



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 88300

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 38/19

A61K 47/34

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ГІДРОГЕЛЕВІ КОМПОЗИЦІЇ, ЩО МІСТЯТЬ ІНТЕРФЕРОН

| 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|----|-----------------|--|-------------|------|-----------------|-------|------------|------|---------------|-------|---------------|----|-----------------|--|-------------|-------|-----------------|-------|------------|------|---------------|------|-----------|------|---------------|----|-----------------|--|-------------|-------|-----------------|-------|------------|------|--------------------------------|------|----|--|---------------|----|-----------------------------|-------|-----------------|-------|------------|------|
| (21) a200611710<br>(22) 13.05.2005<br>(24) 12.10.2009<br>(86) РСТ/ЕР2005/052219, 13.05.2005<br>(31) 04076496.1<br>(32) 17.05.2004<br>(33) EP<br>(31) 60/579,218<br>(32) 14.06.2004<br>(33) US<br>(46) 12.10.2009, Бюл.№ 19, 2009 р.<br>(72) ДЕЛЬ КУРТО МАРІЯ ДОРЛІ, ІТ, ДЗАМБАЛЬДІ ІЛАРІЯ, ІТ, ПОМПІЛІ СІЛЬВІЯ, ІТ, ЕСПОЗІТО П'Є-РАНДРЕА, ІТ<br>(73) ЕЙРЕС ТРЕЙДІНГ С.А., СН<br>(56) UA 2001085697, 10.08.01.<br>UA 2001085696, 10.08.01.<br>EP0098110 A, 11.01.84.<br>WO0158474 A, 16.08.01.<br>US4469228 A, 04.09.84. EP0177153 A, 09.04.86.<br>WO2004002404 A, 08.01.04.<br>JP2003342193 A, 03.12.03, abstract.<br>(57) 1. Фармацевтична композиція, що містить бета-інтерферон (бета-IFN), яка являє собою полксамерний гідрогель та додатково містить метіонін.<br>2. Композиція за п. 1, яка відрізняється тим, що бета-інтерфероном є рекомбінантний бета-IFN.<br>3. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка відрізняється тим, що інтерфероном є рекомбінантний бета-IFN 1a.<br>4. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка відрізняється тим, що додатково містить буфер та антиоксидант.<br>5. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка відрізняється тим, що додатково містить буфер та поверхнево-активну речовину.<br>6. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка відрізняється тим, що додатково містить модифікатор температури фазового переходу від розчину до гелю.<br>7. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка відрізняється тим, що додатково містить модифікатор температури фазового переходу від розчину до гелю, вибраний з трегалози і циклодекстрину. | 8. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка відрізняється тим, що полксамером є Poloxamer 407.<br>9. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка відрізняється тим, що містить від 20 % (мас.) до 25 % (мас.) Poloxamer 407.<br>10. Композиція за п. 1, яка відрізняється тим, що являє собою гідрогель Poloxamer 407, який містить рекомбінантний бета-IFN 1a та додатково містить буфер і L-метіонін.<br>11. Композиція за п. 10, яка відрізняється тим, що додатково містить Poloxamer 188.<br>12. Композиція за п. 11, яка відрізняється тим, що додатково містить трегалозу.<br>13. Композиція за п. 10, яка відрізняється тим, що додатково містить гідроксипропіл-бета-циклодекстрин.<br>14. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, вибрана з групи, % (мас.): <table><tr><td>Poloxamer 407</td><td>25</td></tr><tr><td>Ацетатний буфер</td><td></td></tr><tr><td>50мМ/рН 3,8</td><td>74,7</td></tr><tr><td>г-н-бета-IFN 1a</td><td>0,012</td></tr><tr><td>L-метіонін</td><td>0,03</td></tr><tr><td>Poloxamer 188</td><td>0,24;</td></tr></table><br><table><tr><td>Poloxamer 407</td><td>25</td></tr><tr><td>Ацетатний буфер</td><td></td></tr><tr><td>50мМ/рН 3,8</td><td>72,04</td></tr><tr><td>г-н-бета-IFN 1a</td><td>0,012</td></tr><tr><td>L-метіонін</td><td>0,03</td></tr><tr><td>Poloxamer 188</td><td>0,24</td></tr><tr><td>Трегалоза</td><td>2,6;</td></tr></table><br><table><tr><td>Poloxamer 407</td><td>20</td></tr><tr><td>Ацетатний буфер</td><td></td></tr><tr><td>50мМ/рН 3,8</td><td>77,34</td></tr><tr><td>г-н-бета-IFN 1a</td><td>0,015</td></tr><tr><td>L-метіонін</td><td>0,04</td></tr><tr><td>Гідроксипропіл-β-циклодекстрин</td><td>2,6;</td></tr><tr><td>та</td><td></td></tr><tr><td>Poloxamer 407</td><td>25</td></tr><tr><td>Ацетатний буфер 50мМ/рН 3,8</td><td>72,04</td></tr><tr><td>г-н-бета-IFN 1a</td><td>0,012</td></tr><tr><td>L-метіонін</td><td>0,03</td></tr></table> | Poloxamer 407 | 25 | Ацетатний буфер |  | 50мМ/рН 3,8 | 74,7 | г-н-бета-IFN 1a | 0,012 | L-метіонін | 0,03 | Poloxamer 188 | 0,24; | Poloxamer 407 | 25 | Ацетатний буфер |  | 50мМ/рН 3,8 | 72,04 | г-н-бета-IFN 1a | 0,012 | L-метіонін | 0,03 | Poloxamer 188 | 0,24 | Трегалоза | 2,6; | Poloxamer 407 | 20 | Ацетатний буфер |  | 50мМ/рН 3,8 | 77,34 | г-н-бета-IFN 1a | 0,015 | L-метіонін | 0,04 | Гідроксипропіл-β-циклодекстрин | 2,6; | та |  | Poloxamer 407 | 25 | Ацетатний буфер 50мМ/рН 3,8 | 72,04 | г-н-бета-IFN 1a | 0,012 | L-метіонін | 0,03 |
| Poloxamer 407                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 25                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| Ацетатний буфер                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| 50мМ/рН 3,8                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 74,7                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| г-н-бета-IFN 1a                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0,012                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| L-метіонін                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 0,03                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| Poloxamer 188                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0,24;                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| Poloxamer 407                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 25                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| Ацетатний буфер                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| 50мМ/рН 3,8                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 72,04                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| г-н-бета-IFN 1a                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0,012                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| L-метіонін                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 0,03                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| Poloxamer 188                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0,24                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| Трегалоза                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 2,6;                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| Poloxamer 407                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 20                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| Ацетатний буфер                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| 50мМ/рН 3,8                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 77,34                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| г-н-бета-IFN 1a                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0,015                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| L-метіонін                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 0,04                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| Гідроксипропіл-β-циклодекстрин                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 2,6;                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| та                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| Poloxamer 407                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 25                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| Ацетатний буфер 50мМ/рН 3,8                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 72,04                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| г-н-бета-IFN 1a                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0,012                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |
| L-метіонін                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 0,03                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |               |    |                 |  |             |      |                 |       |            |      |               |       |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |               |      |           |      |               |    |                 |  |             |       |                 |       |            |      |                                |      |    |  |               |    |                             |       |                 |       |            |      |

(13) C2

(11) 88300

(19) UA

Poloxamer 188 0,24  
 Поліетиленгліколь (Lutrol® E400) 2,6.

15. Спосіб одержання гідрогелевої композиції, що містить IFN за будь-яким з пп. 1-14, який включає додання певної обчисленої кількості поллоксамеру до забуференого розчину при температурі, при якій утворюється гомогенний розчин полімеру, з подальшим доданням інтерферону.

16. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що згаданий забуферений розчин містить модифікатор температури фазового переходу від розчину до гелю.

17. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що згаданий забуферений розчин містить модифікатор температури фазового переходу від розчину до гелю, вибраний з трегалози і циклодекстрину.

18. Спосіб за пп. 15-17, який **відрізняється** тим, що інтерферон додають із розчину, що містить стабілізатори, вибрані з-посеред L-метіоніну і Poloxamer 188 та їх комбінації.

19. Застосування гідрогелевої композиції, що містить IFN, за будь-яким з пп. 1-14, для одержання фармацевтичного препарату для лікування розсіяного склерозу.

Цей винахід має відношення до фармацевтичних гідрогелевих композицій, що містять інтерферон. Цей винахід, зокрема, має відношення до гідрогелевих композицій пролонгованої дії, що містять бета-інтерферон, способу їх одержання та застосування.

Лікарські форми на основі рекомбінаційних білків вже забезпечували унікальне лікування декількох раніше невиліковних хвороб, і численні нові лікарські засоби на основі білків знаходяться на стадії розробки.

Білки, як правило, вводять парентеральним шляхом, наслідком чого може бути швидке видалення білків із системи кровообігу. З метою підтримання терапевтично ефективних рівнів у крові, часто необхідним є багаторазове введення або введення великих доз. Незручність і потенційно негативні побічні ефекти такого варіанту підходу можна подолати шляхом застосування систем, які забезпечують пролонговану або контрольовану доставку білка.

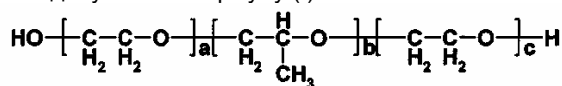
Системи пролонгованої доставки можуть забезпечити більш постійні рівні білкових лікарських засобів у крові, порівняно з тими, які одержують у разі введення у вигляді болюса, наслідком чого є поліпшена ефективність лікарського засобу і менша кількість негативних побічних ефектів. До числа таких систем доставки лікарських засобів належать масла для ін'єкцій, емульсії, суспензії, ліпосоми, мікрочастинки (мікрокапсули або мікросфери), імпланти або гелеві системи.

З-посеред гелевих систем, що застосовуються для доставки лікарських засобів, поллоксамерні гелі застосовують завдяки їх унікальній властивості як термореактивні гелетвірні матеріали *in situ*. Поллоксамери являють собою блокспівполімери поліетиленоксиду і поліпропіленоксиду, добре відомі як неіоногенні поверхнево-активні речовини, які утворюють водні гелі, що зазнають переходів від стану низької до стану високої в'язкості внаслідок підвищення температури, що називають "терможелатинуванням".

На додаток до цього, поллоксамери мають добрі зволожувальні, антипіні та солюбілізуювальні властивості і широко застосовуються у фармацевтичних і медичних цілях як носії для доставки лікарських засобів (Гузман (Guzman) та інші, 1992,

International Journal of Pharmaceutics, 80, 119-127; Гандер (Gander) та інші, 1986, Drug Dev. and Indust. Pharmacy, 12 (11-13), 1613-1623).

Поллоксамери торгової марки Pluronic®, являють собою потрібні блокспівполімери, що мають наведену нижче Формулу (I):



(I)

де (a) і (c) є статистично однаковими, (b) дорівнює або перевищує 15 і (a+c) становлять від 20% до 90% маси молекули.

Два ланцюги поліетиленоксиду (PEO) є гідрофільними, у той час як ланцюг поліпропілену (PPO) є гідрофобним, завдяки чому блокспівполімери PEO-PPO-PEO мають амфіфільні властивості, які можуть модулюватись шляхом зміни кількості структурних одиниць (a) і (b).

Завдяки своїй амфіфільній природі, блокспівполімери PEO-PPO-PEO здатні до автоагрегування з утворенням різноманітних асоційованих структур, наприклад, міцел і рідких кристалічних фаз, а також мікроемульсій.

З-посеред плуроників (Pluronic®), Poloxamer 407 (Lutrol® F127 або Pluronic® F127), поллоксамер Формули (I), де (a)=(c)=99 та (b)=65, і Poloxamer 338 (Lutrol® F108 або Pluronic® F108), поллоксамер Формули (I), де (a)=(c)=16 та (b)=46, відомі завдяки властивостям терможелатинування їхніх водних розчинів 20%-25% концентрації (Гузман (Guzman) та інші, 1992, дивись вище). Зокрема, 22%-25% (мас.) розчин полімеру Poloxamer 407 є рідким при відносно низьких температурах, тобто 4-10°C, однак швидко утворює твердий гель високої в'язкості у разі нагрівання вище характеристичної температури фазового переходу, тобто 18-20°C (Гузман (Guzman) та інші, 1992, дивись вище).

Було встановлено, що гелі Poloxamer 407 підвищують стійкість білків, введених до гелевої матриці (Страттон (Stratton) та інші, 1997, Journal of Pharmaceutical Sciences, 86, 9, 1006-1010) і їх застосовували для одержання різних композицій, у тому числі лідокаїну (Чен-Чоу (Chen-Chow) та інші, 1981, International Journal of Pharmaceutics, 8, 89-99), індометацину (Міязакі (Miyazaki) та інші, 1986,

Chem. Pharm. Bull., 34(4), 1801-1808) та IL-2 (інтерлейкін) (Джонстон (Johnston) та інші, 1992, Pharmaceutical Research, 9(3), 425-434).

Інтерферони є цитокінами, тобто розчинними білками, які передають повідомлення між клітинами та відіграють суттєву роль у імунній системі шляхом надання допомоги при знищенні мікроорганізмів, які спричиняють інфекцію, і усунення будь-якого пошкодження, яке виникає унаслідок цього. Інтерферони природним шляхом секретуються інфікованими клітинами і вперше були ідентифіковані у 1957 році. Їх назва отримана завдяки тому факту, що вони "перешкоджають" процесам реплікації та продукування вірусів. Інтерферони демонструють як протівірусну, так і антипроліферативну активність. На основі біохімічних та імунологічних властивостей природні людські інтерферони підрозділяють на три головні класи: альфа-інтерферон (лейкоцитарний інтерферон), бета-інтерферон (фібробластний інтерферон) та гамма-інтерферон (імунний інтерферон). Зараз альфа-інтерферон схвалений у Сполучених Штатах та інших країнах для лікування лейкозу волосатих клітин, гострокінцевих кондилом, саркоми Капоші (рак, який, як правило, уражає хворих, що страждають на синдром набутого імунodefіциту (СНІД)) та хронічний ні-А, ні-В гепатит.

