

(11) Patent numeris: **4051** (51) Int. Cl.⁶: **A61K 38/18**
A61K 9/08
(21) Paraiškos numeris: **96-011** **A61K 9/19**

(22) Paraiškos padavimo data: **1996 02 19**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1996 07 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 10 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US 94/09245**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1994 08 16**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1996 02 19**

(31, 32, 33) Prioritetas: **109798, 1993 08 20, US**

(72) Išradėjas:

Victoria M. Knepp, US
Deborah M. Lidgate, US
Richard Maskiewicz, US
Leo Gu, US

(73) Patent savininkas:

SYNTEX (U.S.A.) INC., 3401 Hillview Avenue, Palo Alto, CA 94304, US

(74) Patentinis patikėtinis:

Liudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Nervų augimo faktoriaus farmacinės kompozicijos

(57) Referatas:

Pateikiamas žmogaus nervų augimo faktoriaus (NGF) stabilios vandeninės farmacinės kompozicijos vandeniniuose buferiniuose tirpaluose, kad palaikytų pH 4,5-6,0 ribose, ir fakultatyviai kaip nešiklį turinčios žmogaus serumo albuminą (HSA). Taip pat pateikiamos vandeninės NGF kompozicijos, tinkamos liofilinimui ir vėlesniam atstatymui, kurių rhNGF sumaišoma su cukrais, fakultatyviai su HSA ir buferiu. Kompozicijos gali būti naudojamos gydant Alzheimerio ligą ir kitus neuroninius sutrikimus.

Šis išradimas susijęs su nervų augimo faktoriaus farmacinėmis kompozicijomis. Šis išradimas taip pat liečia nervų augimo faktoriaus kompozicijas, tinkančias liofilinimui.

5

Ląstelių augimą ir gyvavimą reguliuoja gausybė polipeptidų ir proteinų; tokios molekulės vadinamos augimo faktoriais. Augimo faktorių pavyzdžiai apima epiderminį augimo faktorių (EGF), rūgštinį bei šarminį fibroblastų augimo faktorių (aFGF bei bFGF), trombocitų kilmės augimo faktorių (PDGF), blakstienų neurotrofinį faktorių (CNTF) ir nervų augimo faktorių (NGF). NGF yra pirmasis identifikuotas ir charakterizuotas iš šių faktorių (Levi-Montalcini, R., et al., J. Exp. Zool., 116:321, 1951).

15 NGF palankiai veikia kai kurių tipų neuroninių ląstelių gyvavimą bei aktyvumą. Be to, NGF paspartina nesubrendusių neuroninių ląstelių diferenciaciją į pomitotinius subrendusius neuronus.

Pelių požandinės liaukos NGF valymas baigiamas komplekso, susidedančio iš trijų subvienetų - α , β ir γ - identifikavimu. Manoma, jog visas NGF neurotrofinis aktyvumas priklauso nuo β subvieneto, susidedančio iš 118 amino rūgščių proteino, turinčio apytikriai 13,000 Da molekulinį svorį (Varon, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 57:1782-1789, 1967; Green, L.A., et al., Neurobiol., 1:37-48, 1971). β subvienetai tirpale sudaro dimerus, kurių molekulinis svoris apytiksliai 26,500 Da.

NGF pasirodė esąs efektyvus, gydant kai kuriuos periferinės bei centrinės nervų sistemos degeneracinius susirgimus. Parodyta, jog NGF skyrimas gali būti naudingas, gydant susirgimus, kuriuose NGF trūkumas, jo receptoriaus patologija arba pokyčiai jų perdavime bei viduląsteliniam perdirbime sąlygoja neuroninės funkcijos sumažėjimą, atrofiją ar net ląstelių mirtį. Tokios ligos apima paveldimas sensorines ir motorines neuropatijas, paveldimą bei sporadiškai pasitaikančią organizmo

degradaciją, atrofinę lateralinę sklerozę, Parkinsono bei Alzheimerio ligas (Goedert, M., et al., Mol. Brain Res., 1:85-92, 1986; Mobley, W.C., et al., Soc. Neurosci. Abstr., 13:186, 1987; Mobley, W.C., et al., Soc. Neurosci. Abstr., 4:302, 1988; Hefti, F., et al., Ann. Neurol., 20:275-281, 1986). Manoma, jog NGF sumažina ląstelės mirties tikimybę po kai kurių toksinų, pav., 6-hidroksi-dopamino (Aloe, L., Arch. Ital. Biol., 113:326-353, 1975), vinblastino bei kolchicino (Menesini-Chen, M.G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5559-5563, 1977; Jonson, E.M., Brain Res., 141:105-118, 1978) ir kapsaicino (Otten, U., Nature, 301:515-577, 1983) poveikio.

Aukšta NGF mRNA ekspresija hipokampuse, srityje, kuri susijusi su atmintimi ir erudicija, leidžia manyti, jog klinikinis NGF vartojimas galėtų būti efektyvus, gydant silpnaprotiškumą (Kaisho, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Com., 174:379-385, 1991). Yra žinoma, kad intraventrikuliarinis NGF skyrimas užkerta kelią priekinių smegenų bazalinių cholinerginių neuronų žūčiai po aksotomijos, tai rodo, jog NGF gali būti efektyvus, padidinant ląstelės gyvybingumą po sužalojimo (Hefti, F., J. Neurosci., 6:2155-2162, 1986; Williams, L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:9231-9235, 1986; Kromer, L., Science, 235:214-216, 1987).

NGF panaudojimas terapijoje kelia dideles problemas. Tai susiję su: 1) NGF bioaktyvumo palaikymu, kuris gali keistis ruošimo, valymo bei laikymo metu; 2) NGF, kaip reliatyviai didelės hidrofiliinės molekulės įvedimu tokiu būdu, kad šios molekulės kiekis, galintis pasiekti aktyvius centrus, būtų efektyvus. NGF, kaip ir kitų proteinų, bioaktyvumas priklauso nuo jų antrinės bei tretinės struktūros. NGF β subvienetas turi tris vidinius disulfidinius ryšius, svarbius bioaktyvumui (Kanaya, E., et al., Gene, 83:65-74, 1989; Iwane M., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 171:116-122, 1990; Hu, G.-L. and

Neet, K.E., Gene, 70:57-65, 1988). Be to, jei koks nors proteinas yra denatūruotas, biologiškai aktyvaus NGF kiekis yra mažesnis. Dėl to proteino vientisumas jo ruošimo ir laikymo metu turi būti išlaikomas taip pat, 5 kaip ir skyrimo metu. Proteinai ypatingai linkę degraduoti prie aukštesnių temperatūrų.

Žemesnės temperatūros dažniausiai mažina proteino skilimą. Tačiau yra ekonomiškiau proteiną laikyti kambario temperatūroje, pav., apytiksliai 25°C 10 temperatūroje, negu šaldytuve apytiksliai 4°C temperatūroje. Todėl pageidautina, kad kompozicija būtų stabili, laikant kambario arba apytiksliai 4°C temperatūroje.

Be to, prie stabilumo problemų prisideda tai, jog NGF, 15 kaip ir dauguma kitų proteinų, nespecifiškai prisijungia prie paviršių. Toks nespecifinis prisirišimas gali įvykti prie daugelio medžiagų, įskaitant stiklą ir plastmasę, pav., polietileną bei polipropileną. Šios medžiagos gali būti buteliukų, vamzdelių, švirkštų, implantuojamų 20 infuzinių įtaisų ar bet kokio kito paviršiaus formoje, kuri gali kontaktuoti su NGF jo ruošimo, laikymo ar skyrimo metu.

