

(19)



(10) **LT 4947 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **4947**

(51) Int. Cl. ⁷: **A61K 38/21**
C12N 15/20

(21) Paraiškos numeris: **2001 093**

(22) Paraiškos padavimo data: **2001 09 26**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2002 04 25**

(45) Patento paskelbimo data: **2002 08 26**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Henrikas Kęstutis ŠEBĖKA, LT
Birutė STARKUVIENĖ, LT
Algimantas Antanas PAULIUKONIS, LT
Vladas Algirdas BUMELIS, LT

(73) Patento savininkas:

BIOTECHNOLOGIJOS INSTITUTAS, V.Graičiūno g. 8, 2028 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis:

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

(54) Pavadinimas:

Interferono alfa farmacinė kompozicija

(57) Referatas:

Išradimas aprašo interferono alfa-2 (IFN) tirpalą, kuris pasižymi padidintu terminiu stabilumu ir atsparumu autooksidacijai bei jo paruošimo būdą. Tirpalas turi $(0,01-50) \times 10^6$ TV/ml interferono alfa-2b, 0,08-0,1 M natrio citratų, 0,05-0,06 M glicino, 0,008-0,01 % polisorbato-20, 0,004-0,005 % timerosalio. Tirpalo pH palaikomas $6,0 \pm 0,1$. Išradimas priklauso farmacijos sričiai ir gali būti panaudotas IFN skystų vaistinių formų, skirtų kai kurių virusinių ir onkologinių ligų terapijai, gamyboje ir biotechnologijoje genoinžinerinio IFN gamybos procesuose.

Išradimas aprašo farmacinės paskirties kompoziciją, sudarytą iš biologiškai
5 aktyvaus baltymo - interferono (IFN) alfa-2 ir vandenyje ištirpintų kitų komponentų, kurie
jam suteikia padidintą terminį stabilumą ir atsparumą autooksidacijai, bei jos paruošimo
būdą.

Išradimas priklauso farmacijos sričiai ir gali būti panaudotas IFN vaistinių formų -
injekcinių tirpalų, lašų, losjonų ir kitų skystų vaistinių formų, skirtų kai kurių virusinių ir
10 onkologinių ligų terapijai, gamyboje bei biotechnologijoje genoinžinerinio IFN gamybos
procesuose.

IFN vaistinių formų gamybos, transportavimo, sandėliavimo ir vartojimo metu
susiduriama su stabilumo problemomis, kurios atsiranda dėl IFN jautrumo aplinkos
fizikiniams ir cheminiams faktoriams. Jiems veikiant vyksta agregacijos, proteolizės,
15 oksidacijos, deamidavimo, disulfidinių ryšių irimo ir kiti procesai. To pasekoje IFN
skystos vaistinės formos (tirpalai) praranda dalį biologinio aktyvumo, jose atsiranda
degradacijos produktų, kurių kiekiams viršyjus Europos Farmakopėjos nustatytus
normatyvus, IFN preparatai tampa netinkami naudojimui.

IFN stabilizavimui naudojamos kompozicijos, dažnai savo sudėtyje turinčios
20 žmogaus serumo albumino (ŽSA). Pasaulinėje rinkoje plačiausiai paplitę interferono alfa
komerciniai preparatai yra BEROFOR (Boehringer Ingelheim, Vokietija), INTRON A
(Schering, JAV), ROFERON A (Hoffmann-La Roche, Šveicarija), WELLFERON
(Wellcome Foundation, Anglija), kurie skiriasi savo sudėtimis ar gamybos būdu, tačiau
visi jie turi stabilizuojantį agentą ŽSA [A. Braun, J. Alsenz, (1997), Pharm. Res., Vol. 14,
25 No. 10, pp. 1394 – 1400]. Naujos kartos patentuoti interferono tirpalai pasižymi tuo, kad
juose atsisakyta komponentų, pagamintų iš kraujo serumo, nes šis gali būti žmogaus
imunodeficito viruso (ŽIV) infekcijos šaltinis. Tokių patentų yra tik keletas. Taip antai,
tarptautinė paraiška WO 89/04177 aprašo interferono beta tirpalo kompoziciją. Ji sudaryta
iš amonio acetato buferio pH 5.0 ± 0.1 , izotonizuojančio agento NaCl 0.9% ir nejoninio
30 detergento polisorbato-80 0.03% koncentracijos. Yra žinomas Japonijos patentas
61 277633, kuriame aprašyta interferono gama tirpalo kompozicija. Jo buferinė dalis yra
natrio sukecinatas, pH 5.0, izotonizuojantis agentas - manitolis 4%.

