagyis a találmány fehérjék, mindenekelőtt interferonok kristályosításával foglalkozik.

A humán alfa-interferonok a fehérjéknek egy legalább 24 altípusból álló családját alkotják [K.C. Zoon: Interferon 9, 1 (1987), szerkesztő: I. Gresser, Academic Press, New York]. Ezek eredetileg olyan anyagokként írták le, amelyek képesek a sejtekben a vírusok szaporodását meggátolni, mai tudásunk szerint azonban az mondhatjuk, hogy az immunrendszer több különböző funkcióját befolyásoló pleiotropiás limfokinekről van szó [Opdenakker et al.: Experimentia 45, 513 (1989)]. Az in vitro biológiai hatásuktól függetlenül a humán alfa-interferonok jelenlegi alkalmazási területei közé tartozik a tüskéssejtes leukémia, a Kaposi-szarkóma, a hegyes szemölcs (verruca acuminata), a hepatitis B és hepatitis C kezelése.

Tisztított, steril, liofilezett rekombináns interferonból készül az alfa-2b-interferon néven ismert készítmény. Jelentős igény mutatkozik az alfa-interferonok, elsősorban az alfa-2b típusú rekombináns alfa-interferon kristályos alakjai iránt, egyrészt a szerkezet felderítésével kapcsolatban, másrészt különböző alkalmazási formák — beleértve a szabályozott kioldású készítményeket — kifejlesztése céljából.

Mind ez ideig a kristályos humán alfa-interferon két formáját írták le [Miller et al.: Science 215, 689 (1982); Kung et al.: U.S 4 672 108 számú szabadalmi irat; Weissmann: "The



Cloning of Interferon and Other Mistakes", in: Interferon 1981, szerkesztő: Ian Gresser, Academic Press, New York, 101-134; Weissmann: Phil. Trans. R. Soc. Lond. B299, 7 (1982); Nagabhushan et al.: "Characterization of Genetically Engineered alpha-2-Interferon", in: Interferon: Research Clinical Application and Regulatory Consideration, Zoon et al.: Elsevier, New York 79 (1982)]. A publikációkban ismertetett eljárások az alfa-2-interferon kristályosítását polietilén-glikolból, alacsony hőmérsékleten, illetve foszfátpufferrel készült oldatból, a pH és a hőmérséklet beállításával végzik. A Miller és munkatársai neve alatt megjelent közleményben említés történik arról is, hogy az alfa-2-interferon kristályai hasáb alakúak. Az alfa-2-interferon monoklin hasáb alakú kristályai előállításának körülményeit — ammónium-szulfát-oldat, gőzdiffúziós függőcsepp módszer, 22 °C — a PCT/US91/03660 számú nemzetközi szabadalmi bejelentésből ismerhetjük meg.

Az alfa-interferont (a nemzetközi szakirodalomban használt rövidítéssel: (IFN $\alpha$ ) általában szubkután vagy intravénás injekció formájában alkalmazzák, rendszerint kórházakban vagy rendelőintézetekben. Az (IFN $\alpha$ ) felezési ideje a szérumban 2-6 óra, ha a bőr alá fecskendezzük, intravénásan beadva azonban mindössze néhány perc, és ha az időbeni lefutást vizsgáljuk, a vérszintgörbe lökésszerű, hullámzó profilt mutat, azaz a szérumkoncentráció gyors emelkedését gyors csökkenés követi. Éppen ezért, hogy a hatóanyag koncentrációját terápiásan hatékony szinten tartsuk a szérumban, a fehérje



megfelelő adagjainak gyakori beadására van szükség. A klinikai gyakorlat szempontjából azonban sokkal előnyösebb lenne, ha sikerülne az IFN $\alpha$  hatóanyagot tartalmazó olyan gyógyszerformát kifejleszteni, amelyből a fehérje folyamatosan szabadul fel és kerül a véráramba, miáltal a szérumban a hatóanyag koncentrációja elér egy bizonyos értéket, és huzamosabb ideig ezen a szinten marad, vagyis a vérszintgörbe platószerű szakasza jellemzi a kinetikai képet. Az ilyen készítményeket a gyógyszerészetben szabályozott kioldódású gyógyszerformának nevezik.

Napjainkig az ismert kristályos alfa-interferonok egyike sem bizonyult alkalmasnak arra, hogy szabályozott kioldódású gyógyszerformát lehessen készíteni belőlük, ugyanis ilyen célra megfelelő tulajdonságú anyagok szükségesek, nevezetesen korlátozott oldékonyság 37 °C-on, és megfelelő stabilitás az injekcióként beadható gyógyszerkészítmény esetében, amely kielégíti a nemzetközi szakirodalomban "GRAS" néven ismert kategória (Generally Recognized as Safe) általános gyógyszerbiztonsági követelményeit. Mindazonáltal a szabályozott kioldódású gyógyszerforma potenciális előnyei jól ismertek. Először is, szabályozott kioldódású készítmény formájában kisebb dózisban kaphatja a beteg a gyógyszert, amely így azonos vagy jobb hatékonyság mellett nagyobb biztonságot jelent. Azonfelül a biológiai hozzáférhetőség időbeni megnövelése következtében új terápiás alkalmazási területek feltárására is lehetőség adódik, mivel ilyen módon javul a hatóanyag eloszlása és a szervekbe vagy szövetekbe való bejutása. Az elmondottakból



nyilvánvaló, hogy igény mutatkozik IFN $\alpha$  hatóanyagot tartalmazó szabályozott kioldódású gyógyszerkészítményre.

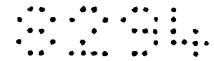
A fentiek alapján a találmány tárgyát mindenekelőtt a morfológiailag monoklin kristályos cink-IFN $\alpha_2$ , azaz az alfa-2-interferonból készült cinkvegyület képezi. Ugyancsak a találmány tárgyát képezi a kristályos kobalt-IFN $\alpha_2$ , továbbá a találmány tárgya olyan kristályos IFN $\alpha_2$ , amelyet valamely főemlősnek szubkután injekció formájában beadva, a felezési ideje a szérumban legalább 12 óra.

A találmány tárgya azonkívül eljárás kristályos IFN $\alpha_2$  előállítására, ami abból áll, hogy alfa-2-interferonból oldható fémkomplexet képezünk, és az oldható IFN $\alpha_2$ -fém-komplexet oldatban a fém ecetsavas sójával egyensúlyba hozzuk, olyan körülmények között, ami azt eredményezi, hogy az IFN $\alpha_2$ -fém-komplex-oldat túltelítetté válik, és kristályos IFN $\alpha_2$ -fém-vegyület keletkezik.

A találmány egyaránt vonatkozik az alfa-interferonból készült fémsó-vegyület monoklin, lemezes vagy túkristályos formáira.

Az 1. ábrán vérszintgörbékét láthatunk. A 10-es számmal jelölt görbe a foszfátpufferrel készült oldatban beadott alfa-2-b-interferon vérszintjét mutatja az idő függvényében, míg a 12-es számmal megjelölt görbe a protamin-szulfát hordozóval befecskendezett alfa-2b-interferon-cink-komplex vérszintértékeit mutatja.