Kiti sunkumai, skiriant terapiniam vartojimui tokius proteinus kaip NGF, yra jų bloga absorbcija kūne ir 25 degradacija, veikiant skrandžio rūgštims. Todėl peroralinis skyrimas aplanai yra netinkamas. Absorbcijos barjerams įveikti tokių proteinų injekcijos ir infuzijos gali būti neišvengiamos.

Injekcija yra efektyvi, kai gydoma vieta lengvai 30 pasiekama. Tačiau jeigu vieta, tokia kaip CNS, yra reliatyviai nepasiekama, ilgesniam preparato skyrimui gali būti patogesnė nepertraukiama infuzija. Toks skyrimas gali būti nepraktiškas dėl įvairių komplikacijų. Pav., nepertraukiama infuzija gali būti realizuota, 35 implantavus į smegenis NGF siurbliukus, bet ilgas proteino laikymas kūno temperatūroje dažnai sąlygoja proteino degradaciją. Taipogi papildomi praradimai gali

būti dėl proteinų adsorbcijos siurbliuko kameroje per tam tikrą laiką.

Be problemų, susijusių su NGF skyrimu, iškyla naujos problemos, surištos su NGF ilgo laikymo terminu nuo jo
5 pagaminimo iki paskyrimo. Liofilinimas yra vienas iš būdų, kaip ilgai išlaikyti biologinius proteinus, sustabdamas jų degradaciją, agregaciją ir/ar nespecifinę adsorbciją. Tačiau pats liofilinimo procesas iššaukia taip pat sunkumų. Kadangi šaldymo metu skysčio tūris
10 mažėja, efektyvios druskos koncentracija dramatiškai auga, kas gali denatūruoti proteiną, sumažinant efektyvų terapinį aktyvumą dar iki proteino atstatymo. Be to, ledo kristalų susidarymas šaldymo metu gali sąlygoti denatūraciją ir taip pat mažina gaunamo bioaktyvaus NGF
15 efektyvų kiekį. Tokiu atveju kompozicija turi būti tokia, kad užkirstų kelią druskos koncentracijos svyravimams ir iki minimumo sumažintų ledo kristalų susidarymą.

Vienas šio išradimo tikslų yra sukurti NGF vandenines kompozicijas, kurios išlaiko bioaktyvumą mažiausiai vieną
20 mėnesį temperatūrų intervale 4-40°C.

Kitas šio išradimo tikslas yra sukurti NGF kompozicijas, kuriose bioaktyvumas išlieka po liofilinimo ir atstatymo. Dar kitas išradimo tikslas yra rasti būdus ilgai išlaikyti biologiškai aktyvų NGF tirpale.

25

Šio išradimo objektas yra nervų augimo faktoriaus stabilios kompozicijos, kurios gali būti laikomos žemesnėje negu aplinkos, aplinkos ir aukštesnėje temperatūroje be žymesnių proteino kiekio ar aktyvumo
30 nuostolių. Kompozicijos yra vandeniniai tirpalai, kuriuos sudaro:

- (a) nervų augimo faktorius;
- (b) biologiškai priimtinas, vandenyje tirpus nešėjas (fakultatyviai);
- 35 (c) pakankamas kiekis biologiškai priimtinos druskos izotoniškumui palaikyti;
- (d) buferis, palaikantis kompozicijos pH intervale

apytiksliai 4,5-6,0;

(e) vanduo.

Kitu aspektu šis išradimas pateikia NGF farmacinės kompozicijas, tinkančias liofilinimui.

5 Šios farmacinės kompozicijos, tinkančios liofilinimui, yra vandeniniai tirpalai, sudaryti iš:

(a) nervų augimo faktoriaus ;

(b) biologiškai priimtino užpildo;

(c) buferio, palaikančio kompozicijos pH intervale
10 apytiksliai 5,5-6,5;

(d) biologiškai priimtino vandenyje tirpaus nešėjo
(fakultatyviai);

(e) vandens.

15 Sekančios šio išradimo išraiškos yra liofilintos kompozicijos, iš kurių žymia dalimi buvo pašalintas vanduo. Šios liofilintos kompozicijos, atstačius jas atstatomuoju tirpikliu, fakultatyviai turinčiu biologiškai priimtina nešėją, yra tinkamos skirti pacientams, kuriems reikalinga terapija.

20 Šis išradimas taip pat pateikia NGF laikymo vandeninėse kompozicijose būdą temperatūrų intervale 4-40°C.

Kita šio išradimo išraiška yra šio išradimo NGF kompozicijos panaudojimas žmonių neuroninių disfunkcijų gydymui, skiriant terapiškai efektyvų kiekį.

25

Stabilių parenteralinių NGF dozavimo formų kūrimas reikalauja, jog būtų įvertinta daugybė faktorių, apimant skyrimo būdą, adsorbcines sąveikas, gamybos įrenginių ir galimų tiekimo priemonių suderinamumą. Tolimesnis dėmesys
30 skiriamas NGF stabilumui vandeninėse kompozicijose, esant žemesnei už aplinkos, aplinkos ir aukštesnei temperatūroms. Viena šio išradimo išraiška yra NGF kompozicija vandeniniame tirpale, kuris stabilus temperatūrų intervale, ypač prie aukštesnių (mažiausia
35 apie 40°C). Kompozicija susideda iš NGF vandeninio tirpalo, druskos ir buferio, kurio pH yra apytiksliai 4,5-6,0. Be to, kompozicija gali turėti nešėją. Ši

komponentų kombinacija tirpalui nelauktai suteikia labai tinkamas charakteristikas, ypač kas liečia stabilumą aukštesnėse temperatūrose. Taipogi pateikiama NGF kompozicija, tinkanti liofilinimui. Šis išradimas taip pat siūlo NGF laikymo būdą.

Terminas "biologiškai priimtinas" čia panaudotas medžiagoms, pasižyminčioms tuo, jog neturi žalingų fiziologinių efektų in vivo. Kambario temperatūra yra apytiksliai 22-25°C. Kūno temperatūra yra apytiksliai 36-40°C. Terminas "liofilizuotina kompozicija" reiškia NGF vandeningą kompoziciją, kuri gali būti šaldoma-džiovinama iki drėgmės kiekio ne didesnio negu 2% ir kuri išlaiko ne mažiau 70% pradinio NGF bioaktyvumo po atstatymo. Terminas "izotoninis" liečia tirpalą, turintį apytiksliai tą patį osmotinį slėgį, kaip kraujo serumas, t.y. apytiksliai 300 mM/l. Nešėjas yra biologiškai priimtinas emulgatorius, disperguojantis agentas, paviršiaus aktyvi medžiaga ar proteinas, kuris mažina NGF adsorbciją ant paviršiaus.

"NGF" žymi bet kokią nervų augimo faktoriaus formą, pirmenybę atiduodant nervų augimo faktoriaus β subvienetui, kuris rodo biologinį aktyvumą ir prisiriša prie NGF receptoriaus. Terminas NGF taip pat apima NGF hibridizuotas ir modifikuotas formas, kurios prisiriša prie NGF receptoriaus ir išlaiko NGF bioaktyvumą. NGF modifikuotos formos apima jungiamuosius proteinus, aprašytus Iwai, S., et al., Chem. Pharm. Bull., 34:4724-4730, 1986 ir Kanaya, E., et al., Gene, 83:65-74, 1989, bei NGF fragmentus ir hibridus, kuriuose kai kurios amino rūgštys yra iškритę ar pakeistos, tačiau išlaikomas pakankamas NGF bioaktyvumas ir receptorinis ryšys, suteikiantis terapinį aktyvumą.