Išradimui artimiausi analogai yra interferono alfa tirpalai. Tai Hoffmann-La Roche firmos Europos patentas EP 0736303, aprašantis interferono alfa ir jo polietilenglikolinio darinio tirpalų kompozicijas. Jose yra 0,01 - 0,015 M amonio acetato arba natrio laktato buferinė sistema, pH 4,5 - 5,5, tinkamiausias pH - $5,0 \pm 0,1$. Naudojamas nejoninis detergantas polisorbata-80 0,01 - 0,5 mg/ml koncentracijos. Tinkamiausias izotonizuojantis agentas yra NaCl arba manitolis, be jų gali būti tam tikslui naudojami glicerolis, argininas, lizinas, histidinas, metioninas ar etanolaminas. Antimikrobinis agentas yra benzilo alkoholis 8 - 20 mg/ml koncentracijos. Kompozicijos paruošimo metu iš tirpalo pašalinamas deguonis azoto dujų pagalba. Tokiame tirpale po 3 mėn. išlieka: 5
10 prie 5°C - 92 - 94%, prie 25°C - 61 - 88% ir prie 35°C - 44 - 71% natyvaus IFN, priklausomai nuo jo pradinės koncentracijos.

Europos patentas EP 0777495, išduotas Schering korporacijos vardu, aprašo interferonų alfa vandeninius tirpalus. Biologiškai aktyvus komponentas gali būti bet koks alfa tipo interferonas $(0,1 - 100) \times 10^6$ TV/ml. Buferinės sistemos pH 4,5 - 7,1, 15 tinkamiausias yra natrio fosfatų buferis pH 6,8. Kad tirpalas nesidrumstų, pridedamas chelatuojantis agentas - dinatrio divandenilio tetraacto rūgštis (EDTA) arba citrinų rūgštis, bet tinkamiausias yra EDTA 0,1 mg/ml. Nejoninis detergantas polisorbata-80 0,1 mg/ml reikalingas interferono stabilizavimui apsaugant nuo galimų praradimų adsorbcijos ant paviršių būdu. Izotonizuojantis agentas yra NaCl 7,5 mg/ml. Antimikrobinis agentas yra 20 metakrezolis, fenolis, metilparabenas, propilparabenas arba metil-propilparabenų mišinys. Tirpalo paruošimo metu iš jo turi būti pašalintas deguonis su azoto dujų pagalba iki 0,25 ppm koncentracijos, o virš tirpalo deguonies koncentracija neturi viršyti 4%. Esant 2 - 8°C per 24 mėn tirpale išsilaiko ne mažiau 75% biologinio aktyvumo ir vizualiai nepastebimas joks drumstumas.

25 IFN tirpalai naudojami kaip skystos vaistinės formos, kurių galiojimo laikas turėtų būti matuojamas metais, todėl IFN stabilumo tirpale padidinimas yra aktuali problema. Patentų analizė rodo, kad IFN stabilumas žinomos sudėties tirpaluose yra nepakankamas ilgalaikio saugojimo požiūriu. Žalingai IFN veikiantys aplinkos veiksniai šiluma ir deguonis yra degradacinių procesų varikliai. Jų įtakoje keičiasi IFN natyvi struktūra, 30 oksiduojasi metionino liekanos ir prarandamas biologinis aktyvumas.

Šio išradimo tikslas - padidinti IFN tirpalo termostabilumą ir atsparumą autooksidacijai.

Tikslas pasiektas išradus naują kompoziciją, kurios komponentai yra:

- (a) interferonas alfa-2, veiklioji medžiaga;
- (b) natrio citratai, efektyvios koncentracijos buferinė sistema, turinti efektyvų pH. Be šios funkcijos jie tarnauja kaip chelatuojantys, izotonizuojantys ir stabilizuojantys agentai;
- 5 (c) glicinas, efektyvios koncentracijos chelatuojantis, izotonizuojantis ir stabilizuojantis agentas;
- (d) polisorbatai-20, nejoninis detergentas, efektyvios koncentracijos stabilizuojantis agentas;
- (e) timerosalis, efektyvios koncentracijos stabilizuojantis agentas.