A találmány tehát mindenekelőtt új, kristályos fém-IFN $\alpha$ -komplexekre, és különösen interferonok cinkkel vagy kobalt-



tal képzett, kristályos komplexeire vonatkozik. Ezeknek a kristályos anyagoknak az oldhatósága megfelelő a gyógyszerkészítményekhez kívánatos mértéknek, ami annyit tesz, hogy 37 °C-on korlátozottan oldhatóak, a részecskeméret alatta marad a 200 µm-nek, és a vegyületek oldatban, szobahőmérsékleten eléggé stabilnak bizonyultak az injekciós alkalmazáshoz. Egyetlen adagban  $34 \times 10^6$  NE kristályos cink-IFN $\alpha_{2b}$ -szuszpenziót a bőr alá fecskendezve, a szérumkoncentráció alapján mértük az elimináció sebességét, és azt találtuk, hogy a felezési idő 12 óra, ami lényegesen magasabb a nem kristályos IFN $\alpha_{2b}$ -t tartalmazó INTRON A<sup>(R)</sup> (Scering-Plough, Kenilworth, New Jersey) esetében kapott értéknél. Ennél a készítménynél a szérumban mért felezési idő 2-3 óra, tehát a növekedés mintegy 4-6-szoros.

A fém-interferon-komplex túltelített oldatából a kristályosodás megindítására több módszer is ismeretes, ilyen például a gőzdiffúzió, a folyadékdiffúzió, az állandó hőmérsékletű és a hőmérséklet-indukciós eljárás, valamint ezek kombinációi. A kristályosodás csak akkor indul meg, ha a fehérjekoncentráció, a pufferkoncentráció, a fémionok koncentrációja, továbbá a hőmérséklet egy meghatározott, szűk tartományba esik. A felsorolt paraméterek tekintetében a túltelítettség eléréséhez szükséges körülmények megteremtéséhez alkalmas lehet a főzdiffúzió (függőcsepp módszer), a folyadékdiffúzió (dialízis és ultraszűrés), az állandó hőmérsékletű eljárás, 4 °C és 22 °C közötti tartományban, illetve a hőmérséklet-indukciós eljárás (a hőmérsékletet bizonyos idő alatt 4 °C-ról 22 °C-ra növeljük). Előnyösen az alfa-2b-interferonból történő

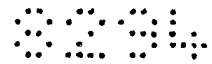


komplexbéállításhez használt fémsó valamilyen kobalt- vagy cinksó, és az egyensúlyba hozást állandó hőmérsékleten vagy hőmérséklet-indukcióval végezzük.

Az IFN $\alpha$ -fém-komplex oldata egy fém-acetát-sót tartalmaz. A fém-acetát-só előnyösen a cink- kadmium-, kálium-, lítium-, magnézium- vagy kobaltsók valamelyike, de legelőnyösebb a cink-acetát, és az oldatból a kristályosodást vagy az úgynevezett állandó hőmérsékletű eljárással vagy hőmérséklet-indukciós eljárással váltjuk ki. A gőzdiffúziós és folyadékdiffúziós kísérleti elrendezés esetében az oldatot töményebb cink-acetát- vagy kobalt-acetát-oldattal szemben hozzuk egyensúlyba. Egyensúlyba hozás alatt itt azt a folyamatot értjük, ami által az egyik, az alacsonyabb sókoncentrációjú oldatból ozmózis következtében az oldószer diffúzió útján a másik, a magasabb sókoncentrációjú oldatba vándorol, és ez azt eredményezi, hogy a két oldat koncentrációja kiegyenlítődik, azaz egyensúlyi helyzet jön létre.

Az IFN $\alpha_2$ -oldatban a kristályosodás megindulásakor az acetátsó előnyösen 60 mM és 140 mM közötti értéknek megfelelő koncentrációban van jelen, illetve még előnyösebb, ha az acetátsó koncentrációja a 80 mM és 100 mM közötti tartományba esik. Amint azt később még tárgyaljuk, az egyensúlyba hozás folyamatának megkezdésekor, gőzdiffúziós vagy folyadékdiffúziós kísérleti elrendezés esetén az acetátsó koncentrációja alacsonyabb, mintegy 20-70 mM.

Az IFN $\alpha_2$  előnyösen alfa-2b-interferon, illetve még előnyösebben humán, rekombináns alfa-2b-interferon. A találmány



egyik megvalósított formájában a hatóanyag alfa-2b-interferon, amelynek az aminosav-szekvenciája az 1. adatlapon felírtnak felel meg. Magától értetődik azonban, hogy hatóanyagként az  $\text{IFN}\alpha_2\text{a}$  ugyancsak használható. Az alfa-2a-interferon primér aminosav-szekvenciája az 1. adatlapon bemutatott szekenciától abban különbözik, hogy a 23-as számú aminosav arginin helyett lizin.

Az alfa-2-interferon acetátsóval készült oldata pufferolt oldat, amelynek a pH-ra 5,0 és 7,0 közé, előnyösen 5,5 és 6,5 közé esik, például 6,0-os pH-jú, pufferolt 35 mM nátrium-acetát-oldat.

Amint azt fentebb már jeleztük, a találmány szerinti eljárás magában foglalja egy fém- $\text{IFN}\alpha_2$ -komplex-oldat előállítását, amely oldat bizonyos körülmények között túltelítetté válik, és megindul a kristályosodás. Az oldat túltelítetté válását különböző kristályosítási módszerekkel érhetjük el, így gőzdiffúzióval, állandó hőmérsékleten kivitelezett folyadékdiffúzióval, úgynevezett hőmérséklet-indukciós eljárással vagy ezek kombinációjával. A gőzdiffúziós módszernél a cink- $\text{IFN}\alpha_2$ -komplexet egy acetátsó-oldattal hozzuk egyensúlyba, ami azt eredményezi, hogy a cink- $\text{IFN}\alpha_2$  tekintetében az oldat túltelítetté válik, és állandó hőmérsékleten megindul az alfa-2-interferon-kristályok kiválása. A folyadékdiffúziós módszernél a cink- $\text{IFN}\alpha_2$ -komplex pufferolt cink-acetát-oldatban van, és ezt az oldatot állandó hőmérsékleten, ugyancsak pufferolt, de töményebb cink-acetát-oldattal szemben dialízisnek vetjük alá. A hőmérséklet-indukciós eljárás esetében a pufferolt



fém-acetát-oldattal készült fém-IFN $\alpha$ -oldatban úgy indítjuk meg a kristályosodást, hogy a hőmérsékletet 4 °C-ról 22 °C-ra emeljük.

A találmány szerinti eljáráshoz bármilyen megfelelő IFN $\alpha_2$  felhasználható, így például az IFN $\alpha_{2a}$  és IFN $\alpha_{2b}$ , előnyösebb azonban humán, rekombináns IFN $\alpha_{2a}$  (r-h-IFN $\alpha_{2a}$ ) vagy IFN $\alpha_{2b}$  (r-h-IFN $\alpha_{2b}$ ) alapanyagból kiindulni. A kereskedelemben a következő IFN $\alpha_2$  készítmények kaphatók: A Hoffmann-La Roche ROFERON<sup>®</sup> és a Schering-Plough INTRON<sup>®</sup> nevű készítménye; továbbá a Burroughs-Wellcome Corporation WELLFERONS<sup>®</sup> nevű készítménye, amely tulajdonképpén tiszta interferonok IFN $\alpha_2$ -t tartalmazó keveréke. A humán alfa-interferonok nagyfokú szekvenciaazonosságára tekintettel, a találmány szerinti eljárás mindegyik altípusra alkalmazható.

A humán IFN $\alpha_2$  altípusokat rekombináns DNS-technológiával állíthatjuk elő, illetve természetes forrásból származó anyag (például humán perifériás vér limfociták vagy humán limfoblasztoid sejtvonalak) tisztításával is hozzájuthatunk ilyenhez, például a Pestka és munkatársai [Ann. Rev. Biochem. 56, 727 (1987)] által leírtakat követve. Mindazonáltal az IFN $\alpha_2$  kiindulási anyag vonatkozásával az r-h-IFN $\alpha_{2b}$  bizonyult előnyösnek, amelynek az aminosav-szekvenciája az 1. adatlapon látható.