Žmogaus NGF (hNGF) yra tinkamiausia NGF forma. Tinkamiausia hNGF forma yra rekombinantinė hNGF (rhNGF). NGF, tinkamo naudojimui šio išradimo kompozicijose, gavimo būdai yra žinomi specialistams. Pav., atitinkamas

rhNGF gali būti produkuojamas baculovirus ekspresijos sistemos pagalba (Barnett, J., et al., Exp. Neurol., 110:11-24, 1990; EPO 370, 171), mielių ekspresijos sistemos pagalba (Kanaya, E., et al., Gene, 83:65-74, 1989), žinduolių ląstelių (CHO) ekspresijos sistemos pagalba (Iwane, M., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 171:116-122, 1990) ar COS ekspresijos sistemos pagalba (Bruce, G., et al., Neurobiol. Aging, 10:89-94, 1989). NGF turi būti mažiausiai 65% švarumo laipsnio; geriau bent 85% švarumo laipsnio; geriausia bent 95% švarumo laipsnio; o visų geriausia bent 98% švarumo laipsnio. Išskirto NGF, naudojamo kompozicijose, švarumo laipsnis gali būti nustatomas sidabru padengtos SDS-PAGE (natrio dodecilsulfato-poliakrilamido gelio elektroforezė) ar kitais specialistams žinomais metodais.

Pateiktos vandeninės kompozicijos turi terapiškai efektyvų kiekį NGF. Pageidautina, kai NGF sudaro apytiksliai 0,0001-0,125% vandeninės kompozicijos masės, tai atitinka apytiksliai 1-1250 µg/ml. Geriau, kai NGF yra apytiksliai 0,001-0,1 masės % (10-1000 µg/ml). Dar geriau, kai NGF yra apytiksliai 0,01-0,10 masės % (100-1000 µg/ml). Geriausia, kai NGF yra apytiksliai 0,01-0,05% (100-500 µg/ml).

NGF vandeninės kompozicijos gali turėti nešėjus. Nešėjo buvimas kompozicijoje sumažina NGF adsorbciją ant įvairių paviršių arba jai trukdo. Nešėjo reikalingumas priklauso nuo NGF koncentracijos vandeninėje kompozicijoje. Esant pakankamai aukštomis NGF koncentracijoms (didesnėms kaip apytiksliai 500 µg/ml), pakankamai NGF pasilieka tirpale, kad kompensuoti tą kiekį, kuris yra prarastas dėl paviršiaus adsorbcijos. Tinkami nešėjai apima, bet nėra apriboti, polisorbatus, tokius kaip Tween® 80, poloksamerus, tokius kaip Pluronic® F68, ir proteinus, tokius kaip serumo albuminas. Tinkamiausias nešėjas yra

proteinas. Žmogaus serumo albuminas (HSA) yra ypatingai tinkamas. NGF masės santykis su nešėju yra apytiksliai diapazone 0,0001:1-1:1. Tinkamesnis masės santykis yra apytiksliai diapazone 0,01:1-1:1. Labiausiai tinkamas NGF santykis su nešėju yra apytiksliai diapazone 0,01:1-0,5:1. Kada nešėju naudojamas HSA, jo tinkama koncentracija yra apytiksliai 0,1-1,25% pagal vandeninės kompozicijos masę (t.y., 1-12,5 mg/ml). Tinkamesnė kompozicija turi apytiksliai 0,3-0,7% HSA pagal vandeninės kompozicijos masę, labiau tinkama yra apytiksliai 0,4-0,6% pagal vandeninės kompozicijos masę. Labiausiai tinkama kompozicija turi apytiksliai 0,5% (t.y., 5 mg/ml) HSA pagal vandeninės kompozicijos masę. NGF kompozicija taip pat turi pakankamą kiekį biologiškai priimtinos druskos, idant palaikyti skysčio toniškumą. Druska taipogi palaiko NGF tirpale. Pageidautina, jog NGF kompozicija turėtų pakankamai druskos, kad būtų išlaikomas izotoniškumas fiziologiškai priimtinose ribose, lyginant su žmogaus krauju ar stuburo smegenų skysčiu. Tinkamiausia druska yra natrio chloridas (NaCl), nors gali būti naudojamos ir kitos biologiškai priimtinos druskos, kaip kalio chloridas (KCl), kalcio chloridas (CaCl_2) ir magnio chloridas (MgCl_2). Druska gali būti vienos druskos ar druskų mišinio pavidale. Tinkama sudėtis turi apytiksliai 0,5-1,0% (t.y., 5-10 mg/ml) druskos pagal vandeninės kompozicijos masę. Labiau tinkama sudėtis turi apytiksliai 0,6-0,9% druskos pagal kompozicijos masę. Dar labiau tinkama sudėtis turi apytiksliai 0,7-0,9% druskos pagal vandeninės kompozicijos masę. Optimaliausia sudėtis, kai yra apytiksliai 0,87% (t.y., 8,7 mg/ml) druskos. Be to NGF kompozicija turi biologiškai priimtina buferį, kad palaikyti atitinkamą pH. Buvo nustatyta, kad NGF yra stabilesnis esant žemam pH. Tinkama stabili NGF kompozicija, užbuferinta biologiškai priimtinu buferiu,

turi apytiksliai pH 4,5-6,0, geresnė - pH intervale 5,0-5,4. Optimaliausias kompozicijos pH yra apytiksliai 5,2. Pageidautinas buferis yra citrinos rūgštis, o taip pat kiti buferiai, sugebantys palaikyti pH norimame diapazone. Kiti tinkami buferiai apima acto rūgštį/acetatą ir maleino rūgštį/maleatą. Pageidaujamas buferio kiekis priklauso nuo naudojamo buferio rūšies ir jo buferinio talpumo. Kompozicija turi turėti pakankamą buferio kiekį, kad palaikyti galutinę kompozicijos pH norimame intervale. Tinkama buferio koncentracija stabilioms NGF kompozicijoms yra apytiksliai 0,01-0,3% pagal vandeninės kompozicijos masę (0,1-3,0 mg/ml), tinkamesnė koncentracija yra apytiksliai 0,1-0,25% buferio pagal vandeninės kompozicijos masę (1,0-2,5 mg/ml), tinkamiausia buferio koncentracija yra apytiksliai 0,2% buferio pagal vandeninės kompozicijos masę (2,0 mg/ml).

Kompozicijos sudėtyje yra toks vandens kiekis, kad jo pakaktų gauti atitinkamą komponentų koncentraciją. Tinkamos stabilios NGF vandeninės kompozicijos turi apytiksliai 1-1250 µg/ml NGF, 1-12,5 mg/ml HSA, 5-10 mg/ml NaCl, 0,2-3,0 mg/ml citrinos rūgšties ir vandenį, kompozicijos pH nustatomas, kad būtų apytiksliai diapazone 4,5-6,0, tinkamiau - apytiksliai diapazone 5,0-5,4. Tinkamiausios stabilios NGF kompozicijos turi 10-500 mg/ml NGF, 5 mg/ml HSA, 8,7 mg/ml NaCl, 2,1mg/ml citrinos rūgšties ir vandenį, o kompozicijos pH yra apytiksliai 5,2.