На додаток до цього, інтерферони (IFNs) являють собою глікопротеїни, які продукуються організмом у відповідь на вірусну інфекцію. Вони пригнічують розмноження вірусів у захищених клітинах. Складаючись з білка низької молекулярної маси, інтерферони є вкрай неспецифічними за своєю дією, тобто інтерферон, індукований одним вірусом, є ефективним проти широкого діапазону інших вірусів. Інтерферони, однак, є видоспецифічними, тобто інтерферон, продукований одним видом, буде стимулювати антивірусну активність лише в клітинах того самого або близько спорідненого виду. Інтерферони були першою групою цитокінів, які почали застосовувати завдяки їхній потенційній протипухлинній та протівірусній активності.

Три основні інтерферони називають  $\alpha$ -інтерфероном ( $\alpha$ -IFN),  $\beta$ -інтерфероном ( $\beta$ -IFN) та  $\gamma$ -інтерфероном ( $\gamma$ -IFN). Спочатку інтерферони були класифіковані на такі головні види відповідно до їхніх клітин походження (лейкоцит, фіброblast або Т-клітина). Виявилось, однак, що одна клітина може продукувати декілька типів. З цієї причини зараз лейкоцитарний інтерферон називають  $\alpha$ -IFN, фібробластний інтерферон називають  $\beta$ -IFN, а Т-клітинний інтерферон називають  $\gamma$ -IFN. Існує також інтерферон четвертого типу, лімфобластоїдний інтерферон, що продукується лінією клітин "Natalwa" (яка була одержана з лімфоми Бюркіта), яка, як видається, продукує суміш як лейкоцитарних, так і фібробластних інтерферонів.

Показником активності інтерферону є одиниця інтерферону або міжнародна одиниця інтерферону (U (Од.) або IU (МОд.) для міжнародної одиниці), яка визначається як кількість, необхідна для захисту 50% клітин проти вірусного пошкодження. Аналізом, який може застосовуватись для визначення біологічної активності, є аналіз пригнічення

цитопатичного ефекту, як описано (Рубінштейн (Rubinstein) та інші, 1981, J. Virol., 37, 755-758; Фамілетті (Familletti) та інші, 1981, Methods in Enzymology, 78, Pestka Ed., Academic press, New York, 387-394). Кількість інтерферону у цьому антивірусному аналізі, необхідна для продукування 50% цитопатичного ефекту, дорівнює приблизно 1 Од/мл. Згадані одиниці визначаються відносно міжнародного контрольного еталону людського бета-інтерферону, який надається Національним Інститутом Здоров'я (National Institutes of Health) (ІТестка (Pestka), 1986, Methods in Enzymology, 78, Pestka Ed., Academic press, New York 119, 14-23).

Кожен клас інтерферонів містить декілька різних типів. Кожен з  $\beta$ -IFN і  $\gamma$ -IFN є продуктом одного гена.

Білки, які класифікуються як  $\alpha$ -інтерферони, є найбільш різноманітною групою, що містить приблизно 15 типів. У 9 хромосомі знаходиться кластер генів  $\alpha$ -IFN, до складу якого входить щонайменше 23 члени, 15 членів з яких є активними і транскрибуються. Зрілі  $\alpha$ -інтерферони не глікозилюються.

$\alpha$ -інтерферони і  $\beta$ -інтерферони мають однакову довжину (165 амінокислот або 166 амінокислот) і подібні біологічні активності. Довжина  $\gamma$ -інтерферонів дорівнює 146 амінокислотам і вони менш схожі на  $\alpha$  і  $\beta$  класи. Лише  $\gamma$ -інтерферони можуть активувати макрофаги або індукувати визрівання Т-клітин-кілерів. Ці нові типи терапевтичних засобів можуть інколи називатись модуляторами біологічної реакції (BRMs), оскільки вони впливають на реакцію організму на пухлину, негативно впливаючи на розпізнавання через механізм імунomodуляції.

Людський фібробластний інтерферон (IFN- $\beta$ ) має антивірусну активність і може також стимулювати природні клітини-кілери проти пухлинних клітин. Це поліпептид масою приблизно 20000 Да, що індукується вірусами і двонитковими РНК. Повну амінокислотну послідовність цього білка розшифрували з нуклеотидної послідовності гена для фібробластного інтерферону, клонованого методами рекомбінантних ДНК (Деринк (Derynk) та інші, 1980, Nature, 285, 542-547). Його довжина становить 166 амінокислот.

Шепард (Shepard) та інші, 1981, Nature, 294, 563-565 описав мутацію на основі 842 (Cys $\rightarrow$ Tyr у положенні 141), яка ліквідує його антивірусну активність, і варіантний клон із делецією нуклеотидів 1119-1121.

Марк (Mark) та інші, 1984, Proc. Natl. Acad. Set U.S.A., 81(18), 5662-5666 здійснив штучну мутацію шляхом заміни основи 469 (Т) на (А), унаслідок чого відбулась амінокислотна заміна Cys $\rightarrow$ Ser у положенні 17. Повідомляли, що активність IFN- $\beta$ , який одержали, була такою самою, що і активність "нативного" IFN- $\beta$  і він мав таку саму стійкість впродовж тривалого зберігання; (-70°C).

Rebif® (рекомбінантний  $\beta$ -інтерферон фірми Serono), найостанніша розробка у галузі інтерферонотерапії розсіяного склерозу (MS), являє собою бета-інтерферон (IFN)-1a, який продукується лініями клітин ссавців. Рекомендованою міжнародною

непатентованою назвою (INN) цього інтерферону є "бета інтерферон-1а".

Впродовж останніх десятиріч були розроблені різноманітні композиції інтерферонів зі співполімерами. До їх числа входять описані композиції альфа-інтерферону для ін'єкцій, що містять поліоксіетилен та поліоксипропіленгліколь (JP 2003 342193), комбіновані композиції цикларадинау-альфа-інтерферону (EP 0177153), набори, до складу яких входить альфа-інтерферон та полксамерні гелі для місцевого застосування при кімнатній температурі (патент США №4,469,228), композиції мікрочастинок  $\beta$ -IFN (WO 01/58474), композиції, що містять глікопротеїни, хімічно зв'язані зі співполімерами поліоксіетилену та поліоксипропілену (EP 0098110) та композиції  $\beta$ -IFN для доставки через слизову оболонку, зокрема, інтраназальної, доставки (WO 2004/002404).

Як і з усіма фармацевтичними засобами на основі білків, однією з головних проблем у застосуванні інтерферону як терапевтичного засобу, є підтримка у крові рівня терапевтично ефективної дози впродовж певного періоду часу без підвищення дози, яка вводиться, і потенційних пов'язаних із цим побічних ефектів.

Унаслідок цього, існує потреба у фармацевтичних композиціях інтерферону, які підтримують рівні інтерферону у плазмі впродовж довгих періодів часу, аніж рідкі композиції та/або забезпечують тривалішу дію інтерферону у плазмі, що сприяє підтримці або поліпшенню біологічної активності інтерферону.

Цей винахід спрямовано на полксамерні гідрогелеві фармацевтичні композиції або фармацевтичні композиції, які забезпечують одержання полксамерного гелю *in vivo*, що містять інтерферон (IFN), зокрема, рекомбінантний людський  $\beta$ -IFN-1а, та способи їх одержання. Ці фармацевтичні композиції являють собою гідрогелі, одержані за допомогою полксамерів, зокрема, Poloxamer 407. Такі фармацевтичні композиції у цьому описі називають IFN "гідрогелями", і вони містять інтерферон (IFN) або ізоформу, мутеїн, гібридний білок, функціональну похідну, активну фракцію інтерферону.

Перевага полксамерних гідрогелевих композицій, що містять IFN, за цим винаходом полягає у тому, що вони являють собою гель, який легко одержується *in vivo*, яким легко орудувати і який демонструє профіль пролонгованої дії та/або підвищену біологічну доступність, порівняно з нерозбавленими композиціями, що містять IFN.

Відповідно до варіанта здійснення цього винаходу, згадані гідрогелі додатково містять щонайменше один стабілізатор.

Відповідно до іншого варіанта здійснення цього винаходу, згадані гідрогелі додатково містять щонайменше один модифікатор температури фазового переходу від розчину до гелю як наповнювач.

За першим аспектом, винахід пропонує фармацевтичну композицію, що містить інтерферон (IFN) або ізоформу, мутеїн, гібридний білок, функціональну похідну або активну фракцію інтерферону, де згаданою композицією є полксамерний гідрогель.

За другим аспектом, винахід пропонує спосіб одержання гідрогелевої композиції, що містить IFN, за цим винаходом, який включає додання розрахованої кількості полксамеру до забуференою розчину при температурі, при якій одержують гомогенний розчин полімеру, з подальшим доданням інтерферону або ізоформи, мутеїну, гібридного білка, функціональної похідної або активної фракції інтерферону.

За третім аспектом, винахід пропонує застосування гідрогелевої композиції, що містить бета-інтерферон, за цим винаходом, для одержання фармацевтичного препарату для лікування розсіяного склерозу.

За четвертим аспектом, винахід пропонує спосіб лікування розсіяного склерозу, який включає введення композиції пролонгованої дії, що містить бета-інтерферон, за цим винаходом, хворому, який цього потребує.

У наведених нижче параграфах пропонуються визначення різних хімічних складників, з яких складаються сполуки за цим винаходом, і які призначені для постійного застосування впродовж усього опису і у формулі винаходу, якщо інше явно виражене визначення не пропонує більш широкого визначення.

Термін "інтерферон" або "IFN", який вживають у цьому описі, означає будь-яку молекулу, яка визначається як така у літературі, і включає, наприклад, інтерферони будь-яких типів, що згадуються у вищенаведеному розділі "Передумови створення винаходу". Зокрема, вищенаведене визначення включає  $\alpha$ -IFN,  $\beta$ -IFN та  $\gamma$ -IFN. За цим винаходом,  $\beta$ -IFN є інтерфероном, якому віддається перевага. Відповідний  $\beta$ -IFN за цим винаходом є комерційно доступним, наприклад, як Rebif® (фірма Serono), Avonex® (фірма Biogen) або Betaferon® (фірма Schering).

Термін "бета-інтерферон (бета-IFN або  $\beta$ -IFN)", який вживають у цьому описі, включає фізобластний інтерферон, зокрема, людського походження, який одержують шляхом виділення з біологічних рідин або методами рекомбінантних ДНК із прокаріотичних або еукаріотичних клітин-хазяїв, а також його солі, функціональні похідні, варіанти, аналоги і активні фрагменти. Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, бета-IFN означає рекомбінантний бета-інтерферон-1а.

$\beta$ -IFN, придатний за цим винаходом, є комерційно доступним, наприклад, як Rebif® (фірма Serono), Avonex® (фірма Biogen) або Betaferon® (фірма Schering). За цим винаходом перевагу також віддають застосуванню інтерферонів людського походження. Термін "інтерферон", який вживають у цьому описі, включає його солі, функціональні похідні, варіанти, аналоги і активні фрагменти.

Rebif® (рекомбінантний  $\beta$ -інтерферон) є найостаннішою розробкою у галузі інтерферонотерапії для розсіяного склерозу (MS) і представляє суттєвий прогрес у лікуванні. Rebif® являє собою бета-інтерферон (IFN) 1а, який одержують із ліній клітин ссавців. Було встановлено, що підшкірне введення бета-інтерферону-1а, що проводиться тричі на тиждень, є ефективним при лікуванні рецидивно-

ремітуючого розсіяного склерозу (RRMS). Бета-інтерферон-1а може мати позитивний ефект на довготривалий перебіг розсіяного склерозу завдяки зменшенню кількості і тяжкості рецидивів і зниженню тяжкості і активності захворювання, що визначається за допомогою магітно-резонансної томографії (МР-томографії).

Дозування  $\beta$ -IFN при лікуванні рецидивно-ремітуючого розсіяного склерозу за цим винаходом залежить від застосованого типу  $\beta$ -IFN.

За цим винаходом, у разі, коли інтерфероном є рекомбінантний  $\beta$ -IFN 1b, що продукується E. Coli, комерційно доступний під торговою маркою Betaseron®, він, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, може вводиться підшкірно через день у дозі від приблизно 250мкг до 300мкг або від 8МОд до 9,6МОд на людину.

За цим винаходом, у разі, коли інтерфероном є рекомбінантний  $\beta$ -IFN 1a, що продукується клітинами яєчника китайського хом'ячка (клітинами CHO), комерційно доступний під торговою маркою Avonex®, він, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, може вводиться внутрішньом'язово один раз на тиждень у дозі від приблизно 30мкг до 33мкг або від 6МОд до 6,6МОд на людину.

За цим винаходом, у разі, коли інтерфероном є рекомбінантний  $\beta$ -IFN 1a, що продукується клітинами яєчника китайського хом'ячка (клітинами CHO), комерційно доступний під торговою маркою Rebif®, він, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, може вводиться підшкірно тричі на тиждень (TIW) у дозі від приблизно 22мкг до 44мкг або від 6МОд до 12МОд на людину.

Термін "мутеїни", який вживається у цьому описі, означає аналоги інтерферону, у яких один або декілька амінокислотних залишків природного інтерферону замінюють на різні амінокислотні залишки або їх піддають делеції чи один або декілька амінокислотних залишків додають до природної послідовності інтерферону без значної зміни активності одержаних продуктів, порівняно з інтерфероном дикого типу. Ці мутеїни одержують відомими методами синтезу та/або способами сайт-спрямованого мутагенезу чи будь-яким іншим відомим, придатним у цьому випадку способом. До мутеїнів, яким віддається перевага, належать, наприклад, мутеїни, опис яких наведено Шепард (Shepard) та інші, 1981, дивись вище або Марк (Mark) та інші, 1984, дивись вище.

Будь-який з таких мутеїнів, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, має послідовність амінокислот, яка дублює амінокислотну послідовність інтерферону достатньою мірою для того, щоб мати активність, по суті подібну або навіть кращу за активність інтерферону. Біологічна функція інтерферону є добре відомою фахівцю у цій галузі, і біологічні стандарти є встановленими і доступними, наприклад, від Національного Інституту Біологічних Стандартів та Контролю (National Institute for Biological Standards and Control) (<http://immunology.org/links/NIBSC>).