A természetes eredetű alfa-interferonokhoz különböző forrásokból, így teljes vérből izolált leukocitákból, neonatális fibroblasztokból, limfoblasztoid és különböző leukémiás sejtvonalakból származó fehérjék tisztításával juthatunk. Az



első, klinikailag hozzáférhető, humán leukocita-interferon készítményt. K. Cantell és társai fejlesztették ki Finnországban. Úgy jártak el, hogy a szokásos donoroktól vett, centrifugált vért interferonnal bekezelték, majd Sendai-vírus hozzáadásával kiváltozzák az IFN $\alpha$ -termelést, azután a centrifugálással nyert felülúszót kálium-tiocianáttal precipitáltatták, etanollal extrahálták, végül egy pH-precipitációt követően foszfáttal pufferolt nátrium-klorid-oldattal szemben dialízist végeztek, aminek eredményeképpen megkapták a tisztított alfa-interferont [K.E. Morgensen et al.: Pharmacol. Ther. 1, 369 (1977)].

C.Weismann és munkatársai [Science 209, 1343 (1980)], valamint más kutatócsoportok is a rekombináns alfa-interferont klónozták és E. coli-ban expresszálták. A rekombináns alfa-interferonok tisztítását szintén leírta több kutatócsoport is. A tisztítás általában kromatográfiás lépések és ammónium-szulfátos kicsapás kombinációhjával történik, a kromatográfiás eljárások között egyaránt megtalálható az affinitáskromatográfia, az ioncserélő kromatográfiás és a gélszűrés, amint például C. Weissmann [Phil. R. Soc. (London), b299, 7 (1982)] leírta. Egy másik lehetséges tisztítási módszer a rekombináns alfa-interferonok előállítása során az immuno-affinitáskromatográfia, amelynél immobilizált antitesteket használnak [P.P. Trotta et al.: Developments in Industrial Microbiology 72, 53 (Elsevier, Amsterdam 1987)]. A rekombináns alfa-interferonok esetében alkalmazható tisztítási eljárásokról jó áttekintést nyújtanak T.L. Nagabhushan és P.P. Trotta [lásd Ullman's En-



cyclopedia of Industrial Chemistry A14, VCH:372 (Weinheim, Federal Republic of Germany, 1989)].

Előnyösen a találmány szerinti eljáráshoz felhasznált IFN $\alpha_2$  tisztítása hagyományos módszerekkel (lásd Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry] történik, majd a végső tisztítást fordított fázisú nagynyomású-folyadékromatográfiás eljárással végezzük.

Az IFN $\alpha$  kristályosításnál alkalmazható gőzdiffúziós eljárás során általában cseppekkel dolgozunk, mint például a függőcsepp módszer vagy a szendvics módszer esetében. Az acetátsó-oldattal készült IFN $\alpha_2$ -oldat egyensúlyba hozásához egy másik acetátsó-oldatot használunk, amely azonban az acetátot nagyobb koncentrációban tartalmazza, mint az első oldat. Előnyösen az egyensúly létrejötte lassú folyamat, például 1 órától 30 napig terjedő időtartamú lehet.

Nagyobb mennyiségű kristályos termék előállításánál más, a gőzdiffúziós eljáráshoz hasonló módszert alkalmazhatunk a túltelítettség létrehozásához, és ez a módszer például a folyadékdiffúzió alapuló dialízis vagy ultraszűrés lehet. A kristályosodás megindítása szintén történhet hőmérséklet-indukciós eljárással, amikor is a nem kristályos fém-interferon-vegyület szuszpenziója vagy oldata a hőmérséklet emelésével válik túltelítetté, majd ezt követően megindul a göcképződés, és kristályok keletkeznek. A klinikai gyártás folyamatában a nagyléptékű kristályosítást tisztításra vagy töményítésre használhatjuk.

Az IFN $\alpha_2$  végső koncentrációja az acetátsó-oldatban a



kristályosodás megindulásakor, azaz az első kristályok megjelenésének időpontjában, az 5 és 80 mg/ml közötti tartományba eshet, de még előnyösebb, ha az  $\text{IFN}\alpha_2$  koncentrációja mintegy 5-50 mg/ml. Előnyösen az  $\text{IFN}\alpha_2$  kiindulási koncentrációja hozzávetőleg 40 mg/ml.

A gőzdíffúziós eljárásnál az  $\text{IFN}\alpha_2$ -oldatban a fém-acetát-só koncentrációja kezdetben — a kristályosodás megindulása előtti fázisban — 10 és 70 mM között lehet, azonban előnyösebb, ha az alfa-2-interferon oldatban a fém-acetát-só koncentrációja a 20 mM és 45 mM közötti tartományba esik. Az úgynevezett ellenoldatban az acetátsó koncentrációja 60 és 140 mM között, de előnyösen 80 és 100 mM között van a kristályosodási folyamat megindulása előtt.

Az  $\text{IFN}\alpha_2$ -oldat és az ellenoldatként szolgáló acetátsó-oldat pH-ját előnyösen egy adott értékre állítjuk be, amely érték hozzávetőleg 4,0 és 7,0 között lehet, de még előnyösebb az oldat pH-ját 5,5 és 6,5 közötti értéken tartani. A pH beállításához minden olyan puffer alkalmas lehet, amely fémekkel nem képez kelátot, így például használhatunk ilyen célra nátrium-acetátot, HEPES-t [4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav] vagy MES-t (4-morfolin-etánszulfonsav).

A kristályosítás során, mind a gőzdíffúziós, mind a folyadékdíffúziós eljárás esetében, előnyösen szabályozott hőmérséklet-grádiens alkalmazunk. A hőmérséklet előnyösen a 7 °C és 22 °C, illetve még előnyösebben a 6 °C és 14 °C közötti tartományba esik, míg a gócképződés rendszerint 9 °C-os indul meg, például a gőzdíffúziós eljárásnál.



A hőmérséklet-indukciós módszereknél a hőmérsékletet előnyösen 1 °C-tól 40 °C-ig növeljük. A hőmérséklet-emelkedés lehet pillanatszerű, de akár néhány napot is igénybe vehet. Előnyösnek az eljárást tartjuk, ha a hőmérsékletet lineáris grádiensst képezve 1-10 nap alatt 4 °C-ról 22 °C-ra emeljük, illetve még előnyösebb, ha a hőmérséklet felső értéke 18 °C, és 4 °C-ról indulva az emelkedés 1-10 nap alatt megy végbe.

A találmány szerinti eljárással előállított kristályos IFN $\alpha_2$  különböző gyógyszerkészítmények alapanyagaként használható. A kristályos alfa-interferonból készíthetünk például szabályozott kioldódású, úgynevezett depó készítményt, amelye szubkután, intramuszkuláris vagy intralézionális injekcióként beadva, testtömegkilogrammonként napi 0,1-1,0  $\mu$ g-nak megfelelő dózis hozzáférhetőségét biztosítja. A találmány szerinti eljárással kapott kristályos anyagból olyan depó készítményt állíthatunk elő, amelynél a kioldódási sebesség számottevően lassúbb, mint az eddigi eljárásokkal, 4 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten kinyert kristályok felhasználásával készült gyógyszerkészítmények esetében. Különösen a találmány szerinti eljárással szobahőmérsékleten (22 °C) kapott kristályokról állíthatjuk, hogy kevésbé hőmérséklet-érzékenyek, mint az alacsonyabb hőmérsékletet igénylő kristályosítási módszerekkel előállított kristályok.