Šio išradimo liofilintos kompozicijos yra ypač naudingos užtikrinant ilgą sandėliavimo terminą, ypač aukštesnėje temperatūroje. Šios liofilizuotos kompozicijos turi NGF, biologiškai priimtina užpildą, buferį, palaikantį kompozicijos pH apytiksliai 5,5-6,5 diapazone, fakultatyviai biologiškai priimtina druską, fakultatyviai biologiškai priimtina vandenyje tirpų nešėją bei vandenį.

Liofilizuotinosiose kompozicijose NGF, lyginant su vandeninėmis kompozicijomis, yra naudojamas tokiomis pačiomis koncentracijomis. Užpildas dažniausiai teikia mechaninę paramą, padedant matricai palaikyti kompozicijos struktūrą šaldymo-džiovinimo metu ir jam pasibaigus. Kaip užpildai gali būti naudojami vienas ar daugiau cukrų. Cukrai, naudojami čia, apima monosacharidus, oligosacharidus ir polisacharidus, bet nėra jų ribojami. Tinkamų cukrų pavyzdžiai apima fruktozę, gliukozę, manozę, sorbozę, ksilozę, maltozę, laktozę, sacharozę ir dekstraną, bet nėra jų ribojami. Cukrus taip pat apima cukraus alkoholius, tokius kaip manitolis, sorbitolis, inozitolis, dulcitolis, ksilitolis bei arabitolis. Sutinkamai su šiuo išradimu gali būti naudojami cukrų mišiniai.

Tinkamas užpildas sudarytas iš cukrų kompozicijos. Toks agentas yra sacharozės ir manitolio kombinacija. Nesurišant su teorija, manoma, jog sacharozė sudaro amorfinį stiklą šaldant ir po to vykdant liofilinimą, tai užtikrina proteino potencinio stabilumo padidėjimą (pav., apsaugojimą nuo agregacijos), susidarant NGF molekulinei dispersijai tvirtame stikle. Stabilumas taip pat gali būti padidintas cukraus dėka, kuris veikia kaip vandens, prarasto liofilinimo metu, pakaitalas. Cukraus molekulės greičiau negu vandens molekulės susiriša su proteinu per vandenilinius ryšius. Manitolis, sumaišytas su sacharozė (kurios perėjimas į stiklo būvį vyksta -36°C temperatūroje) santykiu 1:1 (pagal masę), pakelia kompozicijos perėjimo į stiklo būvį temperatūrą 5°C ir ji tampa -31°C . Tai žymiai sutrumpina kompozicijos pirminio džiovinimo liofilinimo metu laiką, be to susidaro kompozicijos amorfinė stiklinė matrica, ir tai yra laikoma pranašumu, gaminant dideliais kiekiais. Kiti užpildai, turintys tokias pat charakteristikas, gali būti pakeisti vienu ar abiem iš šių cukrų.

Pageidautina, kad šio išradimo liofilizuotinos kompozicijos turėtų aukštesnį pH, negu kompozicijos,

kurios neliofilinamos arba kurios buvo atstatytos. Užpildai (cukrai), kurie yra išradimo liofilizuotinosiose kompozicijose, apamai yra labiau stabilūs prie aukštesnio pH. Gerai, kai prieš liofilinimą kompozicijos pH yra apytiksliai 5,5-6,5. Dar geriau, kai liofilizuotinos NGF kompozicijos pH yra apytiksliai 5,8-6,2 diapazone. Optimaliausia, kai liofilizuotinos NGF kompozicijos pH yra apytiksliai 6,0. Kada užpildas yra sacharozė, pageidautinas liofilizuotinos kompozicijos pH yra apytiksliai 6,0; esant rūgštiniam pH, sacharozė, neredukuotas disacharidas, hidrolizinamas į redukuotus cukrus: D-fruktozę ir D-gliukozę. Citratas yra tinkamiausias buferis liofilizuotinoms NGF kompozicijoms, bet ir kiti biologiškai priimtini buferiai, kaip maleatas, gali būti naudojami. Neacetatiniai buferiai yra labiau tinkami dėl acto rūgšties išgaravimo liofilinimo metu. Reikia pripažinti, jog gali būti būtinas galutinio pH koregavimas rūgštimi ar šarmu. Bet koki vandeninio NGF stabilumo praradimą ilgai laikant dėl aukštesnio pH negu apytiksliai 6,0 įmanoma subalansuoti stabilumo padidinimu, susijusiu su NGF liofilinimu.

Idealu, kai buferis parenkamas, įvertinant potencialius pH poslinkius liofilinimo metu, sąlygojamus nuoseklios buferio komponentų kristalizacijos. Pav., naudojant fosfatinis buferius, šarminis komponentas turi aukštesnį eutektinį tašką, negu rūgštinis komponentas, vadinasi, jis kristalizuojasi pirma ir pH mažėja. Pageidautinas yra citratinis buferis, kadangi, manoma, jog abu buferio komponentai turi apytiksliai tą patį eutektinį tašką, sąlygojantį labai nedidelį pH svyravimą, mažėjant temperatūrai. Kiti tinkami buferiai turi turėti komponentus su tokiais pačiais arba panašiais eutektiniais taškais.

Liofilizuotinos kompozicijos taipogi gali turėti biologiškai priimtina druską. Druska, kuri gali būti atrinkta iš druskų, naudojamų vandeninėse kompozicijose, liofilizuotinosiose kompozicijose yra tokioje pačioje ar

sumažintoje koncentracijoje, lyginant su vandeninėmis kompozicijomis. Kadangi liofilinimo metu druskos koncentracija turi tendenciją didėti, pageidautina sumažinti druskos, esančios liofilizuotinosose kompozicijose koncentraciją, kad sutrukdyti proteino denatūraciją. Druskos koncentracijos sumažinimai liofilizuotinosose kompozicijose gali būti kompensuojami, kompozicijas atstatant taip, kad galutinė kompozicija būtų pakankamai izotoniška ir tiktų individualiam skyrimui.

Geriau kai liofilizuotinos kompozicijos turi biologiškai priimtina vandenyje tirpų nešėją. Nešėjai ir nešėjų koncentracijos, kurie gali būti naudojami šio išradimo liofilizuotinosose kompozicijose, yra tie patys ir tos pačios, kurie yra tinkami naudoti šio išradimo vandeninėse kompozicijose.

Tinkamesnės liofilizuotinos kompozicijos turi apytiksliai 1-1250 µg/ml NGF, 15-45 mg/ml sacharozės, 15-45 mg/ml manitolio, fakultatyviai 7-9 mg/ml NaCl ir 0,1-0,7 mg/ml citrinos rūgšties, esant apytiksliai pH diapazone 5,5-6,5. Tinkamiausios NGF liofilizuotinos kompozicijos turi 100-1250 µg/ml NGF, 30 mg/ml sacharozės, 30 mg/ml manitolio, 5 mg/ml žmogaus serumo albumino, fakultatyviai 8,7 mg/ml NaCl ir 0,3 mg/ml citrinos rūgšties. Liofilizuotinių kompozicijų tinkamiausias pH yra apytiksliai 6,0.

Liofilizuotinos šio išradimo kompozicijos yra liofilinamos iki tol, kol drėgmės lieka mažiau negu 2%; tačiau gali būti paruoštos kompozicijos, kurios išlaiko NGF biologinį aktyvumą, esant aukštesniems ar žemesniems drėgmės kiekiams.