Існує описання біологічних аналізів для визначення активності інтерферону. Аналіз інтерферону може здійснюватись так, наприклад, як описано Рубінштейн (Rubinstein) та іншими, 1981, дивись

вище. Таким чином, шляхом звичайного експериментування можна визначити, чи має будь-який даний мутеїн активність, по суті подібну або навіть кращу за активність інтерферону.

До числа мутеїнів інтерферону, які можуть застосовуватись за цим винаходом, або нуклеїнових кислот, які їх кодують, належить кінцевий набір по суті відповідних послідовностей у ролі замісних пептидів або полінуклеотидів, які можуть бути звичайним шляхом одержані пересічним фахівцем у цій галузі без зайвого експериментування, виходячи із вказівок та настанов, наведених у цьому описі.

Замінами мутеїнів, яким віддається перевага за цим винаходом, є заміни, відомі як "консервативні" заміни. Консервативні амінокислотні заміни поліпептидів або білків за цим винаходом можуть включати синонімічні амінокислоти у межах групи, які мають фізико-хімічні властивості, достатньо подібні для того, щоб заміна між членами групи зберегла біологічну функцію молекули. Зрозуміло, що у вищевизначених послідовностях інсерції та делеції амінокислот можуть здійснюватись без зміни їхньої функції, зокрема, якщо згадані інсерції або делеції залучають лише декілька амінокислот, наприклад, менше тридцяти, а відповідно до варіанта, якому віддається перевага, менше десяти, і не видаляють або зміщують амінокислот, які є критичними для, функціональної конформації, наприклад, залишків цистеїну. Білки та мутеїни, одержані унаслідок таких делецій та/або інсерцій, входять до сфери дії цього винаходу.

Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, синонімічними амінокислотними групами є групи, визначені у Таблиці I. Відповідно до варіанта, якому віддається більша перевага, синонімічними амінокислотними групами є групи, визначені у Таблиці II; і відповідно до варіанта, якому віддається найбільша перевага, синонімічними амінокислотними групами є групи, визначені у Таблиці III.

Таблиця I

Групи синонімічних амінокислот, яким віддається перевага

| Амінокислота | Синонімічна група                 |
|--------------|-----------------------------------|
| Ser          | Ser, Thr, Gly, Asn                |
| Arg          | Arg, Gln, Lys, Glu, His           |
| Leu          | Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu      |
| Pro          | Gly, Ala, Thr, Pro                |
| Thr          | Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr |
| Ala          | Gly, Thr, Pro, Ala                |
| Val          | Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val      |
| Gly          | Ala, Thr, Pro, Ser, Gly           |
| Ile          | Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile      |
| Phe          | Trp, Met, Tyr, He, Val, Leu, Phe  |
| Tyr          | Tip, Met, Phe, lie, Val, Leu, Tyr |
| Cys          | Ser, Thr, Cys                     |
| His          | Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His      |
| Gln          | Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln |
| Asn          | Gln, Asp, Ser, Asn                |
| Lys          | Glu, Gln, His, Arg, Lys           |
| Asp          | Glu, Asn, Asp                     |

|     |                                   |
|-----|-----------------------------------|
| Glu | Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu |
| Met | Phe, Ile, Val, Leu, Met           |
| Trp | Trp.                              |

Таблиця II

Групи синонімічних амінокислот, яким віддається більша перевага

| Амінокислота | Синонімічна група       |
|--------------|-------------------------|
| Ser          | Ser                     |
| Arg          | His, Lys, Arg           |
| Leu          | Leu, Ile, Phe, Met      |
| Pro          | Ala, Pro                |
| Thr          | Thr                     |
| Ala          | Pro, Ala                |
| Val          | Val, Met, Ile           |
| Gly          | Gly                     |
| Ile          | He, Met, Phe, Val, Leu  |
| Phe          | Met, Tyr, He, Leu, Phe  |
| Tyr          | Phe, Tyr                |
| Cys          | Cys, Ser                |
| His          | His, Gln, Arg           |
| Gln          | Glu, Gln, His           |
| Asn          | Asp, Asn                |
| Lys          | Lys, Arg                |
| Asp          | Asp, Asn                |
| Glu          | Glu, Gln                |
| Met          | Met, Phe, Ile, Val, Leu |
| Trp          | Trp.                    |

Таблиця III

Групи синонімічних амінокислот, яким віддають найбільшу перевагу

| Амінокислота | Синонімічна група |
|--------------|-------------------|
| Ser          | Ser               |
| Arg          | Arg               |
| Leu          | Leu, Ile, Met     |
| Pro          | Pro               |
| Thr          | Thr               |
| Ala          | Ala               |
| Val          | Val               |
| Gly          | Gly               |
| Ile          | Ile, Met, Leu     |
| Phe          | Phe               |
| Tyr          | Tyr               |
| Cys          | Cys, Ser          |
| His          | His               |
| Gln          | Gln               |
| Asn          | Asn               |
| Lys          | Lys               |
| Asp          | Asp               |
| Glu          | Glu               |
| Met          | Met, Ile, Leu     |
| Trp          | Met.              |

Приклади здійснення амінокислотних замінів у білках, які можуть застосовуватись для одержання мутеїнів інтерферону, для застосування у цьому винаході, включають стадії будь-яких відомих способів, наприклад, представлених у патентах США

№4,959,314, №4,588,585 і №4,737,46 на ім'я Марк (Mark) та інші; №5,116,943 на ім'я Коте (Koths) та інші; №4,965,195 на ім'я Намен (Namen) та інші; № 4,879,111 на ім'я Чонг (Chong) та інші; та №5,017,691 на ім'я Лі (Lee) та інші; та білки із заміною лізину, представлені у патенті США №4,904,584 на ім'я Шоу (Shaw) та інші. Специфічні мутеїни бета-IFN були описані, наприклад, Марк (Mark) та іншими, 1984, дивись вище.

Термін "гібридний білок" означає поліпептид, що містить інтерферон або його мутеїн, злитий з іншим білком, який, наприклад, має подовжений час утримання у загальній воді організму. Інтерферон може, таким чином, бути злитим з іншим білком, поліпептидом тощо, наприклад, імуноглобуліном або його фрагментом.

Словосполучення "функціональні похідні", що застосовується у цьому описі, означає похідні інтерферону, їхні мутеїни та гібридні білки, які можна одержати з функціональними групами, які існують у вигляді бічних ланцюгів на залишках або N-чи C-кінцевих групах, способами, відомими у цій галузі, і які включаються до цього винаходу доти, доки вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто вони не знижують активності білка, яка є по суті подібною до активності інтерферону, і не наділяють токсичними властивостями композиції, які їх містять. До числа цих похідних можуть, наприклад, бути включені бічні ланцюги поліетиленгліколю, які можуть маскувати ділянки детермінанти і подовжувати час утримання інтерферону у загальній воді організму. До інших похідних належать складні аліфатичні ефіри карбоксильних груп, амідні карбоксильних груп, які одержують шляхом реакції з аміаком або з первинними чи вторинними амінами, N-ацильні похідні вільних аміногруп амінокислотних залишків, одержаних з ацильними складовими (наприклад, алканойльні або карбоциклічні ароїльні групи) або O-ацильні похідні вільних гідроксильних груп (наприклад, похідні залишків серилу або треонілу), які одержують з ацильними складовими.

Під "активними фракціями" інтерферону або мутеїнів та гібридних білків у цьому винаході розуміють будь-який фрагмент або попередники поліпептидного ланцюга білкової молекули самостійно або разом з асоційованими молекулами або залишками, пов'язаними з нею, наприклад, залишками цукру або фосфату, чи агрегати білкової молекули або залишки цукру між собою, за умови, що активність згаданої фракції не є суттєво зниженою, порівняно з відповідним інтерфероном.

За цим винаходом, застосуванню рекомбінантного бета-IFN 1a та сполук за цим винаходом також віддається особлива перевага.

Нещодавно описали варіант інтерферону особливого роду. Так звані "консенсусні інтерферони" являють собою штучні варіанти інтерферону (патент США №6,013,253). Відповідно до варіанта здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, згадані сполуки за цим винаходом застосовуються у поєднанні з консенсусним інтерфероном.

Словосполучення "консенсус людського інтерферону (IFN-con)", яке вживають у цьому описі,

означає штучний поліпептид, який, головним чином, включає ті залишки амінокислот, що є спільними для субпопуляції альфа-інтерферону, яка представляє більшість послідовностей підтипу природного людського лейкоцитарного інтерферону і яка включає, у одному або декількох з тих положень, де немає амінокислот, спільних для усіх підтипів, амінокислоту, яка, головним чином, займає це положення, і у жодному разі не включає будь-якого залишку амінокислоти, який не існує у цьому положенні у щонайменше одному природному підтипі. IFN-con включає (але ними не обмежується) амінокислотні послідовності, позначені як IFN-con1, IFN-con2 та IFN-con3, які розкриваються у патентах США №4,695,623, №4,897,471 та №5,541,293. Послідовності ДНК, що кодують IFN-con, можуть бути одержані як описано у вищезгаданих патентах або за допомогою інших стандартних способів.

За додатковим варіантом здійснення, якому віддається перевага, гібридний білок включає злиття імуноглобулінів. Згадане злиття може бути безпосереднім або здійснюватись за допомогою короткого лінкерного пептиду, довжина якого може становити усього 1-3 амінокислотні залишки або більше, наприклад, 13 амінокислотних залишків. Згаданий лінкер може бути трипептидом із послідовністю E-F-M (Glu-Phe-Met), наприклад, лінкером із послідовністю 13 амінокислот, які включають Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met, введеним між послідовністю інтерферону і послідовністю імуноглобуліну. Одержаний гібридний білок може мати поліпшені властивості, наприклад, подовжений час утримання у загальній воді організму (період напіввиведення), підвищену специфічну активність, підвищений рівень експресії або полегшується очищення згаданого гібридного білка.

За додатковим варіантом здійснення, якому віддається перевага, інтерферон зливають із константною ділянкою молекули імуноглобуліну. Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, інтерферон зливають із ділянками важкого ланцюга, наприклад, доменами  $\text{CH}_2$  та  $\text{CH}_3$  людського IgG<sub>1</sub>. Інші ізоформи молекул імуноглобуліну є також придатними для одержання гібридних білків за цим винаходом, наприклад, ізоформи IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> чи IgG<sub>4</sub>, або імуноглобуліни інших класів, наприклад, IgM чи IgA. Гібридні білки можуть бути мономерними або мультимерними, гетеро- або гомомультимерними.

За додатковим варіантом здійснення, якому віддається перевага, функціональна похідна являє собою щонайменше одну складову, приєднану до однієї або декількох функціональних груп, які існують як один або декілька бічних ланцюгів на залишках амінокислот. Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, згаданою складовою є поліетиленова (PEG) складова. Поліетиленгліколізація може здійснюватись відомими способами, наприклад, способами, описаними у WO 99/55377.

Доза, введена індивіду, буде змінюватись у залежності від ряду факторів, у тому числі фармакокінетичних властивостей, шляху введення, стану хворого і характеристик (стать, вік, маса тіла, стан

здоров'я і розміри), тяжкості симптомів, одночасно здійснюваного лікування, частоти лікування та бажаного ефекту.

Стандартні дози людського бета-IFN 1a коливаються у межах від 80000МОД/кг до 200000МОД/кг на добу або від 6 мільйонів МОД/добу до 12 мільйонів МОД/добу на людину чи від 22мкг до 44мкг на людину. За цим винаходом, бета-IFN 1a може відповідно до варіанта, якому віддається перевага, вводитись у дозі від приблизно 1мкг до 500мкг, відповідно до варіанта, якому віддається більша перевага, від приблизно 10мкг до 308мкг або від приблизно 10мкг до 260мкг на людину один раз на тиждень або менше.

Введення активних інгредієнтів за цим винаходом може здійснюватись внутрішньом'язовим або підшкірним шляхом. Шляхом введення інтерферону, якому віддається перевага, є підшкірний шлях.

Інтерферон може також вводитись через два дні або з меншою частотою. Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, інтерферон вводять один раз, двічі або тричі на тиждень.

Шляхом введення, якому віддається перевага, є підшкірне введення, яке здійснюють, наприклад, один раз на тиждень або рідше.

Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, концентрація бета-IFN 1a у композиції дорівнює або становить від приблизно 10мкг/мл до або приблизно до 800мкг/мл, відповідно до варіанта, якому віддається більша перевага, дорівнює або становить від приблизно 20мкг/мл до або приблизно до 500мкг/мл, відповідно до варіанта, якому конкретно віддається ще більша перевага, дорівнює або становить від приблизно 30мкг/мл до або приблизно до 300мкг/мл, відповідно до варіанта, якому віддається найбільша перевага, вона становить або дорівнює приблизно 44мкг/мл, 88мкг/мл або 264мкг/мл.

Термін "гідрогель" означає зшити сітку гідрофільних полімерів, яка має здатність до самоорганізування у тривимірну структуру, що містить великі кількості води. Полосамери являють собою полімери, особливість яких полягає у створенні міцел у водному розчині. У разі підвищених концентрацій та/або підвищеної температури, полосамери зазнають "желатинування" (перехід від розчину до гелю) шляхом асоціювання міцел з утворенням рідкої кристалічної фази (гелю) унаслідок підвищених міжміцелярних взаємодій. У подальшому, при ще вищих температурах, гель знову розплавляється (Бромберг (Bromberg) та інші, 1998, Advanced Drug Delivery Reviews 31, 197-221).

Температури фазового переходу залежать від концентрації полосамеру у воді. Перехід від розчину до гелю, як правило, відбувається при температурах у межах від 5°C до 30°C, а перехід від гелю до розчину відбувається при температурі 35-50°C у діапазоні концентрації полімеру від 20% (мас.) до 30% (мас). Таким чином, термін "полосамерний гідрогель" за цим винаходом означає розчин полосамеру, який має властивість желатинування (перехід від розчину до гелю) при температурі людського тіла. Полосамерні гідрогелі за цим винаходом, наприклад, містять від 20% (мас.)

до, 30% (мас.) полоксамеру, як правило, від 20% (мас.) до 25% (мас.). Таким чином, термін "гідрогель" означає також *in vivo* утворюваний гель.