A gyógyszerkészítmények a fiziológiásan hatékony mennyiségű alfa-2-interferont a szokásos gyógyszerészeti vivőanyagok valamelyikével együttesen tartalmazhatják. Elképzelhető olyan megoldás is, hogy a kristályos fehérjéből gyógy-



szertechológiai eljárásokkal — ilyen például a mikrokapszulás — készítünk szabályozott kioldódású gyógyszerformát. Ez esetben a kristályos fehérjét például DL-tejsavból és glikolsavból készült kopolimer bevonattal láthatjuk el, vagy beágyazhatjuk liposzómába.

Az itt következő részben a találmányt példákon is bemutatjuk, a megadott példák azonban csak a szemléltetést szolgálják, és nem lehetnek a találmányra nézve korlátozó érvényűek.

A példákban bemutatott kísérletek során rekombináns — az expresszálas *E. coli*-ban történt, követve Weismann és munkatársai leírását, lásd *Science* 209, 1342 (1980) — humán alfa-2b-interferont használtunk. A sejttenyésztést, a biomassza kinyerését és az extrakciót Leibowitz és munkatársai már korábban publikált (lásd az US 4 315 852 számú szabadalmi iratot) eljárásával végeztük. A kapott extraktum tisztítása végett az alábbi, egyébként általánosan ismert tisztítási lépéseket kombináltuk: etanolos extrakció; immunoaffinitáskromatográfiás (matrix gel blue ligand affinity chromatography); ioncserélő kromatográfia; és gélszűrés. A tisztított IFN $\alpha_{2b}$  készítményt USP minőségű vízzel vagy 0,1 %-os trifluor-ecetsav-oldattal dializáltuk, majd az oldatot liofilizáltuk, aminek eredményeképpen vagy a szabad bázis vagy a megfelelő trifluor-ecetsavas sót kaptuk.



### 1. példa

#### Morfológiailag monoklin kristályos cink-IFN $\alpha_2\beta$ elállítása

Kenyon és munkatársainak az 1992. január 17-én benyújtott, 07/822 504 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben, továbbá az 1992. október 6-án benyújtott, PCT/US92/08296 számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben leírt automata kristályosító rendszerét használjuk. A szilikonozott kristályosító kamra felső fedőlapjáról a 20 mg/ml koncentrációban IFN $\alpha_2\beta$ -t tartalmazó, 5,5 pH-jú, 17 mM nátrium-acetát- és 17 mM cink-acetát-oldat 6  $\mu$ l térfogatú cseppcskéi függenek. A felső lemez a lekent kristályosító kamra alsó részére rátéve, egy üreg felett helyezkedik el, amelyben 1 ml 5,5 pH-jú, 35 mM nátrium-acetát- és 35 mM cink-acetát-oldat található. A 22 °C-on folytatott inkubálás 5. vagy 6. napjától kezdve nagy monoklin kristályok válnak láthatóvá.

### 2. példa

#### Morfológiailag monoklin kristályos cink-IFN $\alpha_2\beta$ elállítása

Ezzel az eljárásváltozattal morfológiailag monoklin kristályos cink-IFN $\alpha_2\beta$ -t állíthatunk elő. Ennél az eljárásnál a 18 mm-es, kör alakú, szilikonozott fedőlappal a 20 mg/ml koncentrációban IFN $\alpha_2\beta$ -t tartalmazó, 6,1 pH-jú, 2,5 mM nátrium-acetát- és 37,5 mM cink-acetát-oldatnak egy 10  $\mu$ l térfogatú cseppje lóg le. A kristályosító kamrát, amely 1 ml 6,1 pH-jú, 5 mM nátrium-acetát- és 75 mM cink-acetát-oldatot tartalmaz, a szilikonozott fedőlappal lezárjuk. A lezárást úgy végezzük, hogy a kamra peremét egy morzsányi nagyvákuumsírral lekenjük,

és vigyázunk arra, hogy a függő cseppecske a kristályosító kamra, vagyis az acetátsó-oldat felett maradjon. 12 °C-on végezzük ezt követően az inkubálást, amikor is mintegy 5 vagy 6 nap alatt nagy, monoklin kristályok keletkeznek.

### 3. példa

#### Morfológiailag monoklin kristályos cink-IFN $\alpha_{2b}$ előállítás

Ezzel az eljárásváltozattal előállíthatunk morfológiailag monoklin kristályos cink-IFN $\alpha_{2b}$ -t. Ennél az eljárásnál egy 10  $\mu$ l térfogatú, 20 mg/ml koncentrációban IFN $\alpha_{2b}$ -t tartalmazó, 6,1 pH-jú, 45 mM cink-acetát-oldatból képződött cseppecske lóg le a szilikonozott fedőlapról. A kristályosító kamra 1 ml 90 mM cink-acetát-oldatot tartalmaz, amelynek a pH-ja 6,1. A lezárást nagyvákuumban zsírral végezzük, vigyázva arra, hogy lelógó cseppecske a kristályosító kamrában a cink-acetát-oldat felett helyezkedjen el. 12 °C-on végezzük az inkubálást, 5 vagy 6 nap után nagy, monoklin kristályok keletkezése figyelhető meg.

### 4. példa

#### Monoklin IFN $\alpha_{2b}$ röntgendiffrakciós adatai

Röntgendiffrakciós vizsgálatokhoz az 1. példában megadott eljárással előállított IFN $\alpha_{2b}$ IFN $\alpha_{2b}$  monoklin kristályait üvegkapillárisba töltjük, majd 22°C-on CuK $\alpha$ -sugárral besugározzuk. A sugárforrás Rigaku RU-300 forgó anódos generátor, amelynek az üzemi paraméterei: 40 kV és 100 mA. Az alapadatokat egy Nicolet X-100A területdetektorral rögzítjük, ugyanazt a sugár-



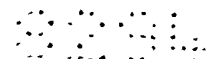
forrást használva.

A kristályok a röntgendiffrakciós vizsgálathoz stabilnak bizonyultak, a diffrakció  $2,7 \times 10^{-10}$  m (Å) felbontásig jól megfigyelhető, de sokkal gyengébb a diffrakciós kép  $3,2 \times 10^{-10}$  (Å) felbontásnál. Különböző kísérletekből származó kristályokat röntgensugár-analízisnek alávetve az eredmények a morfológiai képpel összeegyeztethetők voltak. A kristályok a  $P2_1$  tércsoportbatartoznak, az elemi cella paraméterei:  $a = 63,1 \times 10^{-10}$  m (Å)  $b = 76,6 \times 10^{-10}$  m (Å);  $c = 151,4 \times 10^{-10}$  m (Å);  $\alpha = 90^\circ$ ;  $\beta = 91,2^\circ$ ; és  $\delta = 90^\circ$ . Ezek az elsőként közzétett adatok morfológiailag monoklin kristályos fém-alfa-interferonról.

### 5. példa

#### Folyadékdiffúziós kristályosítási eljárás (lemezek)

Ha szabályozott kioldódású készítményként, kristályszuszpenzió formájában kívánják alkalmazni a hatóanyagot, el kell érniük, hogy a kristályok milligrammos vagy grammos tételben is előállíthatók legyenek. Az ismertetett, gőzdiffúzió alapuló függőcseppes eljárás nem alkalmas arra, hogy fehérjéket így



nagyobb mennyiségben kristályosítsunk, ezért olyan kísérleteket végeztünk, amelyek a gőzdiffúziós függőcsepp eljárás körülményeinek az utánpótlásával lehetővé teszik kristályos IFN $\alpha_2$  előállítását. Kísérleteink során dolgoztuk ki a nagyobb anyagmennyiségek előállítására alkalmas dialízis módszert.