Tinkamesnė liofilizuota kompozicija turi 0,001-1,25 dalis nervų augimo faktoriaus, 30-90 dalių cukraus ir mažiau negu 1 dalį vandens.

Liofilizuota NGF kompozicija yra atstatoma skiedėju, turinčiu buferį, tokį kaip citrinos rūgštis, ir druską,

tokią kaip natrio chloridas, nes reikalinga, jog atstatyta kompozicija būtų panaši į skystą vandeninę kompoziciją, t.y., turinčią apytiksliai 1-1250 µg/ml NGF, 1-12,5 mg/ml HSA, 5-10 mg/ml NaCl, 0,2-3,0 mg/ml citrinos rūgšties, 1,5-30 mg/ml sacharozės ir 1,5-30 mg/ml manitolio; pH 5,2.

Tokia liofilizuota NGF kompozicija gali būti panaudota kaip komponentas rinkinyje, nes liofilinta NGF forma gali būti greitai ir lengvai atstatyta atitinkamame tirpiklyje ir skirta pacientams, kuriems reikalingas gydymas; tai patogu ir ekonomiškai. Be liofilizuotos NGF kompozicijos rinkiniai taip pat turi atstatomąjį tirpiklį. Atstatomąjį tirpiklį sudaro sterilus vanduo ir pakankamas druskos kiekis, kad galutinė atstatyta kompozicija būtų izotoninė. Be to, atstatomasis tirpiklis gali turėti papildomą buferį. Visas atstatomojo tirpiklio tūris, esantis rinkinyje, turi būti pakankamas, kad gauti galutinę NGF koncentraciją, tinkamą skirti asmeniui, kuriam reikalingas gydymas. Šio išradimo pageidautinas variantas - tai rinkinys, turintis du buteliukus. Viena buteliuke yra šio išradimo sterili liofilinta NGF kompozicija, o kitame - sterilus atstatomasis tirpiklis. Vartojant rinkinį, į buteliuką su liofilinta NGF kompozicija supilamas atitinkamas atstatomojo tirpiklio kiekis. Ištirpinus liofilintą kompoziciją, atstatyta kompozicija gali būti nedelsiant paskirta pacientui.

Dėka ilgalaikio atstatytos kompozicijos stabilumo yra įmanoma paruošti pakankamą daugeliui dozių kiekį atstatytos kompozicijos. Šio išradimo kompozicijų taikymas turi atitikti NGF terapijos reikalavimus. Tokios kompozicijos turi būti sterilios ir tinkamos intraveniniam, intraraumeniniam, parenteraliniam bei intracerebroventrikuliariniam skyrimui. Tokia terapija gali būti naudinga, gydant neuronines disfunkcijas, apimant neuronų sužalojimą ar NGF atsakomųjų neuronų degeneraciją. NGF gali būti

ypatingai naudingas, gydant susirgimą, surištą su centrinių cholinerginių neuronų praradimu, vadinamą Alzheimerio liga. Alzheimerio ligos ir kitų silpnaprotystės formų gydymas, panaudojant NGF, aprašytas EPO 370171.

Išradimo kompozicijos, kaip vaistai nuo silpnaprotystės, gali būti skiriami bet koku vienu iš daugelio įprastų būdų, priklausomai nuo panaudojimo tikslo. Tinkamiausias būdas priklausys nuo panaudojimo ir gydomo asmens.

Kad įveikti kraujo - smegenų sistemos barjerus, NGF centrinei nervų sistemai gali būti skiriamas intraventrikuliarinėmis injekcijomis ar per vaistais impregnuotus implantantus bei siurbliukus. Kitas skyrimo būdas - nepertraukiama infuzija per intracerebroventrikuliarinę kanulę. Alternatyviai gali būti būtina NGF konjugacija su nešėjo molekulėmis, tokiomis kaip transferinas, kad prasiskverbti per kraujo - smegenų barjerą.

Terapiškai efektyvus NGF kiekis sudaro apytiksliai 0,001-0,5 mg dienai, geriau - apytiksliai 0,01-0,10 mg dienai, geriausia - apytiksliai 0,02-0,06 mg dienai. Tikslė dozė ir skyrimo režimas priklausys nuo daugelio faktorių, tokių kaip skyrimo būdas ir asmuo, gaunančio gydymą, negalavimo laipsnio.

BANDYMO PROCEDŪROS

NGF identifikavimas ir kiekybinis nustatymas, panaudojant aukštos skiriamosios galios skystos chromatografijos reversinę fazę (RP-HPLC)

NGF identifiikuota ir kiekybiškai įvertinta, analizuojant 100 µl pavyzdžius, panaudojant RP-HPLC (Hewlett Packard HP 1090 Liquid Chromatograph), aprūpintą 4-6 mm×25 cm L Dynamax (Rainin Instrument Co., Woburn, MA, USA) 300 Å 5 µm Analytical Reversed-Phased kolonėle su Dynamax 300 Å 5

μ m 4,6mm $\times$ 1,5cm apsaugine kolonėle ir diodiniu įtaisu, detektuojančiu UV prie 220 nm. Judrios fazės: (A) - 0,1% trifluoracto rūgštis vandenyje ir (B) - 0,1% trifluoracto rūgštis acetonitrile, kur per 45 min. gradientai keičiasi
5 nuo 25% (B) iki 60% (B), esant srovės greičiui 0,5 ml/min., slėgiui 1700-2000 psi, aplinkos temperatūrai. NGF identifikavimas atliktas, palyginant jo užsilaikymo laiką pavyzdyje su atitinkamu užsilaikymo laiku naujai paruoštų kalibruotų standartinių NGF tirpalų, paruoštų iš
10 tos pačios NGF partijos. NGF kiekis pavyzdžiuose išskaičiuojamas, palyginus su standartine kreive, gauta su žinomų koncentracijų serijiniais skiedimais.

NGF koncentracijos (μ g/ml) nustatymas ELISA metodu

15

NGF koncentracijos taip pat tirtos ELISA metodu. Standartai ir pavyzdžiai bandyti tris kartus. Kiekviena plokštelė turėjo NGF pilną standartinę kreivę ir kontrolinius mėginius be NGF.

20 Po 100 μ l adsorbuotų antikūnų (pelių monokloniniai 24Cl, indukuoti prieš rhNGF) pripilama į kiekvieną 96 duobučių plokštelės duobutę, plokštelės apgaubiamos Saran gaubtu su drėgnu popieriniu rankšluosčiu ir inkubuojamos per naktį 2-8°C temperatūroje. Duobutės nupilamos,
25 praplaunamos tris kartus, naudojant Wheaton savaime užsipildantį švirkštą, kad patiekti 250 μ l/duobutei praplaunamojo buferio (turinčio 500 mM TRIS, 2 M natrio chlorido, užbuferinto prie pH 7) ir sausai nukratomos. Paskui į kiekvieną duobutę pridedama po 200 μ l
30 blokuojančio buferio (1% jaučio serumo albumino tirpalo), kad blokuoti nespecifines sritis, pripilama po 50 μ l pavyzdžio į kiekvieną duobutę ir plokštelės mažiausiai 1 valandą inkubuojamos kambario temperatūroje, maišant ant platforminio kratytuvo. Duobutės vėl nupilamos ir sausai
35 nukratomos, pripilama 50 μ l standarto ir pavyzdžio

tirpalų. Plokštelės uždengiamos ir inkubuojamos dvi valandas kambario temperatūroje. Plokštelių duobutės vėl nupilamos, praplaunamos buferiu keturis kartus ir sausai nukratomos. Į kiekvieną duobutę pripilama po 50 µl biotinu paveikto antikūno (pelių monokloninis 8C1, indukuotas prieš rhNGF), plokštelės uždengiamos ir inkubuojamos dvi valandas. Plokštelių duobutės nupilamos, praplaunamos bei nusausinamos, kaip aprašyta anksčiau, ir tada į kiekvieną duobutę pripilama po 50 µl streptavidinu konjuguotos krienų peroksidazės. Plokštelės uždengiamos ir 20 min. inkubuojamos kambario temperatūroje, maišant ant platforminio kratytuvo. Plokštelės penkis kartus praplaunamos praplovimo buferiu. Tada į kiekvieną duobutę pripilama po 50 µl orto-fenilendiamino (OPD) substrato buferio, plokštelės uždengiamos ir 1 val. inkubuojamos tamsoje.