10 Išrastoje kompozicijoje interferonas alfa-2 tipo gali būti alfa-2a arba alfa-2b, tinkamiausias yra rekombinantinis žmogaus interferonas alfa-2b. Nustatyta, kad jo koncentracija tirpale turi atitikti $(0,01 - 50) \times 10^6$ TV/ml, o tinkamiausia yra $(0,1 - 30) \times 10^6$ TV/ml.

Siūlomoje kompozicijoje tinkamiausia buferinė sistema yra mononatrio ir dinatrio
15 citratų tirpalas, priešingai analogui EP 0777495, pagal kurį tinkamiausias yra natrio fosfatų tirpalas. Nustatyta, kad citratai efektyviausiai, palyginus su fosfatais ar acetatais, stabilizuoja IFN, esant jų koncentracijai 0,08 - 0,1 M.

Esminę reikšmę IFN tirpalo stabilumui turi jo pH, kurio tinkamiausia reikšmė išradimo kompozicijos atveju yra $6,0 \pm 0,1$. Priešingai, pagal EP 0736303 tinkamiausias
20 pH yra $5,0 \pm 0,1$, o pagal kitą EP 0777495 tinkamiausias pH 6,8.

Be to, citratų anijonai atlieka chelatuojančio agento funkciją, sudarydami kompleksus su metalų katijonais. Analoge tam tikslui tarnauja EDTA arba citrinų rūgštis, bet tinkamiausia yra EDTA. Tačiau Europos Medikamentų įvertinimo agentūra nerekomenduoja jos naudoti. Išradimo kompozicijoje be citratų chelatuojančiomis
25 savybėmis pasižymi ir kitas komponentas - glicinas. Jų bendras efektyvumas leido atsisakyti nuo EDTA panaudojimo.

Išradimo kompozicijoje natrio citratai kartu su glicinu suteikia IFN tirpalui izotoniškumą, esant bendrai jų koncentracijai 0,13 - 0,16 M.

Glicinas yra IFN stabilizuojantis komponentas, kurio efektyvi koncentracija
30 siūlomoje kompozicijoje yra 0,05 - 0,06 M. Jis atlieka taip pat chelatuojančio ir izotonizuojančio agento funkcijas kartu su citratais.

Naujos farmacinės kompozicijos stabilizuojančiu komponentu panaudotas nejoninis detergentas polisorbatai-20 esant jo koncentracijai 0,008 - 0,01 %.

Antimikrobinis komponentas yra timerosalis, kurio tinkamiausia koncentracija išradimo kompozicijoje yra 0,004 – 0,005 %.

Naujos farmacinės kompozicijos tirpalo paruošimo būdas pasižymi tuo, kad, paruošus buferinės sistemos tirpalą su pridėtais chelatuojančiu, izotonizuojančiu agentu, nejoniniu detergentu bei antimikrobinu agentu, priešingai žinomiems paruošimo būdams, iš šio tirpalo nepašalinamas deguonis.

Išradimą iliustruoja pavyzdžiai:

1 pavyzdys

10 Naujos interferono farmacinės kompozicijos tirpalo paruošimas

IFN tirpalas gaunamas ištirpinant kompozicijos komponentus injekciniam vandenyje kambario temperatūroje. Pirmiausia paruošiamas buferis iš citrinų rūgšties tirpalo neutralizuojant jį su 10 - 20% NaOH tirpalu iki pH $6,0 \pm 0,1$. Po to, maišant ištirpinami reikiami kiekiai timerosalio ir glicino. Po to pridedamas polisorbato-20 tirpalas minimaliame kiekyje vandens. Pabaigoje praskiedžiama su vandeniu ir IFN tirpalu iki norimos koncentracijos. Aseptinėmis sąlygomis tirpalas nufiltruojamas per membraninį filtrą. Sterilus filtratas išpilstomas į buteliukus, kurie užkemšami.

Konkreiti kompozicijos sudėtis pasirenkama pagal 1 lentelės duomenis.

1 lentelė

20 Naujos kompozicijos interferono 1 ml tirpalo sudėtis

<i>Komponentas</i>	<i>Kiekis</i>
Interferonas alfa-2b	$(0,01 - 50) \times 10^6$ TV
Citrinų rūgšties monohidratas	17 - 21 mg
Natrio hidroksidas 10%	iki pH 5,9 - 6,1
Glicinas	3,8 - 4,5 mg
Polisorbatas-20	0,08 - 0,1 mg
Timerosalis	0,04 - 0,05 mg
Vanduo injekcijoms	iki 1,0 ml

2 pavyzdys

Termostabilumo tyrimams paruošti trys IFN alfa-2b ($0,1 \times 10^6$ TV/ml) tirpalai. Vienas iš jų (tirpalas A) pagal šio išradimo 1-o pavyzdžio mažiausias reikšmes, o kiti du pagal analogus: tirpalas B pagal patentą EP 0736303 (žr.2 lentelę), o tirpalas C pagal patentą EP 0777495 (žr. 3 lentelę).