0,5 ml, 40 mg/ml koncentrációban IFN $\alpha_{2b}$ -t tartalmazó, 5,5 pH-jú, 35 mM nátrium-acetát-oldatot belehelyezünk egy mikrodializáló zacskóba, amelynek a molekulatömeg küszöbértéke 5000 kilodalton (Pope Scientific Inc., Menomonee Falls, Wisconsin), és 22 °C-on, 2700 ml 5,5 pH-jú, 35 mM nátrium-acetát-oldattal szemben dializáljuk. A hőmérsékletet 22 °C-on tartva, cseppenként mintegy 2 nap alatt beadagolunk 0,3 M cink-acetátot puffertolt, 5,5 pH-jú oldat formájában. A cink-acetát-oldat hozzátételezésének az a célja, hogy a cink-acetát koncentrációját az IFN $\alpha_{2b}$ -oldatban lassan 35 mM-nak megfelelő szintre növeljük. A cink-acetát-oldat beadagolását követően 1-2 óra múlva csapadék válik le, és szuszpenzió keletkezik. A szuszpenziót naponta mikroszkóp alatt megvizsgáljuk. 2 hét elteltével néhány lemezke figyelmeztető meg a szuszpenzióban. Az átlagosan 70  $\mu$ m méretű lemezek száma a szuszpenzióban naponta növekszik, így 3 hét után a szuszpenzió hozzávetőleg 90 %-ban kristályokat tartalmaz.

#### 6. példa

##### Folyadékdiffúziós kristályosítási eljárás (lemezek)

0,5 ml, 40 mg/ml koncentrációban IFN $\alpha_{2b}$ -t tartalmazó, 5,5 pH-jú, 35 mM nátrium-acetát-oldatot egy 5000 kilodalton



molekulatömeg küszöbértékű mikrodializáló zacskóban (Pope Scientific Inc., Menomonee Falls, Wisconsin) 2700 ml 5,5 pH-jú, 35 mM nátrium-acetát- és 35 mM cink-acetát-pufferoldattal szemben dializálunk. A kapott szuszpenziót 22 °C-on inkubáljuk 3 héten át. A mikroszkópos vizsgálat 3-4 hét után lemezes kristályokból álló kristálymasszát mutat.

#### 7. példa

##### Hőmérséklet-indukciós kristályosítási eljárás (lemezek)

0,5 ml, 40 mg/ml koncentrációban IFN $\alpha_{2b}$ -t tartalmazó, 5,0 pH-jú, 35 mM nátrium-acetát-oldat pH-ját 4 °C-on, 1 M nátrium-hidroxid-oldattal 6,0-ra állítjuk. Az így kapott szuszpenziót belemerítjük egy cirkulációs hűtőfürdőbe (RTE-110, Neslab Instruments Inc., Newington, N.H.), és a vízfürdő hőmérsékletét lineáris gradiens mentén 4 nap alatt 22 °C-ra emeljük. A mikroszkópos vizsgálat 4 nap után lemezes kristályokból álló kristálymasszát mutat.

#### 8. példa

##### Kristályos cink-IFN $\alpha_{2b}$ előállítás a gőzdiffúziós eljárás és a hőmérséklet-indukciós eljárás kombinálásával

Morfológiailag monoklin kristályos cink-IFN $\alpha_{2b}$ -t állíthatunk elő a gőzdiffúziós eljárás és a hőmérséklet-indukciós eljárás kombinálásával. A 20 mg/ml koncentrációban IFN $\alpha_{2b}$ -t tartalmazó, 6,0 pH-jú, 40 mM cink-acetát-oldatból 4 °C-on egy 10  $\mu$ l térfogatú cseppecskét helyezünk el a szilikonozott fedőlemezen. A kristályosító kamrát, amely 1 ml 6,0 pH-jú,



80 mM cink-acetát-oldatot tartalmaz, nagyvákuumsírt alkalmazva a fedőlemezzel lezárjuk, úgy azonban, hogy a cseppecske a fedőlemezen függve maradjon. Ezt követően az egész kamrát elhelyezzük egy 12 °C-ra beállított inkubátorba, ahol 12 °C hőmérsékleten folytatva az inkubálást, 3-5 nap elteltével nagy, monoklin kristályok keletkezését figyelhetjük meg.

#### 9-14. példák

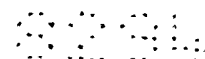
Az előállított cink-IFN $\alpha_{2b}$ -kristályokkal különböző fizikai és biokémiai vizsgálatokat végeztünk, hogy igazoljuk a molekula épségét, meghatározzuk a fehérje cinktartalmát, és bizonyítsuk a szétesést követően a biológiai aktivitás megmaradását.

#### 9. példa

##### Fehérjetartalom meghatározása

A 3. példában leírtak szerint előállított cink-IFN $\alpha_{2b}$  kristály mért mennyiségét 22 °C-on, 2000 ml 5,5 pH-jú, 35 mM nátrium-acetát-oldattal szemben dializáljuk 4 napig, hogy eltávolítsuk a nem komplex kötésben levő cink-acetátot. A szuszpenziót ezután centrifugáljuk, és a mosófolyadékot Pasteur-pipettával eltávolítjuk. A megmosott kristályokat 8 M guanidin-hidriklorid-oldatban 22 °C-on újból feloldjuk, azután a fehérje koncentrációját módosított Bradford-eljárással meghatározzuk, tiszta, humán IFN $\alpha_{2b}$ -t használva referenciavegyületként.

A Bradford-eljárás a strandad Coomassie blue festési el-



járásnak egy módosított változata, ahol az abszorbancia közvetlenül arányos a fehérjekoncentrációval. A részleteket lásd M. Bradford: Anal. Biochem. 72, 248 (1976).

#### 10. példa

##### Nagynyomású-folyadékkromatográfia

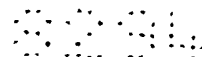
A 3. példában leírtak szerint kapott IFN $\alpha_2$ b-kristályok újbóli feloldásával kapott oldatból pontosan mért mennyiséget analitikai nagynyomású-folyadékkromatográfiás vizsgálatnak (Waters Ass., Milford, MA) vetünk alá. A mintát rávisszük egy 4,6 x 250 mm méretű, RAININ DYNAMIX<sup>(R)</sup> C<sub>4</sub> 300 x 10<sup>-10</sup> m (Å) oszlopra, és az oszlopot koncentrációgrádienst képezve, melynek során 0,1 %-os trifluor-acetát-oldatban az acetonitril arányát 30 perc alatt 27 %-ról 72 %-ra növeljük, eluáljuk. A detektálást egy változtatható hullámhosszú, 280 nm-re beállított Gilson-detektorral végezzük, amelynek az érzékenysége 0,02 abszorbanciaegység. A retenciós idő, valamint a kromatográfiás profil alapján az újra feloldott kristályos anyag, és az eredeti, a kristályosítást megelőző állapotú IFN $\alpha_2$ b között semmiféle különbség nem volt megállapítható.

#### 11. példa

##### Nátrium-dodecil-szulfát—poliakrilamid gélelektroforézis

##### (SDS-PAGE)

Az 1. példában leírtak szerint, gózdifúziós függőcsepp eljárással kapott kristályokat centrifugálunk, és néhányszor mossuk a kiülepített részt, hogy eltávolítsuk az esetleges je-



lenlévő oldható alfa-interferont. A kiülepített kristályokat ezután nátrium-dodecil-szulfátot tartalmazó pufferoldatban feloldjuk, és az oldatot 12 %-os nátrium-dodecil-szulfát—poliakrilamid-gélen elektroforézisnek vetjük alá (SDS-PAGE a "sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis" rövidítéséből kialakult, nemzetközileg ismert rövidítés), referenciavegyületként autentikus IFN $\alpha_{2b}$ -t használva. A módszer részletes leírását lásd U.K. Laemmler: Nature 227, 680 (1970). A vizsgálattal semmiféle különbséget nem tudtunk megállapítani a feloldott kristályok és a referenciavegyületként szolgáló IFN $\alpha_{2b}$  között, ami azt jelenti, hogy az anyag molkulatömege nem változott. Az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy nincs látható jele annak, miszerint a kristályosítás folyamán, vagy az azt követő feloldáskor az anyag kémiai vagy enzimatis változáson nem volna keresztül.