Kiekvienos duobutės absorbcijos nustatymui naudojamas Vmax kinetinis mikroplokštelių (Molecular Devices, Mountain View) skaitiklis. Įvertinant tikrą absorbciją, iš kiekvienos duobutės absorbcijos piko prie 450 nm yra išskaičiuojama fono absorbcija prie 650 nm. NGF koncentracija pavyzdžiuose nustatoma palyginant su NGF standartine kreive.

25 NGF aktyvumo nustatymas

NGF bioaktyvumas nustatomas PC-12 biotesto pagalba. PC-12 biotesto esmė - PC-12 pheochromocytoma ląstelių (Green, Trends Neurosci., 7:91, 1986) aktyvumo padidėjimas po NGF ekspozicijos. PC-12 ląstelių metabolitinis aktyvumas matuojamas, išryškinant ląstelių 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolbromidą ($C_{18}H_{16}N_5Br$) (MTT), kuris ląstelinės dehidrogenazės pagalba konvertuojamas į netirpius viduląstelinčius mėlynus kristalus.

35 Kiekviena 96 duobučių plokštelės duobutė užpildoma 30,000 PC-12 ląstelių, esančių 50 µl RPMI-1640 terpės (Sigma).

Norint gauti 0,006-400 ng/ml koncentracijų rhNGF tirpalus, paruoštus RPMI-1640 terpėje su 0,2% jaučio serumo albuminu (BSA), daromi kiekvieno pavyzdžio ir standartų serijiniai skiedimai. Tada į kiekvieną duobutę
5 pripilama po 50 µl kiekvieno tirpalo (gautos 0,003-200 ng/ml NGF koncentracijos), ir kiekvienas mėginys testuojamas tris kartus. Termostatavus plokšteles 2 dienas 5% CO₂ atmosferoje 37°C temperatūroje, į kiekvieną duobutę pridedama po 10 µg MTT ir plokštelės papildomai
10 inkubuojamos 4 val. Po to pripilama po 1 tūrį 20% SDS (natrio dodecilsulfatas), paruošto 50% dimetilformamide (DMF), pH 4,7, plokštelės apgaubiamos celofanu ir per naktį inkubuojamos 37°C temperatūroje hermetiškai uždarytuose plastikiniuose konteineriuose. Plokštelės
15 tiriamos sekančią dieną, naudojant plokštelių Vmax skaitiklį prie 575 nm bangos ilgio. Pavyzdžio kreivės ED₅₀ santykis su standartinio NGF kreivės ED₅₀ parodo dviejų preparatų santykinę potenciją.

20 1 pavyzdys

NGF kompozicija

Ruošiamos vandeninės kompozicijos, turinčios 1,10,100
25 ir 1000 µg/ml rhNGF, 5 mg/ml HSA, 8,7 mg/ml natrio chlorido, 2,1 mg/ml citrinos rūgšties ir tokį kiekį vandens, kad gauti 10 ml tūrio kompozicijos, užbuferintos prie pH 5,2. Citrinos rūgštis ir druska ištirpinamos apytiksliai 70% viso kompozicijos tūrio, pH koreguojamas
30 NaOH/HCl pagalba, HSA ir NGF tirpinami, švelniai maišant ir kartu pilant vandenį iki galutinio tūrio; formulotė filtruojama per 0,2 µ Millipore Millex-GV filtrą.

rhNGF, naudojamas kompozicijų ruošimui, ekspresuojamas
35 vabzdžių ląstelėse, naudojant bakulovirusinį ekspresijos

vektorių ir valomas jonų mainų bei reversinės fazės chromatografijų pagalba, kaip aprašyta Barnett, J., et al., Exp. Neurol., 110:11-24, 1990.

5 2 pavyzdys

NGF kompozicijų stabilumas 5°C ir 25°C temperatūrose

250 µl tūrio 1 pavyzdžio NGF kompozicijos mėginiai (100 µg/ml koncentracijos) laikomi 5°C ir 25°C (RT) temperatūrose polietileniniuose lašo formos buteliukuose iki 6 mėnesių. Šių mėginių analizė, naudojant RP-HPLC, ELISA ir biotestą, nerodo proteino nuostolių, išlaikius 6 mėnesius (1 lentelė).

15

1 lentelė

20 NGF stabilumas 5°C ir 25°C temperatūrose, naudojant RP-HPLC, ELISA ir PC-12 biotestą

Laikymo temp(°C)	RP-HPLC *AR% 1sav.	RP-HPLC *AR% 2 sav.	RP-HPLC *AR% 3 mėn.	RP-HPLC *AR% 4 mėn.	RP-HPLC *AR% 6mėn.	ELISA *AR% 6mėn.	Biotestas Santykinis aktyvumas% 6 mėn.
5°C	99±2	99±6	96±4	100±3	101±3	100±6	106±14
R.T. (22- 25°C)	99±2	91±5	95±5	103±3	99±5	104±13	123±3

25

*AR% = Atsparumo Rodiklis% = $\frac{\text{mėginio [NGF]}}{\text{kontrolės [NGF]}}$

Santykinis aktyvumas% = $\frac{\text{mėginio aktyvumas}}{\text{kontrolės aktyvumas}}$

(RP-HPLC duomenys reiškia vidurkį $\pm$ 2-4 pakartojimų standartinį nukrypimą. Biotesto duomenys reiškia vidurkį $\pm$ 95% 3 nustatymų patikimumo ribos.)

5

3 pavyzdys

Įvairių NGF kompozicijų, laikytų polietileno kateteriuose 37°C temperatūroje, stabilumas.

10

250 μ l tūrio NGF kompozicijų mėginiai, gauti pagal 1 pavyzdžio aprašymą ir turintys 1-1000 μ g/ml rhNGF, laikomi nepralaidžiuose rentgeno spinduliams polietileno kateteriuose (vidinis diametras 0,076 cm, išorinis diametras 0,122 cm) 37°C temperatūroje 4 savaites. Kaip rodo 2 lentelės duomenys, nei žymesnio proteino kiekio (naudojant RP-HPLC), nei žymesnio NGF aktyvumo (naudojant PC-12 biotestą) nuostolio neužfiksuota.

20 2 lentelė

NGF kompozicijų, laikytų polietilenuose kateteriuose 37°C temperatūroje, stabilumas, nustatant RP-HPLC ir PC-12 biotesto pagalba.