Термін "модифікатор температури фазового переходу від розчину до гелю" означає наповнювач, який є здатним до зміщення, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, до підвищення температури переходу від розчину до гелю гідрогелю, що містить бета-інтерферон. Прикладами таких модифікаторів є цукри, наприклад, трегалоза, поліетиленгліколь, гліцерин, наприклад, Glycerol 30°, та циклодекстрини, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, гідроксипропіл- $\beta$ -циклодекстрин. Модифікатор температури фазового переходу від розчину до гелю може застосовуватись, наприклад, для підвищення температури фазового переходу гідрогелю до рівня приблизно кімнатної температури для поліпшення його придатності для здійснення ін'єкцій за допомогою шприца та/або підвищення температури зберігання. Гідрогель за цим винаходом може містити, наприклад, від приблизно 1% (мас.) до 3% (мас.) модифікатора температури фазового переходу від розчину до гелю, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, приблизно 2,6% (мас.).

Термін "поверхнево-активна речовина" означає розчинну сполуку, яка знижує поверхневий натяг рідин або зменшує міжфазний натяг між двома рідинами або між рідиною і твердою речовиною, де поверхневий натяг являє собою силу, яка діє на поверхню рідини, намагаючись звести до мінімального рівня площу поверхні. Подеколи поверхнево-активні речовини застосовують у фармацевтичних композиціях, у тому числі для доставки лікарських засобів і поліпептидів низької молекулярної маси, для модифікування абсорбції лікарського засобу або його доставки до тканин-мішеней. До числа добре відомих поверхнево-активних речовин належать складні ефіри поліоксіетиленової жирної кислоти (похідні поліоксіетилену; твін), а також плуроніки.

За одним із варіантів здійснення цього винаходу, плуроніки являють собою поверхнево-активні речовини, які відповідно до варіанта, якому віддається перевага, присутні у стабілізованій рідкій композиції інтерферону, що застосовується для одержання гідрогелів за цим винаходом.

Відповідно до іншого варіанта здійснення цього винаходу, плуроніки, вибрані з-посеред Pluronic® F77 (Poloxamer 217), Pluronic® F87 (Poloxamer 237), Pluronic® 88 (Poloxamer 238) та Pluronic® F68 (Poloxamer 188), відповідно до варіанта, якому віддають особливу перевагу, Pluronic® F68 (Pluronic® F68, BASF), присутні у стабілізованій рідкій композиції інтерферону, що застосовується для одержання гідрогелів за цим винаходом.

Плуроніки, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, присутні у стабілізованій рідкій композиції інтерферону з концентрацією, яка є достатньою для підтримання стійкості інтерферону впродовж бажаного періоду зберігання (наприклад, від 12 місяців до 24 місяців), а також із концентрацією, яка є достатньою для запобігання втратам білка унаслідок адсорбції на поверхнях, таких як флакон, ампула або циліндр шприца.

За типовим варіантом, Lutrol F68: 25-200 кратний мольний надлишок (відносно інтерферону), відповідно до варіанта, якому віддається перевага, 50-кратний мольний надлишок (приблизно 3мг/мл, якщо введена кількість інтерферону становить приблизно 150мкг/мл).

Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, концентрація плуроніків, зокрема Pluronic® F68, у рідких стабілізованих композиціях інтерферону дорівнює або становить від приблизно 0,01мг/мл до або приблизно до 10мг/мл, відповідно до варіанта, якому віддається більша перевага, дорівнює або становить від приблизно 0,05мг/мл до або приблизно до 5мг/мл, відповідно до варіанта, якому конкретно віддається ще більша перевага, дорівнює або становить від приблизно 0,1мг/мл до або приблизно до 2мг/мл, відповідно до варіанта, якому віддається найбільша перевага, вона становить або дорівнює приблизно 1мг/мл.

Термін "антиоксидант" означає сполуку, яка запобігає взаємодії кисню або вільних радикалів кисню з іншими речовинами. Антиоксиданти належать до числа наповнювачів, які традиційно додають до фармацевтичних систем для підвищення фізичної та хімічної стійкості. Антиоксиданти додають для зведення до мінімального рівня або уповільнення процесів окиснення, які відбуваються з деякими лікарськими засобами або наповнювачами у разі піддання їх дії кисню або у присутності вільних радикалів. Ці процеси можуть часто каталізуватись світлом, температурою, підвищенням концентрації водню, присутністю мікроелементів або пероксидів. Сульфіти, бісульфіти, тіосечовину, метіонін, солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA), бутильований гідрокситолуол (BHT) та бутильований гідроксіанізол (BHA) часто застосовують як антиоксиданти у лікарських засобах. Було встановлено, що натрій-EDTA підсилює активність антиоксидантів шляхом утворення хелатних комплексів з іонами металів, які, у протилежному разі, каталізували б реакцію окиснення. Антиоксидантом, якому віддається найбільша перевага, є метіонін.

Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, антиоксиданти і, зокрема, метіонін, є стабілізаторами, які присутні у стабілізованій рідкій композиції інтерферону, що застосовується для одержання гідрогелів за цим винаходом. За типовим варіантом, метіонін може застосовуватись із 100-800-кратним мольним надлишком (відносно інтерферону), відповідно до варіанта, якому віддається перевага, з 400-кратним мольним надлишком (приблизно 0,4мг/мл, якщо введена кількість інтерферону становить приблизно 150мкг/мл).

Метіонін може бути присутнім у формі вільної основи або у сольовій формі. Будь-який стереоізомер (тобто L, D або DL ізомер) метіоніну може застосовуватись за цим способом або у цій композиції за цим винаходом доти, доки метіонін присутній у формі вільної основи або у сольовій формі. Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, застосовують L-стереоізомер. У композиції за цим винаходом можуть також застосовуватись аналоги метіоніну. Термін "аналог метіоніну" озна-



чає похідну природного метіоніну. Аналоги метіоніну можуть також застосовуватись у композиції за цим винаходом у формі вільної основи або у сольовій формі.

Підвищення та/або підтримка стійкості у разі додання антиоксидантів (наприклад, метіоніну) відбувається залежним від концентрації чином. Тобто наслідком підвищення концентрації антиоксидантів є підвищення та/або підтримка стійкості композиції, що містить бета-інтерферон, за цим винаходом, у разі коли ця композиція, що містить бета-інтерферон, як правило, демонструє окиснення або утворення агрегатів/олігомерів за відсутності антиоксиданту. Визначення кількості антиоксиданту (наприклад, метіоніну), яке повинно застосовуватись у композиції за цим винаходом для зниження окиснення або утворення олігомерів/агрегатів, може легко здійснюватись без зайвого експериментування за допомогою способів, відомих, як правило, фахівцю у цій галузі.

Термін "бактеріостатик" означає сполуку або композиції, які додають до лікарської форми для відігравання ролі антибактеріального засобу. Прикладами бактеріостатиків є фенол, м-крезол, п-крезол, о-крезол, хлоркрезол, бензиловий спирт, алкілпарабен (метил, етил, пропіл, бутил тощо), хлорид бензалконію, хлорид бензетонію, дигідроацетат натрію та тимеросал. Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, бактеріостатичним засобом є бензиловий спирт.

Гідрогелеві композиції за цим винаходом можуть бути однодозовими або багатодозовими. Рідкі композиції інтерферону за цим винаходом, призначені для багатодозового застосування, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, містять бактеріостатик, наприклад, фенол, м-крезол, р-крезол, о-крезол, хлоркрезол, бензиловий спирт, алкілпарабен (метил, етил, пропіл, бутил і т.ін.), хлорид бензалконію, хлорид бензетонію, дигідроацетат натрію та тимеросал. Особливу перевагу віддають фенолу, бензиловому спирту та м-крезолу, більшу перевагу віддають бензиловому спирту. Бактеріостатичний засіб застосовують у кількості, яка забезпечить концентрацію, що є ефективною для підтримки згаданої композиції по суті вільною від бактерій (придатною для ін'єкцій) впродовж періоду здійснення багатодозових ін'єкцій, тривалість якого може дорівнювати або становити приблизно 12 год або 24 год, дорівнювати або становити приблизно 12 днів, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, дорівнювати або становити від приблизно 6 днів до або приблизно до 12 днів. Бактеріостатик відповідно до варіанта, якому віддається перевага, присутній у концентрації, яка становить від приблизно 0,1% (маса бактеріостатику/маса розчинника) до приблизно 2,0%, відповідно до варіанта, якому віддається більша перевага, від приблизно 0,2%, до приблизно 1,0%. У разі бензинового спирту, особлива перевага віддається концентрації 0,2% або 0,3%.

Застосування консерванта, наприклад, бензинового спирту, не обмежується, однак, багатодозовими композиціями, але він може додаватись і до однодозових композицій. Один із варіантів здій-

снення цього винаходу передбачає однодозові композиції, що містять бензиловий спирт.

Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, композиції за цим винаходом мають рН у межах від приблизно 3,0 до приблизно 5,0, відповідно до варіанта, якому віддається більша перевага, рН дорівнює або приблизно дорівнює 3,8-4,0. Буфером, якому віддається перевага, є ацетат, де протиіонами, яким віддається перевага, є іони натрію або калію. Буфери, які являють собою фізіологічний розчин, забуферений ацетатом, добре відомі у цій галузі. Концентрації буфера у загальному об'ємі розчину можуть дорівнювати або приблизно дорівнювати 5мМ, 9,5мМ, 10мМ, 50мМ, 100мМ, 150мМ, 200мМ, 250мМ та 500мМ. Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, концентрація буфера дорівнює або приблизно дорівнює 10мМ. Особлива перевага віддається концентрації буфера з іонами ацетату, яка дорівнює 50мМ, при рН 3,8.

"Циклодекстринами", передбаченими для застосування за цим винаходом, є гідроксипропілові, гідроксіетілові, глюкозилові, мальтозилові та мальтотріозилові похідні бета-циклодекстрину і відповідні похідні гамма-циклодекстрину. Гідроксіалкільні угруповання можуть містити одну або декілька гідроксильних груп, наприклад, гідроксипропіл (2-гідроксипропіл, 3-гідроксипропіл), дигідроксипропіл тощо. Глюкозилова, мальтозилова та мальтотріозилова похідні можуть містити один або декілька залишків цукру, наприклад, глюкозид або диглюкозил, мальтозил або димальтозил. Застосовуватись, можуть також різні суміші циклодекстринових похідних, наприклад, суміш мальтозилових та димальтозилових похідних. До числа специфічних циклодекстринових похідних для застосування за цим винаходом належать гідроксипропіл-бета-циклодекстрин (HPBCD) або HPBCD), гідроксіетил-бета-циклодекстрин (HEBCD), гідроксипропіл-гамма-циклодекстрин (HPGCD), гідроксіетил-гамма-циклодекстрин (HEGCD), дигідроксипропіл-бета-циклодекстрин (2HPBCD), глюкозил-бета-циклодекстрин (G<sub>1</sub>-бета-CD або G<sub>1</sub>BCD), диглюкозил-бета-циклодекстрин (2G G<sub>1</sub>-бета-CD або 2 G<sub>1</sub>BCD), мальтозил-бета-циклодекстрин (G<sub>2</sub>-бета-CD або G<sub>2</sub>BCD), мальтозил-гамма-циклодекстрин (G<sub>2</sub>-гамма-CD або G<sub>2</sub>GCD), мальтотріозил-бета-циклодекстрин (G<sub>3</sub>-бета-CD або G<sub>3</sub>BCD), мальтотріозил-гамма-циклодекстрин (G<sub>3</sub>-гамма-CD або G<sub>3</sub>GCD) та димальтозил-бета-циклодекстрин (2 G<sub>2</sub>-бета-CD або 2 G<sub>2</sub>BCD) та їх суміші, наприклад, мальтозил-бета-циклодекстрин/димальтозил-бета-циклодекстрин.

Гідроксипропіл-бета-циклодекстрин для застосування у композиціях за цим винаходом є комерційно доступним і являє собою циклодекстрин, якому віддається перевага за цим винаходом.

Діапазон концентрацій інтерферону у композиціях за цим винаходом становить від приблизно 1,0мкг/мл до приблизно 50мкг/мл, хоча функціональними є нижчі та вищі концентрації, які залежать від гаданого носія доставки або шляху введення, наприклад, розчинні композиції для трансмукозних гелів (наприклад, гелеві композиції, що містять інтерферон, для введення через рот або ніс) бу-

дуть відрізнитись. Концентрація інтерферону, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, дорівнює або становить приблизно 5,0мкг/мл, дорівнює або становить від приблизно 5,0мкг/мл до приблизно 2мг/мл, відповідно до варіанта, якому віддається більша перевага, дорівнює або становить від приблизно 10мкг/мл до приблизно 1мг/мл, відповідно до варіанта, якому віддається найбільша перевага, дорівнює або становить від приблизно 30мкг/мл до приблизно 100мкг/мл.

Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, композиції за цим винаходом зберігають щонайменше або приблизно 60%, відповідно до варіанта, якому віддається більша перевага, щонайменше або приблизно 70%, відповідно до варіанта, якому віддається найбільша перевага, щонайменше або становить 80% від активності інтерферону на час пакування впродовж періоду часу тривалістю 24міс.

Композиції пролонгованої дії за цим винаходом можна одержати за допомогою способу, який включає додання обчисленої кількості розчину інтерферону до гомогенного розчину полксамеру. Згаданий розчин інтерферону, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, являє собою стабілізований розчин інтерферону, наприклад, розчин інтерферону, що містить наповнювачі, наприклад, стабілізатори, такі як L-метіонін, поверхнево-активні речовини, такі як полксамери, наприклад, Poloxamer 188, або їх комбінацію.

Відповідно до варіанта здійснення цього винаходу, композиції за цим винаходом можуть додатково бути піддані стадії фільтрації за стерильних умов, наприклад, стерилізаційній фільтрації, із застосуванням 0,22мкм мембрани, яка здійснюється при температурі, при якій в'язкість полксамерного гідрогелю утримується на низькому рівні, наприклад, при температурі 4°C.