A 10. és 11. példákban leírt kísérletek eredményeiből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a fehérje kristályosítása közben, valamint az eredeti állapot helyreállításakor semmiféle kémiai átalakulással, mint ahogy denaturálódással sem kell számolnunk.

### 12. példa

#### A cink-IFN $\alpha_{2b}$ fizikai tulajdonságai

Az 1. példában megadottak szerint előállított kristályok tulajdonságait olyan szempontból vizsgáltuk, hogy megfelelnek-e a szabályozott kioldódású gyógyszerkészítményekkel szemben támasztott követelményeknek. A megfigyeléseket mikrosz-

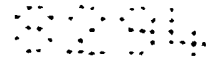


kóppal végzetük, és vizsgáltuk a kristályok stabilitását 4 °C-on, valamint testhőmérsékleten, 37 °C-on. Ugyancsak vizsgálatnak vetettük alá a kristályokat, hogy cinket nem tartalmazó, különböző pH-jú pufferoldatokban, 18 órás időtartamot tekintve mennyire bizonyulnak stabilnak. Megállapítottuk, hogy a kristályok mind 37 °C-on mind 4 °C-on, 5,0 és 6,0 közötti pH-értékek mellett 24 órán át stabilnak bizonyultak. E tulajdonságuk tekintetében jelentősen különböznek a korábban előállított kristályos IFN $\alpha_{2b}$  készítményektől, de különösen a Nagabhushan és munkatársai ("Characterization of Genetically Engineered alpha-2 Interferon", in: Interferon: Research, Clinical Application and Regulatory) által leírtak szerint kapott kristályoktól, mivel azok 6,0-nál alacsonyabb pH-értéknél, továbbá 4 °C-on 6,0-os pH-értéknél is könnyen feloldhatók.

### 13. példa

#### A komplexen kötött cink és az interferon mólaránya

Ezt a kísérletet azzal a céllal végeztük, hogy megállapítsuk a komplexen kötött cinknek az IFN $\alpha_{2b}$ -hez viszonyított mólarányát. A 3. példában leírtak szerint előállított cink-IFN $\alpha_{2b}$ -kristályokból elkülönített mintát a nem komplex kötésben levő cink eltávolítása végett 2000 ml 5,5 pH-jú, 35 mM nátrium-acetát-oldattal szemben 4 napig dializálunk. A ki mosott szuszpenzióhoz 8,0 M guanidin-hidroklorid-oldatot adva, a komplexet feloldjuk, majd az oldatnak Bradford szerint meghatározzuk a fehérjetartalmát. Egyidejűleg ugyanannak a szuszpenzióknak atomadszorpciós analízissel meghatározzuk a



cinktartalmát is, és a két eredményt összevetve kiszámíthatjuk, hogy a cinkionoknak az  $\text{IFN}\alpha_{2b}$ -re vonatkoztatott mólaránya 3,1:1. Más kísérletből kapott anyagokkal is elvégezve a vizsgálatot azt találtuk, hogy a komplexben az  $\text{IFN}\alpha_{2b}$  minden móljára 2-4 mól cinkion esik.

#### 14. példa

##### Sejtkárosító hatás gátlásán alapuló aktivitásmérés (CPE assay)

Annak eldöntésére, hogy vajon a kristályos  $\text{IFN}\alpha_{2b}$  megtartotta-e biológiai aktivitását, a sejtkárosító hatás (CPE = cytopathic effect) gátlásán alapuló méréseket végeztünk. Erre a célra az encephalomyocarditis-vírust (EMC; ATCC VR-129B törzs) használjuk, amelynek a szaporítását egyrétegű Vero-sejt tenyészetben végezzük, majd "A" tápoldatban lefagyasztva tároljuk. [Az "A" tápoldat összetétele a következő: 950 ml Minimum Essential Medium Eagle, Earle-féle pufferolt, fiziológiás nátrium-klorid-oldattal (Gibco Inc.), 100 ml magzati borjúújszérum, 36 ml 7,5 %-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldat, 20 ml, fiziológiás nátrium-klorid-oldattal készült 1 M HEPES-pufferoldat, 20 ml 200 mM L-gluatmin-oldat és 10 ml penicillin—sztreptomycin-oldat (10 000 egység K-penicillin/ml és 10 000  $\mu\text{g}$  sztreptomycin-szulfát/ml)]. A tenyésztő palackban összefüggő FS-71 sejtekből kialakult egysejtréteget Hank-féle pufferolt, fiziológiás nátrium-klorid-oldattal mossuk, majd 37 °C-on, 10 percig 2,5 %-os tripszinoldattal inkubáljuk. A sejteket tartalmazó tripszinoldatot ezután "A" tápoldattal olyan mértékben hígítjuk, hogy a koncentrációja  $3,5 \times 10^5$  legyen, és



a sejtszuszpenziót használjuk fel az aktivitásméréshez.

A vírusellenes hatás meghatározására szolgáló biológiai aktivitásmérés kivitelezése egy 96 kísérletihelyes mikrotitráló tálcán történik. A vizsgálandó mintákat elhelyezzük a megfelelő lyukakba, azután a tálcán végig sorozathígítást végzünk 1:2 arányban. Minden egyes tálcán 24 lyukba csak "A" tápoldat kerül, ezek szolgálnak a vírus és a sejt kontrolljaként. A laboratóriumi standard alfa-2b-interferon készítményből, amely milliliterenként 600 NE alfa-2b-interferont tartalmaz, 1 NE/ml koncentrációnak megfelelő hígítást készítünk, ugyanis ez a koncentráció szükséges ahhoz, hogy 50 %-os védelmet nyújtson a vírusfertőzés ellen, és ennek a hígított oldatnak minden kísérleti helyre történő eljuttatása azt eredményezi, hogy ilyen módon a minták relatív vírusellenes hatását tudjuk meghatározni, illetve összehasonlítani, végig a teljes tálcán. Ezt követően minden egyes kísérletihelyre 0,1 ml "A" tápoldatban  $3,5 \times 10^4$  sejtet juttatunk, így ezeket a mikrotenyészeteket beoltjuk. A tálcát lefedjük és 5 % szén-dioxidot tartalmazó atmoszférában, 37 °C-on, 4 órán át inkubáljuk. Az inkubálást követően az egyes lyukakban található tenyészeteket, kivéve a kontrollként szolgálókat, EMC-vírussal befertőzzük. E célra a vírusszuszpenziót olyan koncentrációban használjuk, hogy az 16-18 óra elteltével 90-100 %-os fertőződést idézzen elő — ez hozzávetőleg  $1,54 \times 10^4$  pfu/ml (pfu = plaque forming unit; a vírusszuszpenzió fertőzőképességét, azaz a titerét mutató mérőszám). A tálcákat ismét lefedjük, és 5 % szén-dioxidot tartalmazó atmoszférában, 37 °C-on folytat-