2 lentelė

Interferono tirpalas B, paruoštas pagal EP 0736303

<i>Komponentas</i>	<i>Kiekis</i>
Interferonas alfa-2b	1×10^5 TV
Amonio acetatas	0,77 mg
Natrio chloridas	7,21 mg
Benzilo alkoholis	10,0 mg
Polisorbatas-80	0,1 mg
Acto rūgštis 0,1 N	iki pH $5,0 \pm 0,1$
Natrio hidroksidas 0,1 N	iki pH $5,0 \pm 0,1$
Vanduo injekcijoms	iki 1 ml

Visi trys tirpalai užkimštuose buteliukuose inkubuoti vandens termostate 60°C temperatūroje. Po tam tikro laiko Hamiltono švirkštu imami mėginiai ir nustatomas IFN biologinis aktyvumas pagal Europos Farmakopėjos metodiką. Gauti rezultatai pateikti Fig.1.

Iš gautų duomenų matyti, kad naujos kompozicijos IFN tirpalo (A) stabilumas prie 60°C yra žymiai didesnis, palyginus su jos analogais (B,C).

Interferono tirpalas C, paruoštas pagal EP 0777495

<i>Komponentas</i>	<i>Kiekis</i>
Interferonas alfa-2b	1x10 ⁵ TV
Dinatrio vandenilio ortofosfatas bevandenis	1,8 mg
Mononatrio divandenilio ortofosfatas monohidratas	1,3 mg
Dinatrio EDTA	0,1 mg
Polisorbatas-80	0,1 mg
m-Krezolis	1,5 mg
Natrio chloridas	7,5 mg
Vanduo injekcijoms	iki 1 ml, tirpalo pH 6,8

5 3 pavyzdys

Termostabilumo tyrimams paruošti trys IFN alfa-2b (1x10⁶ TV/ml) tirpalai, kurie skiriasi nuo 2 pavyzdžio tuo, kad A tirpalo komponentų koncentracijos turi didžiausias reikšmes, nurodytas 1 lentelėje. Termostabilumo testai atlikti taip pat, išskyrus tai, kad IFN tirpalai inkubuojami 35°C temperatūroje. Gauti rezultatai pateikti Fig.2.

10 Iš gautų rezultatų matyti, kad esant 35 °C naujos kompozicijos IFN tirpalas (A) yra stabilesnis, palyginus su analogų IFN tirpalais (B ir C).

4 pavyzdys

15 Termostabilumo tyrimams paruošti trys IFN alfa-2b (18x10⁶ TV/ml) tirpalai, kurie skiriasi nuo 2 pavyzdžio tuo, kad A tirpalo komponentų koncentracijos turi didžiausias reikšmes, parodytas 1 lentelėje. Termostabilumo testai atlikti taip pat, išskyrus tai, kad IFN tirpalai inkubuojami 25°C temperatūroje. Gauti rezultatai pateikti Fig. 3. Iš gautų rezultatų matyti, kad esant 25°C naujos kompozicijos IFN tirpalas (A) yra stabilesnis, palyginus su analogų IFN tirpalais (B ir C).

5 pavyzdys

Oksiduotų produktų nustatymui pagal 2 pvz. paruošti 10 ir 18 milijonų TV/ml koncentracijos IFN alfa-2b tirpalai (A, B, C). Paruošimo metu iš visų tirpalų nebuvo pašalintas deguonis. Tirpalai buvo inkubuoti 5°C ir 25°C temperatūroje 18 mėn. Po to nustatytas oksiduoto IFN kiekis tirpaluose aukšto slėgio chromatografijos (HPLC) metodu pagal Europos Farmakopėją. Gauti rezultatai pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė

Oksiduoto IFN kiekis, susidaręs tirpaluose įvairių kompozicijų, inkubuotų prie 4°C ir 25°C, 18 mėn.