З метою поліпшення придатності композицій за цим винаходом для здійснення ін'єкцій за допомогою шприца при кімнатній температурі, можуть додаватись наповнювачі, які модифікують температуру фазового переходу полксамерного гідрогелю від розчину до гелю, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, до буферного розчину перед одержанням рідкого розчину гідрогелю, тобто перед доданням полксамеру. Прикладами наповнювачів, які модифікують температуру фазового переходу полксамерного гідрогелю від розчину до гелю, є поліетиленгліколь, гліцерин, наприклад, Glycerol 30°, цукри, наприклад, трегалоза і циклодекстрини, наприклад, гідроксипропіл- $\beta$ -циклодекстрин.

За одним із варіантів здійснення цього винаходу, гідрогелева композиція, яка може вводиться до спеціальних пристроїв, наприклад, автоін'єкторів або попередньо заповнених шприців, і може утворювати "in situ" гель після підшкірної ін'єкції, має в'язкість при температурі 4°C у діапазоні між в'язкістю води і 200мПа·с, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, у діапазоні 100-150мПа·с.

Після цього одержаний розчин вміщують у флакони, ампули, капсули або попередньо заповнені шприци. Зміни цього процесу будуть зрозумі-

лими пересічному фахівцю у цій галузі. Наприклад, порядок, у якому додаються компоненти, можливість застосування додаткових домішок, температура і рН, при яких одержують композицію, усе це є тими факторами, які можуть оптимізуватись для застосовуваних концентрацій та засобів введення.

Консервовані композиції можуть пропонуватись хворим у вигляді прозорих розчинів, оскільки зберігання, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, здійснюють при температурі фазового переходу гідрогелю від розчину до гелю.

Інтерферон у гідрогелевих композиціях, опис яких наведено, може вводиться хворому, у відповідності до цього винаходу, різноманітними способами доставки, у тому числі шляхом підшкірної ін'єкції, через слизову оболонку, за допомогою імплантата або інших засобів, які добре відомі у цій галузі і застосовуються досвідченим фахівцем.

Термін "флакон", у широкому значенні, означає резервуар, придатний для утримання композиції інтерферону пролонгованої дії за цим винаходом у твердій або рідкій формі у розфасованому стерильному стані. Прикладами флакона у значенні, яке застосовується у цьому описі, є ампули, капсули, блістерні упаковки або інший подібний резервуар, придатний для доставки інтерферону хворому за допомогою шприца або спрею для застосування на слизовій оболонці.

Композиції за цим винаходом можуть також випускатись на ринок у вигляді попередньо заповнених шприців.

Композиції за цим винаходом можуть вводиться за допомогою визнаних ін'єкційних пристроїв. Прикладами, які включають ці однофлаконні системи, є автоін'єктори або шприци-ін'єктори для доставки розчину, наприклад, Rebiject®.

Голки для ін'єкційних пристроїв вибирають таким чином, щоб вони відповідали густині гідрогелю за цим винаходом. Наприклад, гідрогель за цим винаходом може впорскуватись за допомогою ін'єкційних пристроїв, які мають голки різних розмірів, наприклад, 18/23 (внутрішній діаметр є еквівалентним голці №18, мінімальний зовнішній діаметр є еквівалентним голці №23) або 21/26 (внутрішній діаметр є еквівалентним голці №21, мінімальний зовнішній діаметр є еквівалентним голці №26).

Відповідно до варіанта, якому віддається перевага, композиції за цим винаходом можуть вводиться за допомогою визнаних пристроїв для гідрогелів. Ін'єкція гідрогелів за цим винаходом може здійснюватись, наприклад, за методикою ін'єкцій Depot One Needle (фірма Imprint Pharmaceuticals).

Термін "лікування" у контексті цього винаходу означає будь-який сприятливий вплив на розвиток захворювання, у тому числі ослаблення, скорочення, зниження або зменшення розвитку патологічного процесу після початку захворювання.

Фармацевтичні композиції за цим винаходом, що містять інтерферон або ізоформу, мутеїн, глібридний білок, функціональну похідну, активну фракцію або сіль, є придатними для діагностування, запобігання і лікування (місцевого або системного) клінічних симптомів, які реагують на лікування цим поліпептидом. До числа таких клінічних

симптомів належать, наприклад, розлади або захворювання центральної нервової системи (ЦНС), головного мозку та/або спинного мозку, у тому числі розсіяний склероз; автоімунні захворювання, у тому числі ревматоїдний артрит, псоріаз, хвороба Крона; і раки, у тому числі рак молочної залози, рак передміхурової залози, рак сечового міхура, рак нирок і рак кишечника.

Усі матеріали, на які посилаються у цьому описі, у тому числі журнальні статті або реферати, опубліковані або неопубліковані заявки на патенти США або зарубіжних країн, видані патенти США або зарубіжних країн чи будь-які інші матеріали, включені до цього опису у повному обсязі шляхом посилання; у тому числі усі дані, таблиці, фігури і текст, присутні у матеріалах, на які посилаються. На додаток до цього, матеріал, на який посилаються у матеріалі, на який посилаються у цьому описі, також включено до цього опису у повному обсязі шляхом посилання.

Посилання на стадії відомих способів, стадії традиційних способів, відомі способи або традиційні способи у жодному разі не є визнанням того, що будь-який аспект, опис або варіант здійснення цього винаходу розкривається, описується або пропонується у відповідній галузі.

Наведений вище опис конкретних варіантів здійснення з такою повнотою розкриває загальну природу цього винаходу, що інші можуть, застосовуючи фахові знання у межах цієї галузі (у тому числі вміст матеріалів, на які посилаються у цьому описі), легко модифікувати та/або адаптувати для різних варіантів застосування такі конкретні варіанти здійснення, без зайвого експериментування, без відходження від загальної концепції цього винаходу. Таким чином, припускається, що такі адаптації та модифікації будуть знаходитись у межах значення діапазону еквівалентів розкритих варіантів здійснення, виходячи із вказівок та настанов, наведених у цьому описі. Слід розуміти, що фразеологія або термінологія, наведена у цьому описі, призначена для опису, а не для обмеження, завдяки чому термінологія або фразеологія наведеного опису повинна трактуватись досвідченим фахівцем у світлі вказівок і настанов, наведених у цьому описі, у поєднанні зі знаннями пересічного фахівця у цій галузі.

За одним із варіантів здійснення, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка являє собою полксамерний гідрогель, що містить бета-інтерферон.

За додатковим варіантом здійснення, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка являє собою полксамерний гідрогель, що містить рекомбінантний бета-інтерферон, наприклад, рекомбінантний бета-інтерферон 1a.

Відповідно до іншого варіанта здійснення, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію за цим винаходом, яка додатково містить буфер та антиоксидант.

Відповідно до іншого варіанта здійснення, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію за цим винаходом, яка додатково містить буфер та поверхнево-активну речовину.

Відповідно до іншого варіанта здійснення, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію за цим винаходом, яка додатково містить модифікатор температури фазового переходу від розчину до гелю.

За додатковим варіантом здійснення, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію за цим винаходом, яка додатково містить модифікатор температури фазового переходу від розчину до гелю, вибраний з-посеред грегалоїди і циклодекстрину.

За одним із варіантів здійснення, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка являє собою гідрогель Poloxamer 407.

За додатковим варіантом здійснення, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка являє собою гідрогель Poloxamer 407, що містить від приблизно 20% (мас.) до 25% (мас.) Poloxamer 407.

За одним із варіантів здійснення, якому віддається перевага, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка містить рекомбінантний бета-інтерферон, наприклад, рекомбінантний бета-інтерферон 1a, ацетатний буфер та L-метіонін, як антиоксидант.

Відповідно до іншого варіанта здійснення, якому віддається перевага, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка являє собою гідрогель Poloxamer 407, що містить рекомбінантний бета-інтерферон, наприклад, рекомбінантний бета-інтерферон 1a, ацетатний буфер, L-метіонін, як антиоксидант та Poloxamer 188 як поверхнево-активну речовину.

Відповідно до іншого варіанта здійснення, якому віддається перевага, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка являє собою гідрогель Poloxamer 407, що містить рекомбінантний бета-інтерферон, наприклад, рекомбінантний бета-інтерферон 1a, ацетатний буфер, L-метіонін, як антиоксидант, Poloxamer 188 як поверхнево-активну речовину і трегалозу як модифікатор температури фазового переходу від розчину до гелю.

Відповідно до іншого варіанта здійснення, якому віддається перевага, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка являє собою гідрогель Poloxamer 407, що містить рекомбінантний бета-інтерферон, наприклад, рекомбінантний бета-інтерферон 1a, ацетатний буфер, L-метіонін, як антиоксидант і циклодекстрин як модифікатор температури фазового переходу від розчину до гелю, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, гідроксипропіл-бета-циклодекстрин.

Відповідно до іншого варіанта здійснення, якому віддається перевага, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, вибрану з наведеної нижче групи:

|                 |               |
|-----------------|---------------|
| Poloxamer 407   | 25% (мас.)    |
| Ацетатний буфер |               |
| 50mM/pH 3,8     | 74,7% (мас.)  |
| г-н-бета-IFN 1a | 0,012% (мас.) |
| L-метіонін      | 0,03% (мас.)  |
| Poloxamer 188   | 0,24% (мас.); |

|                 |               |
|-----------------|---------------|
| Poloxamer 407   | 25% (мас.)    |
| Ацетатний буфер | 72,04% (мас.) |

|                                  |               |
|----------------------------------|---------------|
| 50mM/pH 3,8                      |               |
| г-н-бета-IFN 1a                  | 0,012% (мас.) |
| L-метіонін                       | 0,03% (мас.)  |
| Poloxamer 188                    | 0,24% (мас.)  |
| Трегалоза                        | 2,6% (мас.);  |
| Poloxamer 407                    | 20% (мас.)    |
| Ацетатний буфер                  |               |
| 50mM/pH 3,8                      | 77,34% (мас.) |
| г-н-бета-IFN 1a                  | 0,015% (мас.) |
| L-метіонін                       | 0,04% (мас.)  |
| Гідроксипропіл-β-циклодекстрин   | 2,6% (мас.);  |
| Poloxamer 407                    | 25% (мас.)    |
| Ацетатний буфер                  |               |
| 50mM/pH 3,8                      | 72,04% (мас.) |
| г-н-бета-IFN 1a                  | 0,012% (мас.) |
| L-метіонін                       | 0,03% (мас.)  |
| Poloxamer 188                    | 0,24% (мас.)  |
| Glycerol 30° Bé                  | 2,6% (мас.);  |
| та                               |               |
| Poloxamer 407                    | 25% (мас.)    |
| Ацетатний буфер 50mM/pH 3,8      | 72,04% (мас.) |
| г-н-бета-IFN 1a                  | 0,012% (мас.) |
| L-метіонін                       | 0,03% (мас.)  |
| Poloxamer 188                    | 0,24% (мас.)  |
| Поліетиленгліколь (Lutrol® E400) | 2,6% (мас.)   |

Відповідно до іншого варіанта здійснення, цей винахід пропонує спосіб одержання гідрогелевої фармацевтичної композиції, що містить інтерферон, за цим винаходом, який включає додання розрахованої кількості полксамеру до забуференого розчину при температурі, при якій одержують гомогенний розчин полімеру, з подальшим доданням інтерферону або його ізоформи, мутеїну, гібридного білка, функціональної похідної або активної фракції.

За додатковим варіантом здійснення, цей винахід пропонує спосіб одержання гідрогелевої фармацевтичної композиції, що містить інтерферон, за цим винаходом, причому згаданий буферний розчин містить модифікатор температури фазового переходу від розчину до гелю, вибраний з-посеред трегалози і циклодекстрину, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, гідроксипропіл-β-циклодекстрин.

За іншим додатковим варіантом здійснення, цей винахід пропонує спосіб одержання гідрогелевої фармацевтичної композиції, що містить інтерферон, за цим винаходом, причому згаданий інтерферон додають із розчину, що містить стабілізатори, відповідно до варіанта, якому віддається перевага, вибраний з-посеред L-метіоніну і Poloxamer 188, та їх комбінації.

За додатковим варіантом здійснення, цей винахід пропонує застосування гідрогелю, що містить бета-інтерферон за цим винаходом, для виготовлення фармацевтичної композиції для лікування розсіяного склерозу.

За додатковим варіантом здійснення, цей винахід пропонує спосіб лікування розсіяного склерозу, що включає введення гідрогелю, що містить

бета-інтерферон за цим винаходом, хворому, який цього потребує.

Винахід далі буде описуватись за допомогою наведених нижче Прикладів, які у жодному разі не повинні розглядатись як такі, що якимось чином обмежують цей винахід. У Прикладах роблять посилання на Фігури, опис яких наведено нижче.

На Фіг.1 представлений відсоток г-hIFNβ 1a, що вивільнюється з полксамерного гідрогелю (1), що містить г-hIFNβ 1a, у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS) при pH 7,4 і температурі 37°C, визначений за допомогою високоєфективної рідинної гель-хроматографії (SE-HPLC)/флуоресцентного детектора (ромби) та твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) (заштриховані квадрати) як функція часу після ін'єкції гідрогелю у PBS (Приклад 1).

На Фіг.2 представлена антивірусна активність г-hIFNβ 1a, вивільненого через 2год із полксамерного гідрогелю (1), що містить г-hIFNβ 1a, (незаштриховані ромби), порівняно з нерозбавленим розчином г-hIFNβ 1a (незаштриховані квадрати) та нерозбавленим розчином г-hIFNβ 1a, змішаним із полксамерним гелем без г-hIFNβ 1a, (Плацебо) (заштриховані трикутники). Антивірусна активність виражена як відсоток виживаності клітин (клітини WISH) після інфікування VSV (вірус везикулярного стоматиту) як функція концентрації г-hIFNβ 1a (Приклад 2).

На Фіг.3 представлена часова зміна концентрації г-hIFNβ 1a у крові макак-крабодів, які попередньо у експериментах не використовувались, після одноразової підшкірної ін'єкції (3,6мкг/кг) полксамерного гідрогелю (1), що містить г-hIFNβ 1a, (заштриховані квадрати), одноразової ін'єкції (3,6мкг/кг) нерозбавленого розчину г-hIFNβ 1a (Контроль 1: незаштрихований трикутник) або трьох ін'єкцій впродовж тижня з 48год інтервалами (t=0, 48год та 96год) 1,223мкг/кг кожного з вищезгаданих препаратів (Контроль 3: незаштриховані ромби) (Приклад 3).