25

Pradinė [NGF] (μ g/ml)	*AR% 1 savaitė RP-HPLC	*AR% 2 savaitės RP-HPLC	*AR% 4 savaitės RP-HPLC	Santykinis aktyvumas% 4 savaitės PC-12 biotestas
1,0	104 $\pm$ 3	87 $\pm$ 6	85 $\pm$ 3	101 $\pm$ 34
10,0	94 $\pm$ 14	92 $\pm$ 4	100 $\pm$ 1	118 $\pm$ 45
100,0	102 $\pm$ 4	95 $\pm$ 6	95 $\pm$ 2	129 $\pm$ 34
1000,0	107 $\pm$ 2	92 $\pm$ 4	86 $\pm$ 3	108 $\pm$ 33

$$*AR\% = \text{Atsparumo Rodiklis}\% = \frac{\text{mėginio [NGF]}}{\text{kontrolės [NGF]}}$$

$$\text{Santykinis aktyvumas}\% = \frac{\text{mėginio aktyvumas}}{\text{kontrolės aktyvumas}}$$

30

(RP-HPLC duomenys reiškia vidurkį $\pm$ 2-4 pakartojimų standartinį nukrypimą. Biotesto duomenys reiškia vidurkį $\pm$ 95% 3 nustatymų patikimumo ribos.)

5 4 pavyzdys

NGF kompozicijos stabilumas įvairiuose įtaisuose

100 μ g/ml tūrio 1 pavyzdžio kompozicijos mėginiais
 10 pripildomi Infusaid Model 600 implantuojamas infuzinis
 siurbliukas (Shiley-Infusaid Inc., Norwood, MA),
 - Medtronics Synchromed implantuojamas infuzinis
 siurbliukas (Medtronic Inc., Minneapolis, MN) bei Alzet
 Model 2ML 4 miniosmotinis infuzinis siurbliukas (Alza
 15 Corp., Palo Alto, CA). Siurbliukai patalpinami 37°C
 temperatūros vandens vonioje ir pradėdama kompozicijos
 cirkuliacija. Kas savaitę surenkami pavyzdžiai 4 savaitių
 laikotarpyje ir analizuojami proteino kiekio ir aktyvumo
 atžvilgiu, naudojant RP-HPLC, ELISA ir PC-12 biotestą.

20 3 lentelės duomenys nerodo žymesnio NGF koncentracijos
 bei aktyvumo sumažėjimo.

3 lentelė

25 NGF formuluočių stabilumas, laikant jas įvairiuose
 įtaisuose 37°C temperatūroje 1 mėnesį

Tiekimo sistema	*AR% 1 savaitė RP-HPLC	*AR% 2 savaitės RP-HPLC	*AR% 4 savaitės RP-HPLC	*AR% 4 savaitės ELISA	Santykinis aktyvumas% 4 savaitės Biotestas
Infusaid Model 600 im- plantuojamas siurbliukas	91 $\pm$ 3	101 $\pm$ 3	112 $\pm$ 4	90 $\pm$ 11	100 $\pm$ 36
Medtronics Synchromed im- plantuojamas siurbliukas	109 $\pm$ 2	92 $\pm$ 2	91 $\pm$ 3	97 $\pm$ 4	90 $\pm$ 6
Alzet 2ML4 Osmotinis mini siurb- liukas	96 $\pm$ 3	95 $\pm$ 7	90 $\pm$ 5	nenustatyta	nenustatyta

$$*AR\% = \text{Atsparumo Rodiklis}\% = \frac{\text{mėginio [NGF]}}{\text{kontrolės [NGF]}}$$

$$\text{Santykinis aktyvumas}\% = \frac{\text{mėginio aktyvumas}}{\text{kontrolės aktyvumas}}$$

- 5 (RP-HPLC duomenys reiškia vidurkį $\pm$ 2-4 pakartojimų standartinį nukrypimą. Biotesto duomenys reiškia vidurkį $\pm$ 95% 3 nustatymų patikimumo ribos.)

5 pavyzdys

10

NGF kompozicijų stabilumo pH intervale 4-10 tyrimai

- Ruošiamos vandeninės kompozicijos, turinčios 100 $\mu\text{g/ml}$ NGF, 1 mg/ml HSA ir 9 mg/ml NaCl, užbuferinamos pH
15 intervale 4-10 ir steriliai filtruojamos per 0,2 μ filtra (Millex-GV; Millipore Corp.), kaip aprašyta 1 pavyzdyje. Kompozicijos, kurių pH intervalas 4-5, užbuferinamos acetatu, kompozicijos, kurių pH intervalas 6-10, užbuferinamos TRIS'o pagalba. 1 ml tūrio mėginiai
20 patalpinami į polietileninius lašo formos buteliukus ir inkubuojami arba kambario temperatūroje ($23-25^{\circ}\text{C}$), arba 37° temperatūroje. Pavyzdžiai imami įvairiais laiko tarpais ir analizuojami RP-HPLC pagalba. Pirmos eilės reakcijos greičio konstantos, rodančios NGF nuostolį
25 tirpale, žymimos kaip funkcija, priklausanti nuo laiko. Nustatyta, jog NGF skilimo tirpale greičiai didėja prie pH, žemesnio negu apytiksliai 4,5 ir aukštesnio pH, negu apytiksliai 6,0. Aukščiausias stabilumas stebimas prie pH 5,2.

30

6 pavyzdys

NGF kompozicijų stabilumas kaip funkcija, priklausanti nuo nešėjo koncentracijos

35

Buvo tirinama nešėjų tipas ir kiekis, norint nustatyti jų poveikį NGF stabilumui. Paruošta 100 µg/ml vandeninė kompozicija, kaip aprašyta 1 pavyzdyje, bei vandeninės kompozicijos, turinčios kitus nešėjus, ir išvardytos 4 lentelėje. Kiekviena kompozicija filtruojama per 0,2 µ Millipore Millex-GV filtrą. NGF stabilumas įvairiose kompozicijose nustatomas, inkubuojant jas 37°C temperatūroje polipropileninguose lašo formos buteliukuose. Praėjus 2 savaitėms, imami pavyzdžiai ir analizuojamas proteino kiekis RP-HPLC pagalba.

4 lentelė

Įvairių NGF kompozicijų, inkubuotų 2 savaites 37°C temperatūroje, stabilumas

Nešėjas	Kiekis (masės/tūrio%)	AR% po 2 savaičių
Želatina	1,0	64±9
Žmogaus serumo albuminas	0,1	48±7
Žmogaus serumo albuminas	0,5	99±2
Žmogaus serumo albuminas	1,0	31±36
Tween 80	0,2	77±9
Pluronic F-68	0,02	65±5

$$AR\% = \text{Atsparumo Rodiklis}\% = \frac{\text{mėginio [NGF]}}{\text{kontrolės [NGF]}}$$

(RP-HPLC duomenys reiškia vidurkį ± 2-4 pakartojimų standartinį nukrypimą.)

7 pavyzdys

NGF kompozicija, skirta liofilinimui

Kambario temperatūroje ruošiama vandeninė NGF kompozicija, turinti 100 µg/ml NGF, 30 mg/ml sacharozės, 30 mg/ml manitolio, 5 mg/ml HSA ir 0,3 mg/ml citrinos rūgšties, koreguojant pH 6,0 NaOH pagalba. Ištirpinus
5 citrinos rūgštį ir cukrus tūryje, sudarančiame apie 70% viso tūrio, nustatomas pH ir dedama HSA bei NGF, švelniai maišant ir supilant likusį vandenį.