<i>IFN tirpalo pavadinimas</i>	<i>IFN koncentracija, TV/ml</i>	<i>Oksiduoto IFN kiekis, %, 4°C</i>	<i>Oksiduoto IFN kiekis, % 25°C</i>
A – Išradimo kompozicija	10x10 ⁶	1,9	2,6
	18x10 ⁶	2,0	2,4
B - pagal analogą EP 0736303	10x10 ⁶	10,6	11,9
	18x10 ⁶	8,7	11,2
C - pagal analogą EP 0777495	10x10 ⁶	8,9	23,7
	18x10 ⁶	7,1	26,6

10

Pastaba: pradiniam IFN tirpale rasta 1,9 % oksiduotos formos.

Iš gautų rezultatų matyti, kad pagal atsparumą autooksidacijai žinomi interferono tirpalai negali prilygti išrastos kompozicijos IFN tirpalams.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Interferono alfa farmacinė kompozicija, turinti buferinę sistemą ir/arba stabilizuojančius agentus ir galinti turėti chelatuojantį agentą, izotonizuojantį agentą, nejoninį detergentą bei antimikrobinį agentą, besiskirianti tuo, kad buferinę sistemą sudaro natrio citratai, o kompozicijos sudėtyje yra efektyvios glicino, polisorbato-20 ir timerosalio koncentracijos.

2. Farmacinė kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra vandeninis tirpalas, turintis :

rekombinantinio žmogaus interferono alfa-2b	$(0,01-50) \times 10^6$ TV/ml,
natrio citratų	0,08-0,1 M,
glicino	0,05-0,06 M,
polisorbato-20	0,008-0,01%,
timerosalio	0.004-0.005%.

3. Farmacinė kompozicija pagal 1 arba 2 punktą, besiskirianti tuo, kad tirpalo pH yra $6,0 \pm 0,1$.

4. Interferono alfa farmacinės kompozicijos pagal 1-3 punktus tirpalo paruošimo būdas, apimantis buferio paruošimą, stabilizuojančių agentų ir/arba nejoninio detergento bei antimikrobinio agento ištirpinimą, deguonies pašalinimą inertinių dujų pagalba ir veikliosios medžiagos tirpalo pridėjimą, besiskiriantis tuo, kad prieš interferono alfa tirpalo pridėjimą iš tirpalo nepašalinamas deguonis.