На Фіг.4 представлена часова зміна концентрації г-hIFNβ 1a у крові макак-крабодів, які попередньо у експериментах не використовувались, після одноразової підшкірної ін'єкції (3,6мкг/кг) GMS ліпогелю, що містить г-hIFNβ 1a, (Контроль 2: крапки) або трьох ін'єкцій впродовж тижня з 48год інтервалами (t=0, 48год та 96год) 1,223мкг/кг кожного з вищезгаданих препаратів (Контроль 3: незаштриховані ромби) (Приклад 3).

На Фіг.5 представлені профілі в'язкості гідрогелевої (Lutrol) композиції (1) - крапки - порівняно з гідрогелевою (Lutrol) композицією (2), що містить 2,6% (мас.) трегалози, - заштриховані квадрати - та гідрогелевою (Lutrol) композицією (3), що містить 2,6% (мас.) гідроксипропіл-β-циклодекстрину, - заштриховані трикутники.

На Фіг.6 представлено відсоток г-hIFNβ 1a, що вивільнюється з полксамерного гідрогелю (3), що містить г-hIFNβ 1a, (Poloxamer 407 - 20% (мас.); ацетатний буфер 50mM/pH 3,8 - 77,34% (мас), г-hIFNβ 1a - 0,015% (мас), L-метіонін - 0,04% (мас.) та гідроксипропіл-β-циклодекстрин - 2,6% (мас)) у забуференому фосфатом фізіологічному розчині

(PBS) при pH 7,4 і температурі 37°C, визначений за допомогою високоефективної рідинної гель-хроматографії (SE-HPLC)/флуоресцентного детектора.

#### Приклади

Наведені скорочення мають, відповідно, відношення до наведених нижче визначень: см (сантиметр), сП (сантипуази), Да (дальтон), г (грам), мкг (мікрограм), хв (хвилина), мг (міліграм), мл (мілілітр), мм (міліметр), мМ (мілімолярний), мПа·с (міліпаскаль-секунда), об/хв (обертів/хвилину), нм (нанометр), CHO (яєчник китайського хом'ячка), IFN (інтерферон), МО (Міжнародні Одиниці), i.v. (внутрішньовенний), ЕМЕМ (мінімальне підтримувальне середовище Ігла із солями Ерла), FBS (сироватка зародка великої рогатої худоби), GMS (гліцерилмоностеарат), МТТ (N-2-гідроксипіпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота), MS (розсіяний склероз), MW (молекулярна маса), PBS (забуферений фосфатом фізіологічний розчин), PES (поліефірсульфат), PP (поліпропілен), PVDF (полівініліденфторид), г-IFN бета (рекомбінантний бета-інтерферон), г-hIFNβ 1a (рекомбінантний бета-інтерферон 1a, який продукується у клітинах CHO), RIA (радіоімунаналіз), s.c. (підшкірно), TIW (тричі на тиждень), МО (Міжнародна Одиниця), VSV (вірус везикулярного стоматиту).

Синтез поллоксамерів описано у Шмолка (Schmolka), 1977, Journal of the American Oil Chemist's Society 54, 110-116 і вони є комерційно доступними.

Приклад 1: Поллоксамерний гідрогель, що містить 407-г-hIFNβ 1a (1)

#### 1. Загальна методика одержання

У поліпропіленовій хімічній склянці (низька адсорбція білка), розміщеній на льодяній бані, зважену кількість Lutrol® F127 повільно додають до холодного (2-8°C) ацетатного буфера [50мМ, pH 3,8] із перемішуванням магнітною мішалкою [500-800об/хв] до повного розчинення полімеру.

У іншій склянці невелику кількість ацетатного буфера, який містить стабілізатори (наприклад, Lutrol® F68 та L-метіонін), додають до концентрованого нерозбавленого розчину г-бета-IFN (2мг/мл). Буфер одержаного складу додають до розчину полімеру зі зниженням інтенсивності перемішування (100-200об/хв) для зведення механічного навантаження на білок до мінімального рівня. Кінцевою композицією заповнюють поліпропіленові шприци при температурі 2-8°C.

Нерозбавлений розчин г-бета-IFN являє собою розчин ацетатного буфера, концентрований з 0,348мг/мл до 2мг/мл шляхом ультрафільтраційного центрифугування (Sartorius VivaSpin 20мл, смуга пропускання молекулярної маси 5000Да, 2500об/хв). Концентрований нерозбавлений розчин постійно піддають високоефективному протоковому рідинному гель-хроматографуванню для аналізу і визначення ступеня чистоти (відсоток мономеру), як описано у Прикладі 1 §5 нижче.

#### 2. г-h-бета-IFN

Було застосовано нерозбавлений розчин Rebif® (0,348мг/мл); стабілізований розчин г-h-бета-IFN-beta 1a одержали за загальною процеду-

рою (§1 вище) шляхом додавання комбінації стабілізаторів, наприклад, Lutrol® P68/L-метіонін.

#### 3. Наповнювачі

3.1. Lutrol F127® (Poloxamer. Pluronic. Synperonic)

Lutrol F127 (потрійний блокспівполімер поліоксіетилену, поліоксипропілену, поліоксіетилену), BASF являє собою блокспівполімер поліетиленоксиду і поліпропіленоксиду. Він включений до Довідника інертних інгредієнтів FDA (Управління із санітарного нагляду за харчовими продуктами і медикаментами (США)) (внутрішньовенні ін'єкції, інгаляції, офтальмологічні препарати, пероральні порошки, розчини, суспензії і сиропи, а також препарати місцевої дії). Він включений до непарентеральних лікарських засобів, ліцензованих у Великій Британії. Європейська Фармакопея 4, стор.1777; Фармакопея США 24, додаток до Американської фармакопеї 19, стор.2492-2493.

У Pluronic® F127, відсоток поліоксіетилену (гідрофільна складова) дорівнює 73% (поллоксамер Формули (I), де (a)=(c)=67 та (b)=98).

Нижче наведено типові властивості Pluronic® F127:

середня молекулярна маса: 12600г/моль;

температура плавлення: 56°C

фізична форма при температурі 20°C: тверда речовина;

в'язкість при температурі 77°C: 3100сП;

поверхневий натяг при температурі 25°C, 0,1% концентрація: 41дин/см;

змочування за Дрейвсом (3г гачок, 0,1% концентрація при температурі 25°C): >360с;

висота піни (мілі за Россом, 0,1% концентрація, водний розчин при температурі 50°C): 40мм;

температура помутніння у водному розчині, 1% концентрація: >100°C;

HLB (гідрофільно-ліпофільна рівновага) у воді при температурі 25°C: 18-23;

розчинність у воді при температурі 25°C: >10%.

#### 3.2. Льодяна оцтова кислота, фірма Sigma

3.3. Lutrol® F68 (Poloxamer, Pluronic, Synperonic)

Lutrol F68 (блокспівполімер поліоксіетилену, поліоксипропілену), BASF являє собою блокспівполімер поліетиленоксиду і поліпропіленоксиду. Він включений до Довідника інертних інгредієнтів FDA (Управління з санітарного нагляду за харчовими продуктами і медикаментами (США)) (внутрішньовенні ін'єкції, інгаляції, офтальмологічні препарати, пероральні порошки, розчини, суспензії і сиропи, а також препарати місцевої дії). Він включений до непарентеральних лікарських засобів, ліцензованих у Великій Британії. Європейська Фармакопея 4, стор.1777; Фармакопея США 24, додаток до Американської фармакопеї 19, стор.2492-2493.

У Pluronic® F68, відсоток поліоксіетилену (гідрофільна складова) дорівнює 80%; молекулярна маса поліоксипропілену (гідрофобна складова) дорівнює приблизно 1,967 Да (поллоксамер Формули (I), де (a)=(c)=79 та (b)=28).

Нижче наведено типові властивості Pluronic® F68:

середня молекулярна маса: 8400;  
точка плавлення/плинності: 52°C;  
фізична форма при температурі 20°C: тверда речовина;

в'язкість (за Брукфілдом): 1000сП [рідини при температурі 25°C, пасти при температурі 60°C і тверді речовини при температурі 77°C];

поверхневий натяг (дин/см) при температурі 25°C:

0,1% концентрація: 50,3;

0,01% концентрація: 51,2;

0,001% концентрація: 53,6;

міжфазний натяг (дин/см) при температурі 25°C порівняно з вазеліновим маслом:

0,1% концентрація: 19,8;

0,01% концентрація: 24,0;

0,001% концентрація: 26,0;

змочування за Дрейвсом (с) при температурі 25°C:

1,0% концентрація: >360;

0,1% концентрація: >360;

висота піни:

мілі за Россом, 0,1% концентрація, мм при температурі 50°C: 35;

мілі за Россом, 0,1% концентрація, мм при температурі 26°C: 40;

динаміка, 0,1% концентрація, мм при 400мл/хв: >600;

температура помутніння у водному розчині, °C:

1% концентрація: >360;

10% концентрація: >360;

HLB (гідрофільно-ліпофільна рівновага): 29.

3.4. L-метіонін, фірма Sigma

L-метіонін (L-Met) включено до складу композиції на рівні 0,03% для обмеження окиснення і, тим самим, стійкості розчину бета-IFN.

4. Гідрогелева композиція (1)

Одержали гідрогель (1), що містить 120мкг/мл г-н-бета-IFN 1a, наведеного нижче складу:

Lutrol® F127 25,0% (мас);

Ацетатний буфер [50мМ/рН 3,8] 74,7% (мас);

г-н-бета-IFN 1a 0,012% (мас);

L-метіонін 0,03% (мас);

Lutrol® F-68 0,24% (мас).

Гідрогель (1) виготовили за загальною методикою із Прикладу 1, §1, де було застосовано 25г розчину Lutrol® F127 та 3мг г-н-бета-IFN 1a.

5. Фізико-хімічні характеристики

- В'язкість

Динамічні дослідження в'язкості здійснювали для визначення відповідних характеристик гідрогелю і для підтримки методики відповідної придатності для ін'єкцій; застосовували ротаційний віскозиметр ViscoStar L Fungilab з одержанням безпосередніх показань в'язкості у мПа·с (сП). Одержану партію гідрогелю (1), вага якої становила 50г, вносили до поліпропіленового флакона, який під час проведення аналізу в'язкості витримували на льодяній бані (T=5°C±2°C). Повідомлені значення в'язкості знаходились у діапазоні 100-140мПа·с (вал №2, частота обертання вала - 100об/хв, час встановлення рівноваги - 3хв).

- Вивільнення білка

Для імітації фізіологічних підшкірних умов, вивільнення бета-IFN із гідрогелю (1) досліджували у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS). Дослідження вивільнення лікарського засобу здійснювали шляхом внесення 1г композиції (1) (яку одержали з попередньо заповненого шприца) до 4мл PBS (рН 7,4 при температурі 37°C±2°C) (частота обертання вібраційної бані = 100об/хв). Зразки збирали через: 5хв, 15хв, 30хв, 1год та 2год.

Кожен зразок аналізували засобами SE-HPLC із флуоресцентним детектором (Trp fluorescence), і дані підтверджували за допомогою методу ELISA (набір фірми Toya). Докладний опис цих методів наведено нижче.

Кількість бета-IFN, виявлену у середовищі, виражали як відсоток від загального вивільненого білка. Профілі вивільнення, одержані за допомогою двох згаданих методів, показують схему двофазного вивільнення зі швидкою початковою фазою і подальшим повільнішим вивільненням лікарського засобу (Fig. 1).

Методика екстрагування і SE-HPLC аналіз

Були здійснені випробування для оптимізації методу екстрагування бета-IFN, який було включено у гідрогелеві системи, та для визначення ступеня відновлення лікарських засобів.

Методика екстрагування, на основі суміші води/органічного розчинника, до складу якої входила вода та ацетон, включала наведені нижче операції:

- 500мг гідрогелевої композиції (1) розчиняли у 1,0мл ацетону у центригальній пробірці і обробляли ультразвуком впродовж 2хв на ультразвуковій бані при температурі нижче 10°C;

- додавали воду з одержанням кінцевого об'єму 3мл;

- одержаний зразок центрифугували (5хв при 10000об/хв при температурі +4°C);

- рідку фазу збирали і аналізували.

Після завершення екстрагування, зразки аналізували засобами SE-HPLC із наведеними нижче робочими умовами:

- HPLC колонка TSK G2000 SW<sub>XL</sub> cod. 08540 (7,8мм (внутрішній діаметр) ×30см, 5мк)

- об'єм введення 100мкл;

- температура колонки: кімнатна температура;

- температура зразку: кімнатна температура;

- об'ємна швидкість потоку: 0,5мл/хв (ізократична);

- рухома фаза: 70% (в об'ємному відношенні) дистильованої води (фірма MILLIQ-Mflipore) - 30% (в об'ємному відношенні) ацетонітрилу - 0,2% (в об'ємному відношенні) TFA (трифтороцтова кислота)

- тривалість роботи: 27хв;

- час встановлення рівноважного стану: 3хв;

- довжина хвиль флуоресцентного детектора: збудження 280нм, емісія 348нм.

ELISA (твердофазний імуноферментний аналіз)

Твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA) (набір фірми Toya) застосовували для визначення концентрації бета-IFN, вивільненого гідрогелем (1), що містить IFN. При проведенні

цього аналізу застосовують одностадійний метод подвійних антитіл і здійснюють його із застосуванням 96-лункових мікропланшетів, сенсibilізованих поліклональним антитілом проти г- $\beta$ -IFN. Зв'язане з ферментом моноклональне антитіло, специфічне до г- $\beta$ -IFN, вносять у лунки, після чого до них за допомогою піпетки додають стандарти і зразки; будь-який присутній г- $\beta$ -IFN зв'язується іммобілізованим антитілом. Після промивання для видалення будь-якого незв'язаного антитіла і ферменту, у лунки вносять субстратний розчин, і забарвлення проявляється пропорційно до кількості г- $\beta$ -IFN, зв'язаної на початковій стадії. Проявлення забарвлення припиняють, і визначають його інтенсивність.