8 pavyzdys

10

NGF kompozicijos liofilinimas

Tiriamas vandeninio NGF 7 pavyzdžio kompozicijoje liofilinimo stabilumas. Paruošti pagal 7 pavyzdį NGF
15 kompozicijų 1 ml tūrio mėginiai patalpinami į 5 ml talpos I Tipo stiklinius buteliukus, uždaromus liofilinimo kamščiais. Buteliukai su kompozicijomis patalpinami į šaldymo-džiovinimo kamerą (FTS Systems Inc.), nukalibruotą prieš šaldymo pradžią 5°C temperatūrai. Tada
20 kameros temperatūra pažeminama iki -40°C. Praėjus 2 val. -40°C temperatūroje, kamera vakuumuojama, kontroliuojant slėgį azoto srovės pagalba 80-100 milliTorrr ribose. Temperatūra keliama 4°C kas valandą, kol pasiekama galutinė 25°C džiovinimo temperatūra. Galutinis produkto
25 drėgmės kiekis 1-2% ribose pasiekiamas apytiksliai po 30 val. ciklo.

Šaldyti-džiovininti milteliai laikomi 5°C temperatūroje ir atstatomi kambario temperatūroje po 3 dienų, panaudojant 1 ml skiedėjo, turinčio 8,7 mg/ml NaCl ir 1,1 mg/ml
30 citrinos rūgšties, užbuferinto prie 5,2. NGF pavyzdžių koncentracija analizuojama RP-HPLC pagalba. Vykstant liofilinimui, proteino nuostolių nepastebėta.

9 pavyzdys

NGF kompozicijų, laikomų stikliniuose buteliukuose 2-8°C temperatūroje, stabilumo tyrimai

5

Pagal 1 pavyzdžio procedūrą ruošiamos vandeninės kompozicijos, turinčios 100 ar 1000 µg/ml rhNGF, besiskiriančios tuo, jog partijos dydis padidintas iki 1,5 litro. 4,2 ml tūrio mėginiai patalpinami į I Tipo angliško krištolo buteliukus su butilo-kaučiuko kamščiais, padengtais teflonu, ir laikomi 2-8°C temperatūroje. Rezultatai, pateikti 5 lentelėje, nerodo žymesnio proteino kiekio (matuojant RP-HPLC ir ELISA pagalba) ar NGF aktyvumo (matuojant PC-12 biotesto pagalba) nuostolio.

15

5 lentelė

NGF kompozicijos stabilumas, laikant 2-8°C temperatūroje (matuojant RP-HPLC, ELISA ir PC-12 biotesto pagalba)

20

Nominalinė [NGF]	RP-HPLC *AR% Pradinis	RP-HPLC *AR% 12 mėnesių	ELISA *AR% 12 mėnesių	PC-Biotestas *AR% 12 mėnesių
100 µg/ml	103±1	101±1	102±3	102±15
1000 µg/ml	102±1	101±1	108±3	102±20

$$*AR\% = \text{Atsparumo rodiklis}\% = \frac{\text{mėginio [NGF] laike}}{\text{pradinė [NGF]}}$$

NGF indentifikavimas ir kiekybinis nustatymas, panaudojant RP-HPLC

25

Šiame 9 pavyzdyje naudojama sekanti procedūra:

NGF identifikuojama ir kiekybiškai nustatoma, analizuojant 100 µl tūrio mėginius, panaudojant RP-HPLC

30

(Hewlett Packard HP 1090 Liquid Chromatograph), aprūpintą 4-6 mm × 250 mm dydžio kolonėle, Baker surištu plačių porų butilu (C4) 300 Å porų dydžio (J.T.Baker Inc. Phillipsburg NJ, USA) bei diodiniu įtaisu, detektuojančiu 5 prie UV 210 nm bangos ilgio. Judrios fazės: (A) 0,2% trifluoracto rūgštis vandenyje ir (B) 60% acetonitrilas (A) buferyje, kur per 65 min. gradientai pakinta nuo 29% (B) iki 75% (B), esant 1,0 ml/min. srovės greičiui ir 110 barų slėgiui aplinkos temperatūroje.

10

Atitinkamai, HPLC buvo panaudota procedūra, aprašyta anksčiau prie BANDYMO PROCEDŪROS.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

- 5 1. Vandeninė farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i
tuo, kad ji susideda iš:
- (a) nervų augimo faktoriaus;
 - (b) biologiškai priimtinos druskos kiekio, kurio pakanka palaikyti izotoniškumą;
 - 10 (c) buferio kiekio, kurio pakanka palaikyti kompozicijos pH nuo 4,5 iki 6,0; ir
 - (d) vandens.
2. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo,
- 15 kad ji papildomai turi biologiškai priimtina vandenyje tirpų nešiklį.
3. Kompozicija pagal 1 arba 2 punktą , b e s i s k i r i a n -
t i tuo, kad joje:
- 20 (a) nervų augimo faktorius sudaro 0,0001-0,125% vandeninės kompozicijos masės;
 - (b) nešiklis sudaro 0,1-1,25% vandeninės kompozicijos masės;
 - (c) druska sudaro 0,5-1,0% vandeninės kompozicijos masės;
 - (d) buferio yra toks kiekis, kurio pakanka palaikyti vandeninės
 - 25 kompozicijos pH nuo 4,5 iki 6,0.
4. Kompozicija pagal bet kurią iš ankstesnių 1-3 punktų, b e -
s i s k i r i a n t i tuo, kad jos pH yra nuo 5,0 iki 5,4.
- 30 5. Kompozicija pagal bet kurią iš 2-4 punktų, b e s i s k i -
r i a n t i tuo, kad turi 10-500 µg/ml nervų augimo faktoriaus,
5 µg/ml žmogaus serumo albumino, 8,7 mg/ml NaCl, 2,1 mg/ml
citrinos rūgšties ir vandens, ir jos pH yra 5,2.

6. Vandeninė nervų augimo faktoriaus kompozicija, tinkama liofilinimui, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji susideda iš:
(a) nervų augimo faktoriaus;
(b) biologiškai priimtino užpildo;
- 5 (c) buferio kiekio, kurio pakanka palaikyti kompozicijos pH nuo 5,5 iki 6,5; ir
(d) vandens.
7. Kompozicija pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji turi 1-1250 µg/ml nervų augimo faktoriaus ir 30-90 mg/ml užpildo.
- 10 8. Kompozicija pagal 6 arba 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad užpildas yra cukrus.
- 15 9. Kompozicija pagal bet kurį iš 6-8 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad užpildas susideda iš sacharozės ir manitolio mišinio, buferis yra citratas, ir kompozicijos pH yra nuo 5,8 iki 6,2.
- 20 10. Kompozicija pagal bet kurį iš 6-9 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad liofilintoje formoje dregmės kiekis sumažintas iki mažiau negu 2%.
- 25 11. Liofilinta farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi 0,001-1,25 dalių nervų augimo faktoriaus, 30-90 dalių cukraus ir mažiau negu 1 dalį vandens.
12. Kompozicija pagal bet kurį iš 6-11 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad papildomai turi biologiškai priimtina vandenįje tirpų nešiklį.
- 30 13. Kompozicija pagal bet kurį iš ankstesnių 1-12 punktų, skirta panaudoti žmogaus neuroninei disfunkcijai gydyti.
- 35 14. Kompozicija pagal 13 punktą, skirta panaudoti intracerebroventrikuliarinėje infuzinėje formoje žmogaus Alzheimer'io ligai gydyti.