juk az inkubálást mindaddig, amíg a kontrollkísérletet tartalmazó lyukak alapján legalább 90 %-os citopátiás hatást (CPE) lehet megállapítani. A tápoldatot ekkor leszívátjuk a lyukakból, és az egysejtréteget 0,1 ml kristályibolya-oldattal megfestjük, mintegy 30 percig rajta hagyva az oldatot. A kristályibolya-oldatot dekantáljuk, majd a táclát óvatosan lemosuk és levegőn hagyjuk megszáradni. A vírus- és sejtkontrollként szolgáló kísérleti helyeken a fertőződést az egysejtréteg mikroszkóppal vagy mikroszkóp nélkül történő vizuális vizsgálatával meghatározzuk, és az eredményt 1-től 4-ig terjedő pontozással értékeljük (1 pont 10 % alatti CPE; 4 pont = 90 % feletti CPR). Ezután következik a vizsgálati mintákat tartalmazó kísérleti helyek értékelése, a kontrollal összehasonlítva elvégezve a pontozást. Minden egyes minta esetében a kontrollal összevetve, vizuálisan történik a kiértékelés. Az 50 %-os gátlást a minták esetében úgy állapítjuk meg, hogy a standard minták közül közvetlen összehasonlítással kiválasztjuk azokat a kísérletihelyeket, amelyekhez a kapott kép alapján a legközelebb állnak. Így az 50 %-os gátlást okozó helynek a standardhoz viszonyított eltolódásából megállapítható a standardhoz viszonyított titer értéke. Ha az eltolódás  $X$  számú kísérletihelynek felel meg, akkor ez annyit jelent, hogy a standardhoz viszonyított hatékonyság a standard  $2^X$ -szere-se, mivel  $X = (50 \text{ %-os mintaszám}) - (50 \text{ %-os standard mintaszám})$ .

A vizsgálat menetéről S. Rubinstein, P.C. Familetti és S. petska [J. Virol, 37, 755 (1981)] részletes ismertetést adnak.



### 15. példa

#### A cink-alfa-2b-interferon-komplex alkalmazása szabályozott kioldódású gyógyszerkészítmény előállításához protamin vivőanyaggal

Megterveztünk egy in vivo kísérletet annak megállapítására, hogy a kristálysuszpenzió alkalmas-e a "GRAS" kategóriának megfelelő, szabályozott kioldódású, szubkután injekciós készítmény előállításához. A 7. példában leírtak szerint kapott IFN $\alpha_{2b}$  felhasználásával 5,5 pH-jú, 10 mM nátrium-acetát-10 mM cink-acetát- és 0,4 mM protamin-szulfát-oldatban steril IFN $\alpha_{2b}$ -szuszpenziót készítettünk, amely  $34 \times 10^6$  NE/dózis koncentrációnak felelt meg. A szuszpenziót két majom (*Macacus cynomolgus*) hátsó részében, vesetájékon a bőr alá befecskendeztük, és 1, 3, 6, 10, 24, 48 és 72 óra elteltével vérmintát vettünk, amelyből aktivitásméréssel (CPE assay) meghatároztuk a szérum interferonszintjét. Ilyen módon az idő függvényében megkaptuk a vérben található IFN $\alpha$  koncentrációját, ezeket átlagoltuk, és grafikusán ábrázoltuk. Az 1. ábrán a 12-es számmal jelölt görbe a két majomban mért átlagos alfa-interferon-szintet mutatja az idő függvényében, a sejtkárosító hatás gátlása alapján végezve a meghatározást.

### 16. példa

#### Kontrollvizsgálat

A 15. példában leírtak szerint elvégzett kísérletben kapott eredmények jelentősen eltérnek a jelen kísérlet ered-



ményétől, amikor is nem kristályos  $\text{IFN}\alpha_{2b}$ -ből fiziológias nátrium-klorid-oldattal és foszfátpufferrel állítottuk elő az injekciós készítményt. Egy majom (*Macacus cynomolgus*) a vesetájékon bőr alá fecskendezve  $50 \times 10^6$  NE dózist kapott, azután 0, 1,3, 6, 10, 24, 48 és 72 óra múlva mértük a vérszérum interferonszintjét. A mérést ez alkalommal is a sejtkárosító hatás gátlásán alapuló aktivitásméréssel (CPE assay) végeztük, és a kapott koncentrációértékeket az idő függvényében grafikusán ábrázoltuk. Az 1. ábrán a 10-es számmal jelölt görbe mutatja az eredményt.

A 15. és 16. példában leírt kísérletek eredményéből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy kristályos cink-alfa-interferont protamin ivóanyaggal beadva, a szérumban lényegesen hosszabb ideig kimutatható az  $\text{IFN}\alpha$ , mint a technika jelenlegi állását reprezentáló, a 16. példában megadott kísérleti elrendezésben. Mind ezeken túlmenően a kísérleti eredmények alátámasztják azt a lehetőséget, hogy a cink-interferon kristályos formájából készült szuszpenzió szabályozott kioldódású készítményként nyerhet alkalmazást. A kristályos komplex a bemutatott, dialízisen vagy hőmérséklet-indukción alapuló eljárásokkal nagyobb mennyiségben is gyártható. A gyártási eljárásokkal előállított kristályok mérete az 1 és  $200 \mu\text{m}$  közötti tartományba esik, ami éppen megfelelő injekciós termék előállításához, az ilyen szemcseméret ugyanis tuberkulin-fecskendővel beadható.



### 1. Táblázat

Kristályos IFN $\alpha$ -szuszpenzió és nem kristályos IFN farmakokinetikai profilja majokban

	Az 1. ábra szerinti 10-es számmal jelölt görbéhez tartozó adatok:	Az 1. ábra szerinti 12-es számmal je- lölt görbéhez tar- tozó adatok:
$C_{max}$	8 000	1 500
$T_{max}$	3	3
AUC (tf)	20 225	16 812
tf	6	24

$C_{max}$  NE/ml = maximális plazmakoncentráció

$T_{max}$  óra = a maximális plazmakoncentráció eléréséig eltelt idő

AUC (tf) NE.óra/ml = a plazmakoncentráció—idő-görbe alatti terület 0 órától az utolsó mérhető minta időpontjáig

tf óra = az eltelt idő az utolsó mérhető minta levételéig.

### 2. Táblázat

Aktivitásmérés (CPE assay) alapján meghatározott szérumszintek az idő függvényében

Idő (óra)	Az 1. ábra szerinti 10-es számmal jelölt görbéhez tartozó adatok:	Az 1. ábra szerinti 12-es számmal je- lölt görbéhez tar- tozó adatok:
0	0	0
1	0	676
3	8 000	1 500
6	150	900
10	0	114
24	0	0
48	0	0
72	0	0



17. példa

Kristályos kobalt-alfa-2b-interferon-komplex előállítás

Kenyon és munkatársainak az 1992. január 17-én benyújtott, 07/822 504 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésében, továbbá az 1992. október 6-án benyújtott, PCT/US92/08296 számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben leírt automata kristályosító rendszerét használjuk. A szilikonozott kristályosító kamra felső takarólapjára 20 mg/ml koncentrációban alfa-2b-interferont tartalmazó, 4,6 pH-jú 17 mM nátrium-acetát- és 22 mM kobalt-acetát-oldat egy 6  $\mu$ l térfogatú cseppjét helyezük, majd a fedőlapot megfordítva rátesszük a lekent kristályosító kamra alsó részére, hogy a cseppecske a fedőlapról lefelé lógjon. A kamra alsó részében egy üreg található, amely 1 ml 4,6 pH-jú, 35 mM nátrium-acetát- és 45 mM kobalt-acetát-oldatot tartalmaz. A 22 °C-on folytatott inkubálás 5. vagy 6. napjától kezdve a mikroszkópos vizsgálat kristályok jelenlétét mutatja.