Аналіз здійснювали за вкладкою, з тією різницею, що зразок інкубували впродовж ночі при температурі +4°C.

Сенсibilізований антитілом мікропланшет промивали 400мкл розчину для промивання і сушили на папері. Після цього до лунк, попередньо заповнених 100мкл зразка, який одержали під час проведення експериментів із вивільненням лікарського засобу з гідрогелю (1) або відповідно до кривої визначення еталонної концентрації (нерозбавленого) розчину г- $\beta$ -IFN (0-200МОд/мл), додавали 50мкл/лунку міченого ферментом антитіла. Мікропланшет накривали і ретельно збовтували з інкубуванням впродовж 120хв при кімнатній температурі. Після закінчення інкубації зразки видаляли, мікропланшет тричі промивали і сушили на папері. До кожної лунки вносили 100мкл розчину для проявлення забарвлення; після 30хв інкубування додавали 100мкл розчину для припинення реакції і визначали оптичну густину при подвійній довжині хвиль 450нм і 650нм (Фіг. 1).

- Попереднє визначення стійкості

Стійкість гідрогелю (1), що містив IFN, перевіряли у  $t=0$ год, 24год,

1 тиждень, 1 і 2 місяці при температурі 4°C. Було проведено такий аналіз: вміст лікарського засобу (контроль за зовнішнім виглядом) і в'язкість (вал №2, 100об/хв,  $T=6^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Гідрогелева композиція (1) зберігала стійкість впродовж щонайменше 2 місяців.

Приклад 2: Біологічна активність гідрогелю Poloxamer 407 (1), що містить г- $\beta$ -IFN 1a

Біологічну активність гідрогелю (1) визначають через антивірусну активність г- $\beta$ -IFN 1a, вивільненого з гідрогелевої композиції (1), у порівнянні з антивірусною активністю, яку демонструє нерозбавлений бета-IFN.

Вірус везикулярного стоматиту (VSV), вірус, який спричинює ящури великої рогатої худоби, було обрано для застосування у цьому дослідженні завдяки його чутливості до інтерферонів.

Застосований антивірусний аналіз базується на індукованому бета-IFN пригніченні цитопатичної дії вірусів на лінії клітин WISH, висіяні ( $4\times 10^4$  клітин/лунку (50мкл/лунку)) на EMEM, що містить 5% FBS, на 96-лунковому титраційному мікропланшеті, лунки якого були попередньо заповнені серійним розведенням (розведення 1:1,5) зразка гідрогелю, що містить г- $\beta$ -IFN або еталонного (нерозбавленого) г- $\beta$ -IFN 1a. Клітини інкубу-

вали впродовж 18-22год при температурі 37°C і 5% CO<sub>2</sub> перед доданням (50мкл/лунку) суспензії вірусу везикулярного стоматиту (VSV) у EMEM, що містить 2,5% FBS. До лунк, що містили контрольні клітини, додавали лише живильне середовище без суспензії вірусу, у той час як до контрольних вірусних лунк вносили лише суспензію VSV. Інфіковані клітини додатково інкубували впродовж 20-24год при температурі 37°C та 5% CO<sub>2</sub>, після чого забарвлювали 5% розчином МТТ впродовж 2год. Після закінчення експерименту надосадову рідину видаляли, а солі формагану розчиняли шляхом додання 96% етанолу (200мкл/лунку). Планшети зчитували при 595нм за допомогою спектрофотометричного планшет-рідера. Результати були виражені як відсоток пригнічення цитопатичної дії порівняно з контрольними клітинами.

In vitro біологічну активність г- $\beta$ -IFN 1a, який було вивільнено з гідрогелевої композиції (1) через 2 год, визначали за допомогою аналізу на клітинах WISH, який було описано вище, у двох різних серіях експерименту. Концентрація г- $\beta$ -IFN 1a становила 37,7мкг/мл. Будь-яку можливу перешкоду з боку гідрогелю Lutrol без г- $\beta$ -IFN 1a (плацебо), який застосовували для одержання гідрогелю, також перевіряли шляхом додання до плацебо нерозбавленого г- $\beta$ -IFN 1a.

г- $\beta$ -IFN 1a, вивільнений через 2год з обох партій, продемонстрував, що біологічна активність була збережена і вивільнення було повним, порівняно з нерозбавленим г- $\beta$ -IFN 1a, який додавали до плацебо (Фіг.2). Видається, таким чином, що поллоксамерні гідрогелі, у разі вивільнення лікарського засобу, є здатними до збереження повної біологічної активності г- $\beta$ -IFN 1a.

Приклад 3. Фармакокінетичний профіль гідрогелю Poloxamer 407, що містить г- $\beta$ -IFN 1a (1)

Для перевірки характеристик пролонгованої дії поллоксамерного гідрогелю, що містить IFN, за цим винаходом, фармакокінетичний профіль згаданого гідрогелю порівнюють із профілем буферних композицій та інших гелевих композицій.

Фармакокінетичний профіль гідрогелевої композиції (1), що містить IFN, досліджували на макаках-крабоїдах, які раніш в експериментах на використання порівнювались (2 самці і 2 самиці у кожній групі), і порівнювали з фармакокінетичним профілем ліпогелевої композиції, що містить бета-IFN.

Зразки надавалися у попередньо заповнених шприцах, споряджених голкою № 19. Схема експерименту передбачала (Таблиця IV нижче)

порівняння одноразової на тиждень підшкірної ін'єкції гідрогелевої композиції (1), що містить бета-IFN, (120мкг/мл) з одноразовою на тиждень ін'єкцією рідкої забуференої (рН 3,8) композиції нерозбавленого бета-IFN (Контроль 1) або з одноразовою на тиждень підшкірною ін'єкцією ліпогелю, що містить бета-IFN (120мкг/мл) (Контроль 2).

Була використана інша контрольна група, у якій мавпам тричі на тиждень (TIW), з 48год інтервалами ( $t=0$ год, 48год і 96год), робили підшкірні ін'єкції для імітації сучасної схеми приймання Rebif®, яка застосовується з метою лікування розсіяного склерозу (Контроль 3).

Розчин IFN для Контролю 1 (Група 2) являв собою розчин IFN (40мкг/мл) у 50мМ ацетатному буфері.

Для Контролю 2 (Група 3) застосовували наведену нижче ліпогелеву композицію, що містила бета-IFN:

|                                          |               |
|------------------------------------------|---------------|
| гліцерину моностеарат (GMS)              | 22,37% (мас); |
| (RYLO MG20 PHARMA, фірма Danisco Cultor) |               |
| PEG 400                                  | 63,09% (мас); |
| (Lutrol E400, BASF)                      |               |
| оцтова кислота                           | 4,03% (мас);  |
| ацетатний буфер [50мМ/рН 3,8]            | 9,94% (мас);  |
| г-н-бета-IFN 1a                          | 0,01% (мас);  |
| L-метіонін (фірма Sigma)                 | 0,03% (мас);  |
| Гідроксипропіл-β-циклодекстрин           | 0,03% (мас).  |
| (Cavasol W7HP, Wacker)                   |               |

Розчин IFN для Контролю 3 (Група 4) являв собою розчин IFN (16мкг/мл) у 50мМ ацетатному буфері.

Схема відбирання проб крові включала відбирання проб перед введенням дози і охоплювала 14 днів після ін'єкцій (336год) для Групи 1 і Групи 3 та 2 дні після ін'єкцій для Групи 2. Схема відбирання проб крові для Групи 4 передбачала визначення фармакокінетичного профілю після першої та останньої ін'єкції г-н-бета-IFN 1a і визначення повного профілю для неоптерину.

Кількісне визначення г-н-бета-IFN 1a здійснювали за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA, фірма Fujirebio), як описувалось вище. Кількісне визначення рівнів неоптерину здійснювали за допомогою радіоімуноаналізу (RIA, фірма ICN Biomedical).

Таблиця IV

| Група | Тип композиції                             | Доза (мкг/кг)      | Примітки                                            |
|-------|--------------------------------------------|--------------------|-----------------------------------------------------|
| 1     | Гідрогель, що містить бета-IFN (I)         | 3,67, підшкірно    | Полоксамерний гідрогель, ін'єкція у t=0             |
| 2     | Бета-IFN (Контроль 1)                      | 3,67, підшкірно    | Нерозбавлений розчин, ін'єкція у t=0                |
| 3     | Ліпогель, що містить бета-IFN (Контроль 2) | 3,67, підшкірно    | Гліцеринмоностеаратний ліпогель у t=0               |
| 4     | Нерозбавлений бета-IFN (Контроль 3)        | 3×1,223, підшкірно | Ін'єкції нерозбавленого розчину у t=0, 48год, 96год |

#### Вивільнення β-IFN

Результати показують, що після одноразової підшкірної ін'єкції відбувається пролонговане вивільнення г-н-бета-IFN 1a полоксамеровим гідроелем (1) (Група 1) з підтримкою рівнів у плазмі вище за 5МОд/мл впродовж приблизно тижня а, можливо, і довше (Фіг.3).

Біодоступність білків є значно вищою (Таблиця V нижче), порівняно з забуференою рідкою композицією (як при одноразовій підшкірній, так і при ін'єкції, що проводиться тричі на тиждень) та з ліпогелевою композицією, застосованими як контроль.

Вивільнення г-н-бета-IFN 1a у разі полоксамерового гідрогелю (1) демонструє реальний явно виражений пролонгований характер, порівняно із профілем вивільнення г-н-бета-IFN 1a, який одержують у разі застосування ліпогелю на основі GMS (Група 3), як показано на Фіг.3 і Фіг.4. Профіль вивільнення г-н-бета-IFN 1a з ліпогелю (Контроль 2) характеризується більш низьким "сплеском" і повільним пролонгованим стаціонарним режимом.

Ці результати показують, що ліпогелева композиція, використана як Контроль 2, не придатна для пролонгованого вивільнення г-н-бета-IFN 1a.

Таблиця V

| Фармакокінетичні параметри | Гідрогель, що містить бета-IFN (1) | Ліпогель, що містить бета-IFN (Контроль 2) | Бета-IFN (Контроль 1) | Бета-IFN (Контроль 3) День 1 | Бета-IFN (Контроль 3) День 5 |
|----------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|
| Tmax (год)                 | 8,0±0,0                            | 1,5±0,5                                    | 1,3±0,5               | 1,8±0,5                      | 1,4±0,5                      |
| Cmax (МОд/мл)              | 231,3±116,4                        | 24,0±12,1                                  | 96,3±53,4             | 31,3±0,9                     | 26,1±16,5                    |
| T½ (год)                   | 19,4±2,4                           | 45,1±77,6                                  | 9,5±3,8               | 6,1±2,8                      | 8,0±3,5                      |

#### Підвищення рівнів неоптерину у сироватці:

Результати фармакодинамічних (PD) досліджень підтверджують активність г-н-бета-IFN 1a, вивільненого з гелів. Рівні неоптерину зростали зі зсувом Tmax приблизно 24год у разі ін'єкції гідрогелю (1), порівняно з контролем (Контроль 1). Повторне введення (TIW) г-н-бета-IFN 1a дало нижчий, але триваліший фармакодинамічний профіль (Контроль 3). Ліпогелева композиція дала нижчий фармакодинамічний профіль (Контроль 2).

#### Одержання контрольної ліпогелевої композиції

У поліпропіленовій хімічній склянці (низька адсорбція білка) зважені кількості GMS і PEG змішують у ацетатному буфері [50мМ, рН 4-5] і витримують на водяній бані (40°C) декілька хвилин для одержання розплавленої і гомогенної ліпідної матриці.

У іншій склянці невелику кількість ацетатного буфера [50мМ, рН 4-5], який містить стабілізатори та наповнювачі (тобто циклодекстрин та L-



метіонін), додають до концентрованого нерозбавленого розчину г- $\beta$ -IFN 1a (2мг/мл). Буфер одержаного складу спочатку вміщують на водяну баню (40°C) приблизно на 1,5хв, після чого додають до ліпідної суміші.

Після цього одержану суміш залишають на водяній бані впродовж 5-10хв, після чого охолоджують до кімнатної температури з обережним перемішуванням за допомогою поліпропіленової палички.

Ці результати показують, що біологічна активність гідрогелю (1) є подібною до біологічної активності контрольних рідких композицій г- $\beta$ -IFN 1a і уможлиблює підтримання рівнів г- $\beta$ -IFN 1a у плазмі впродовж щонайменше одного тижня та поліпшену біологічну доступність.

Приклад 4: Стерилізаційна фільтрація гідрогелю Poloxamer 407 (1), що містить г- $\beta$ -IFN 1a

Однофазний розчин гідрогелю, що містить бета-IFN, може бути оброблений шляхом стерилізаційної фільтрації. Гідрогель (1), що містить інтерферон, одержали, як описано у Прикладі 1.

Дві різні мембрани (PVDF: полівініліденфторид і PES: поліетерсульфон) від фірми PALL Corporation (діаметр мембран 47мм, межа пропускання 0,2мм) використовувалися при температурі, при якій в'язкість розчину утримується на низькому рівні, наприклад, при температурі 4°C.

В'язкість визначають перед і після фільтрації за допомогою віскозиметра (ViscoStar L Fungilab): 50мл гідрогелю (1) у поліпропіленовій пробірці витримують на льодяній бані ( $T=5^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), вал №2, 100об/хв. Суттєвих реологічних змін унаслідок процесу фільтрації не спостерігалось.

Вміст мономеру IFN і кінетику вивільнення з гідрогелю (1), що містить IFN, перед і після фільтрації аналізували за допомогою SEC HPLC/флуоресцентного детектора (PBS (pH 7,4), 37°C, 100об/хв/1г гідрогелю (1) у 4мл PBS). Профілі вивільнення, одержані після фільтрації, є дуже подібними до профілей перед фільтрацією, отже процес фільтрації не модифікує властивості вивільнення IFN гідрогелем.