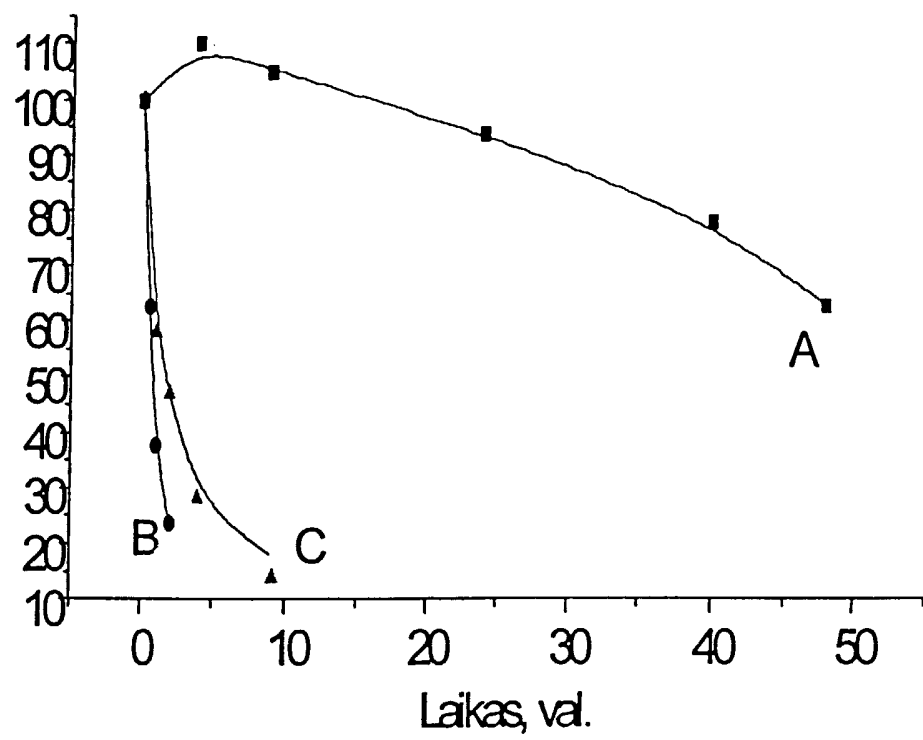


Fig1

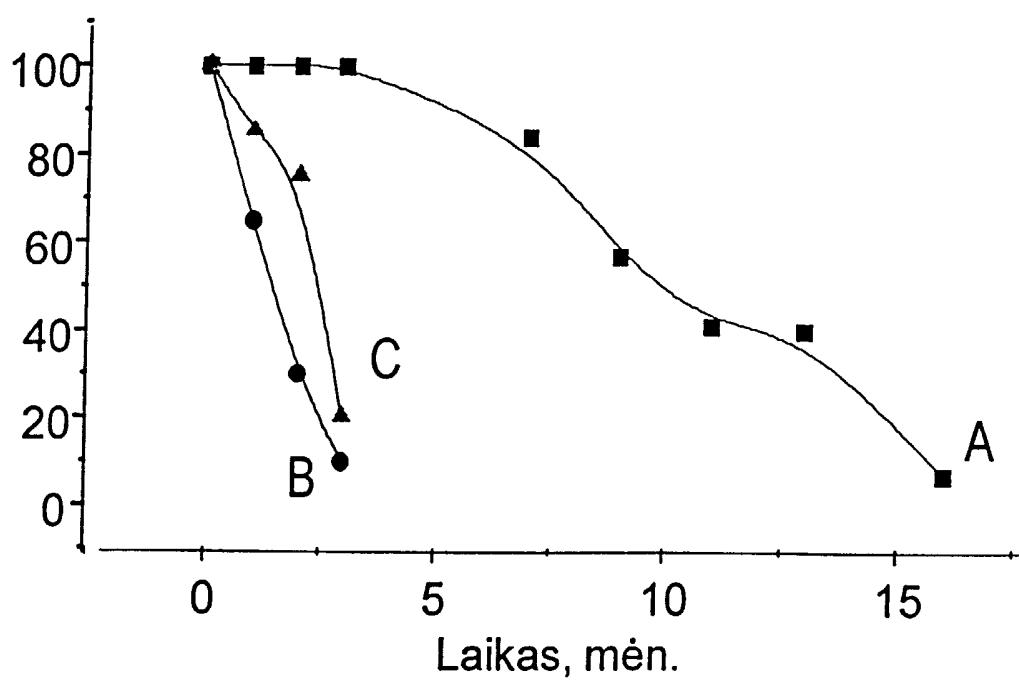


Fig.2

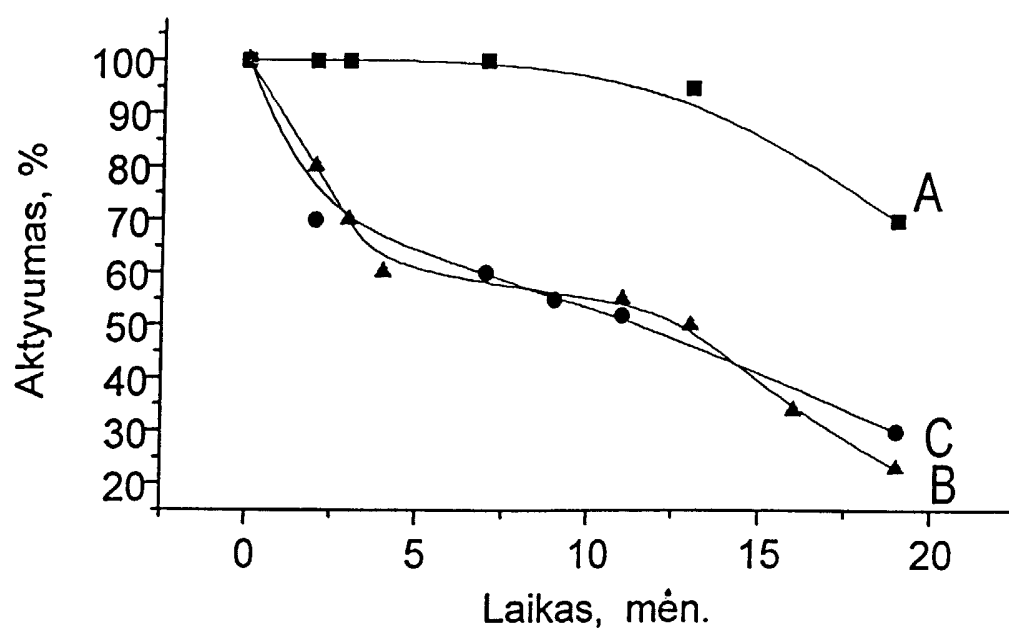


Fig.3