18. példa

Kristályos cink-IFN $\alpha_{2b}$  előállítása lítium-acetátot tartalmazó kristályosító pufferoldatban

A szilikonozott fedőlap alsó felére 20 mg/ml koncentrációban IFN $\alpha_{2b}$ -t tartalmazó, 6,1 pH-jú, 37,5 mM cink-acetát- és 2,5 mM lítium-acetát-oldat egy 10  $\mu$ l térfogatú cseppjét helyezük. A kristályosító kamra 1 ml 6,1 pH-jú, 75 mM cink-acetát- és 5,0 mM lítium-acetát-oldatot tartalmaz. A fedőlappal nagyvákuumzsírt alkalmazva zárjuk le a kamrát, és 12 °C-on



folytatjuk az inkubálást, aminek eredményeképpen 5-6 napon belül monoklin kristályok jelennek meg.

19. példa

Kristályos cink-IFN $\alpha_2$ b előállítására kálium-acetátot tartalmazó kristályosító pufferoldatban

A szilikonozott fedőlap alsó felére 20 mg/ml koncentrációban IFN $\alpha_2$ b-t tartalmazó, 6,1 pH-jú, 37,5 mM cink-acetát- és 2,5 mM kálium-acetát-oldat egyetlen 10  $\mu$ l térfogatú cseppecskéjét helyezük, majd a fedőlappal, nagyvákuumzsírt használva, lezárjuk a kristályosító kamrát, amely 1 ml 6,1 pH-jú, 75 mM cink-acetát- és 5,0 mM kálium-acetát-oldatot tartalmaz. A 12 °C-on folytatott inkubálás 5. vagy 6. napján nagy monoklin kristályok megjelenését észleljük.

A fenti példákban a találmány megvalósításának speciális eseteit írtuk le, és teljesen nyilvánvaló, hogy a témában jártas szakember számos változtatást vagy módosítást, esetleg újabb eljárásváltozatokat tudna javasolni, mindazonáltal ki kell jelentenünk, hogy az ilyenféle módosítások vagy változtatások a találmány lényegét nem érintik, ezért mindenképpen annak oltalmi körébe tartoznak.





## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Morfológiailag monoklin kristályos cink-IFN $\alpha_2$ b.
2. Az 1. igénypont szerinti kristályos cink-IFN $\alpha_2$ b, amelynek a kristálysai röntgensugár-analízisnek alávetve a röntgensugarakat hozzávetőleg  $3 \times 10^{-10}$  m (Å) hullámhossz-ig térítik el.
3. A 2. igénypont szerinti cink-IFN $\alpha_2$ b, amelyben az interferon komponens IFN $\alpha_2$ b, vagyis a kristályos komplex cink-IFN $\alpha_2$ b.
4. A 3. igénypont szerinti kristályos IFN $\alpha_2$ , amelynek a kristályai a P2 $_1$  tér csoportba tartoznak, és az elemi cella paraméterei a következők:  $a = 151,4 \times 10^{-10}$  m (Å)  $b = 76,6 \times 10^{-10}$  m (Å);  $c = 63,1 \times 10^{-10}$  m (Å);  $\alpha = 90^\circ$ ;  $\beta = 91,2^\circ$ ; és  $\gamma = 90^\circ$ .
5. A 4. igénypont szerinti cink-IFN $\alpha_2$ b, amelyben az interferon komponens IFN $\alpha_2$ b, azaz a kristályos komplex cink-IFN $\alpha_2$ b.
6. Az 1. igénypont szerinti kristályos cink-IFN $\alpha_2$ b, amely kristályos cink-IFN $\alpha_2$ b egy gyógyszerészetileg elfogadható pufferben, 37 °C-on legalább 24 órán át stabil.
7. Az 1. igénypont szerinti kristályos cink-IFN $\alpha_2$ b, amely kristályos cink-IFN $\alpha_2$ b egy olyan gyógyszerészetileg elfogadható pufferben, amelynek a pH-ja 5 és 6 között van, 4 °C és 37 °C közötti hőmérsékleten legalább 24 órán át stabil.
8. Kristályos IFN $\alpha_2$ , amely kristályos IFN $\alpha_2$  egy olyan gyógyszerészetileg elfogadható pufferben, amelynek a pH-ja 5



és 6 között van, 37 °C-on legalább 24 órán át stabil.

9. A 8. igénypont szerinti kristályos  $\text{IFN}\alpha_2$ , amely kristályos  $\text{IFN}\alpha_2$  egy olyan gyógyszerészetileg elfogadható pufferben, amelynek a pH-ja 5 és 6 között van, a 4 °C és 37 °C-on közé eső hőmérséklet-tartományban legalább 24 órán át stabil.

10. Kristályos cink- $\text{IFN}\alpha_2$ , amelyben a cinkionok és az  $\text{IFN}\alpha_2$  egy mól  $\text{IFN}\alpha_2$ -re 2-4 mól cink jut.

11. A 10. igénypont szerinti cink- $\text{IFN}\alpha_2$ , amelyben az interferon komponens  $\text{IFN}\alpha_{2b}$ , azaz a kristályos komplex cink- $\text{IFN}\alpha_{2b}$ .

12. Kristályos kobalt- $\text{IFN}\alpha_2$ .

13. A 12. igénypont szerinti kobalt- $\text{IFN}\alpha_2$ , amelyben az interferon komponens  $\text{IFN}\alpha_{2b}$ , azaz a kristályos komplex kobalt- $\text{IFN}\alpha_2$ .

14. Kristályos  $\text{IFN}\alpha_2$ , amelynek a felezési ideje a szérumban legalább 12 óra, ha egy főemlősnek szubkután injekció formájában beadjuk.

15. A 14. igénypont szerinti kristályos  $\text{IFN}\alpha_2$ , amely kristályos  $\text{IFN}\alpha_2$  kristályos cink- $\text{IFN}\alpha_2$ .

16. A 15. igénypont szerinti kristályos cink- $\text{IFN}\alpha_2$ , amelyben az interferon komponens  $\text{IFN}\alpha_{2b}$ , azaz a kristályos komplex cink- $\text{IFN}\alpha_{2b}$ .

17. Eljárás kristályos fém- $\text{IFN}\alpha_2$  előállítására, azzal jellemezve, hogy  $\text{IFN}\alpha_2$ -ből oldható fémkomplexet képezünk, és az oldható fém- $\text{IFN}\alpha_2$ -komplexet oldatban a fém ecetsavas sójával egyensúlyba hozzuk, olyan körülmények között, ami azt eredményezi, hogy a fém- $\text{IFN}\alpha_2$ -komplex-oldat túltelítetté vá-



lik, és kristályos fém-IFN $\alpha_2$  keletkezik.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy fémkomplexben a fém cink vagy kobalt.

19. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oldatok egyensúlyba hozását gőzdiffúziós módszerrel, folyadékdifúziós módszerrel vagy hőmérséklet-indukciós módszerrel, illetve ezek kombinálásával végezzük.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kristályosodás megindulásának időpontjában a fém-IFN $\alpha_2$ -komplex koncentrációja az oldatban az 5 mg/ml és 80 mg/ml közötti tartományba esik.

21. Morfológiailag lapkristályos cink-IFN $\alpha_2$ .

22. Morfológiailag túkristályos cink-IFN $\alpha_2$ .

A meghatalmazott

**Békány László**  
szabványügyi vezető  
az S.B. Co. zrt. Szervezője  
Szabványügyi Testület tagja  
H-1062 Budapest, Aranybányai út 113.  
Telefon: 34 21 930; fax: 34 24 323

*Azaz  
Gyula*

1/1