Приклад 5: Гідрогель Poloxamer 407 (2), що містить г- $\beta$ -IFN 1a

Гідрогель (2), що містить IFN, одержали, як описано у Прикладі 1, і трегалозу (фірма Sigma, 2,6% (мас.)) додають до буферного розчину перед одержанням полоксамерного гідрогелевого розчину, тобто перед доданням Poloxamer 407.

|                             |                |
|-----------------------------|----------------|
| Склад гідрогелю (2):        |                |
| Poloxamer 407               | 25% (мас.);    |
| ацетатний буфер 50мМ/рН 3,8 | 72,04% (мас.); |
| г- $\beta$ -IFN 1a          | 0,12% (мас.);  |
| L-метіонін                  | 0,03% (мас.);  |
| Poloxamer 188               | 0,24% (мас.);  |
| трегалоза                   | 2,6% (мас.).   |
| - В'язкість                 |                |

Динамічні дослідження в'язкості здійснювали для визначення характеристик гідрогелю (2) і для визначення його придатності для здійснення ін'єкцій. Використовували ротаційний віскозиметр ViscoStar L Fungilab з одержанням безпосередніх показань в'язкості у мПа·с (сП). Гідрогель (2) вно-

сили до поліпропіленового флакона, і здійснювали визначення в'язкості (SPL4, діапазон частоти обертання: 200-300об/хв) зі зміною температури і безперервним зчитуванням значень на дисплеї віскозиметра.

Результати показують іншу реологічну поведінку гідрогелю (2), порівняно з гідрогелем (1). Наслідком застосування трегалози (2,6% (мас.)) у гідрогелі (2) за цим винаходом є підвищення температури фазового переходу від рідини до гелю (Фіг. 5), що поліпшує умови виробництва і орудування матрицею.

Приклад 6: Гідрогель Poloxamer 407 (3), що містить г- $\beta$ -IFN 1a

Гідрогель (3), що містить IFN, одержували, як описано у Прикладі 1, однак, перед доданням Poloxamer 407, до буферного розчину з перемішуванням за допомогою магнітної мішалки (500-700об/хв) додавали гідроксипропіл- $\beta$ -циклодекстрин (Cavasol W7HP, фірма Wacker) (2,6% (мас.)). Після цього, з перемішуванням за допомогою магнітної мішалки, до буферного розчину/гідроксипропіл- $\beta$ -циклодекстрину додають Poloxamer 407.

|                             |                |
|-----------------------------|----------------|
| Склад гідрогелю (3):        |                |
| Poloxamer 407               | 20% (мас.);    |
| ацетатний буфер 50мМ/рН 3,8 | 77,34% (мас.); |
| г- $\beta$ -IFN 1a          | 0,015% (мас.); |
| L-метіонін                  | 0,04% (мас.);  |
| Cavasol W7HP                | 2,6% (мас.).   |
| - В'язкість                 |                |

Динамічні дослідження в'язкості здійснювали для визначення характеристик гідрогелю (3) і для визначення його придатності для здійснення ін'єкцій. Використовували ротаційний віскозиметр ViscoStar L Fungilab з одержанням безпосередніх показань в'язкості у мПа·с (сП). Гідрогель (3) вносили до поліпропіленового флакона, і здійснювали визначення в'язкості (SPL4, діапазон частоти обертання: 200-300об/хв) зі зміною температури і безперервним зчитуванням значень на дисплеї віскозиметра.

Результати, представлені на Фіг.5, показують іншу реологічну поведінку гідрогелю (3), порівняно з гідрогелем (1): температура фазового переходу від розчину до гелю у гідрогелю (3) підвищується приблизно з 11°C до 23°C.

Викликає подив те, що зсув температури фазового переходу від розчину до гелю у гідрогелю (3) зріс ще більше, порівняно з відповідною характеристикою гідрогелю (2), що містить трегалозу, незважаючи на більш низьку застосовану концентрацію матрицетвірного Poloxamer 407 (20% (мас.)) (Фіг.5), що значно поліпшує умови одержання і орудування матрицею.

- Вивільнення білка

Для імітації фізіологічних підшкірних умов, вивільнення бета-IFN з гідрогелю (3) досліджували у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS), як описувалось вище. Дослідження вивільнення лікарського засобу здійснювали шляхом внесення 1г композиції (3) (яку одержали з попередньо заповненого шприца) до 4мл PBS (pH 7,4 при температурі  $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) (частота обертання

вібраційної бані = 100об/хв). Зразки збирали через: 5хв, 15хв, 30хв, 1год та 2год.

Кожен зразок аналізували засобами SE-HPLC із флуоресцентним детектором (Trp fluorescence). Властивості пролонгованого вивільнення (профіль вивільнення бета-IFN) гідрогелем, що містить циклодекстрин, (3) є порівняними з відповідними характеристиками гідрогелю без модифікатора температури фазового переходу від розчину до гелю, тобто гідрогелю (1), незважаючи на зсув температури фазового переходу від розчину до гелю (Fig.6). Результати антивірусного аналізу, опис якого наведено у Прикладі 2, показують, що г-н-бета-IFN 1a, вивільнений через 2год гідрогелем (3), що містить циклодекстрин, зберігав біологічну активність і відновлення було повним, порівняно з нерозбавленим розчином г-н-бета-IFN 1a, який було додано до плацебо. Таким чином, видається, що гідргель (3), що містить циклодекстрин, є здатним до повного збереження біологічної активності г-н-бета-IFN 1a у разі вивільнення лікарського засобу.

Приклад 7: Гідргель Poloxamer 407 (4), що містить г-н-бета-IFN 1a

Гідргель (4), що містить IFN, одержали, як описано у Прикладі 1, і Glycerol 30°Bé (фірма Carlo Erba) (2,6% (мас.)) додавали до буферного розчину перед одержанням полксамерного гідргелевого розчину, тобто перед доданням Poloxamer 407.

Склад гідргелю (4);

|                             |               |
|-----------------------------|---------------|
| Poloxamer 407               | 25% (мас);    |
| ацетатний буфер 50мМ/рН 3,8 | 72,04% (мас); |
| г-н-бета-IFN 1a             | 0,012% (мас); |
| L-метіонін                  | 0,03% (мас);  |
| Poloxamer 188               | 0,24% (мас);  |
| Glycerol 30°Bé              | 2,6% (мас).   |

Приклад 8: Гідргель Poloxamer 407, що містить г-н-бета-IFN 1a, (5)

Гідргель (5), що містить IFN, одержали, як описано у Прикладі 1, і PEG (Lutrol® E400, Basf) (2,6% (мас.)) додавали до буферного розчину перед одержанням полксамерного гідргелевого розчину, тобто перед доданням Poloxamer 407.

Склад гідргелю (5):

|                             |               |
|-----------------------------|---------------|
| Poloxamer 407               | 25% (мас);    |
| ацетатний буфер 50мМ/рН 3,8 | 72,04% (мас); |
| г-н-бета-IFN 1a             | 0,012% (мас); |
| L-метіонін                  | 0,03% (мас);  |
| Poloxamer 188               | 0,24% (мас);  |
| PEG (Lutrol® E400)          | 2,6% (мас).   |

Приклад 9: Випробування для визначення придатності для введення за допомогою шприца

З метою перевірки придатності гідргелів на основі полксамеру, що містять IFN, до введення під шкіру, випробування для визначення придатності для введення за допомогою шприца можуть бути здійснені із застосуванням голок різних типів.

Зокрема, випробування для визначення придатності для введення за допомогою шприца здійснюють із застосуванням нової методики ін'єкцій, яка називається Depot One (фірма Imprint Pharmaceuticals).

Для методики Depot One вибирають голки, наведені нижче:

- 18/23 (внутрішній діаметр є еквівалентним голці №18, мінімальний зовнішній діаметр є еквівалентним голці № 23);

- 21/26 (внутрішній діаметр є еквівалентним голці №21, мінімальний зовнішній діаметр є еквівалентним голці №26).

Поліпропіленові шприци місткістю 3мл заповнюють 0,5мл гідргелю (1) або гідргелю (3) (які зберігають при температурі 4°C) і приблизно через 15хв при кімнатній температурі спорожнюють у полістироловий флакон. "Експлуатаційні характеристики голок" оцінюють, виходячи із зусилля, яке необхідно докласти для спорожнення шприців.

Випробування для визначення придатності для введення за допомогою шприца при кімнатній температурі показали, що гідргель (3) має дуже добрі характеристики для введення за допомогою шприца при кімнатній температурі.

Приклад 10: Фармакокінетичний профіль гідргелю Poloxamer 407 (3), що містить г-н-IFNβ 1a

Фармакокінетичні характеристики гідргелю Poloxamer 407 (3), що містить г-н-бета-IFN 1a, можуть бути визначені на самцях макак-крабодів (порода Macaca fascicularis, що знаходиться у неволі), які не використовувались у жодних попередніх способах лікування г-н-бета-IFN та інших дослідженнях лікарських засобів.

Тварини:

Діапазон маси тіла: 2-4кг на початку досліджень

Віковий діапазон: приблизно 5 років

Кількість тварин у групі: 4

Композиції вводять тваринам, які не одержували їжі з вечора і всю ніч (тобто приблизно 16год) перед введенням. Тварини знову одержали їжу через 4 год після лікування. Вода була доступною "ad libitum".

Застосовують гідргелеву композицію (3), що містить г-н-бета-IFN 1a, яка знаходиться у попередньо наповнених шприцах (кожен на 320мг) з голкою №21 і концентрацією 174мкг г-н-бета-IFN 1a/г. Унаслідок термозворотної природи гелевої композиції, попередньо наповнені шприци повинні зберігатись при температурі 4°C і залишатись при кімнатній температурі лише впродовж періоду часу, необхідного для введення.

Одну дозу (44мкг) г-н-бета-IFN 1a на тварину вводять у підшкірний шар однієї з ніг. Кожній тварині у Групі 1 (від 1 до 4 тварин) вводять один 200-250мг шприц, попередньо наповнений гідргелевою композицією (3), що містить г-н-бета-IFN 1a (один шприц на кожну мавпу). Попередньо наповнені скляні шприци зважують перед введенням і після введення для точного визначення введеної дози.

Кров відбирають із головної вени у пробірки за схемою, докладно представленою у таблиці, наведеній нижче:

| Час відбирання проб крові | Відбирання проб крові для аналізу на бета-IFN | Відбирання проб крові для аналізу на неоптерин | Загальна кількість зібраної крові |
|---------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------|
|---------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------|

|                                       |   |   |       |
|---------------------------------------|---|---|-------|
| Перед початком дослідження (день - 1) | - | X | 0,5мл |
| Перед введенням дози (0год)           | X | X | 1,5мл |
| 30хв                                  | X | - | 1,0мл |
| 1год                                  | X | - | 1,0мл |
| 2год                                  | X | - | 1,0мл |
| 4год                                  | X | - | 1,0мл |
| 6год                                  | - | X | 0,5мл |
| 8год                                  | X | - | 1,0мл |
| 24год                                 | X | X | 1,5мл |
| 32год                                 | X | X | 1,5мл |
| 48год                                 | X | X | 1,5мл |
| 56год                                 | X | X | 1,5мл |
| 72год                                 | X | X | 1,5мл |
| 96год                                 | X | X | 1,5мл |
| 104год                                | X | X | 1,5мл |
| 120год                                | X | X | 1,5мл |
| 168год                                | X | X | 1,5мл |

Проби крові витримували до згортання впродовж 60хв при кімнатній температурі. Згусток видаляли шляхом центрифугування при 2500×g (3350об/хв) при температурі 4°C впродовж 15хв.

Після того як було зібрано 0,5мл крові, готують 2 аліквоти сироватки, перша з яких містить щонайменше 0,125мл сироватки, друга включає залишкову кількість сироватки.

Після того як було зібрано 1,0мл крові, готують 2 аліквоти сироватки, перша з яких містить щонайменше 0,250 мл сироватки, друга включає залишкову кількість сироватки.

Після того як було зібрано 1,5мл крові, готують 3 аліквоти сироватки, перша і друга з яких містять щонайменше 0,250мл сироватки, третя включає залишкову кількість сироватки.

Зразки сироватки для аналізу на г-н-бета-IFN 1а зберігають при температурі -80°C.

Зразки сироватки для аналізу на неоптерин зберігають при температурі -20°C.

Наведені нижче фармакокінетичні параметри визначають за окремими концентраціями г-н-бета-IFN 1а у сироватці (МОд/мл) у залежності від часу (год) після кожного введення:

|                                | Tmax<br>[год] | Cmax<br>[МОд/мл] | AUClast<br>[год*МОд/мл] | Tlast<br>[год] | Clast<br>[МОд/мл] | AUC <sub>(0-72)</sub><br>[год*МОд/мл] |
|--------------------------------|---------------|------------------|-------------------------|----------------|-------------------|---------------------------------------|
| Середнє                        | 12            | 1930             | 54300                   | 96             | 9,64              | 53900                                 |
| Середнє квадратичне відхилення | 8,0           | 992              | 16000                   | 16             | 5,10              | 15800                                 |
| Коефіцієнт варіації %          | 67            | 51,3             | 29,4                    | 17             | 52,9              | 29,3                                  |

Ці результати показують, що гідрогелева композиція (3), що містить г-н-бета-IFN 1а, має високу біологічну засвоюваність.

Безпосередньо шляхом спостереження:

Стах: Найвище значення концентрації у сироватці;

Tmax: Часова точка з моменту введення, у якій встановлено значення Стах;

Tz: Остання часова точка відбирання проби, у якій встановлено значення концентрації, яке піддається кількісному визначенню;

Cz: Значення концентрації, одержане у часовій точці Tz відбирання проби.

За допомогою програми WinNonlin®:

AUCz: Площа під кривою концентрація-час до часової точки Tz відбирання проби, обчислена за логарифмічно-лінійною формулою трапецій (лінійна до Стах, логарифмічна після Стах).

Tlin: Перша точка, розглянута для визначення періоду напіввиведення.

λz: Константа швидкості виведення, обчислена за нахилом кривої лінійної регресії, яку одержали підбиранням натуральних логарифмів значень кінцевої концентрації, як функції часу (від Tlin до Tz).

t½: Період напіввиведення, обчислений за допомогою рівняння:

$$t_{1/2} = (\ln 2) / \lambda_z$$

AUC: Площа під кривою концентрація у сироватці-час, обчислена за допомогою наведеного нижче рівняння:

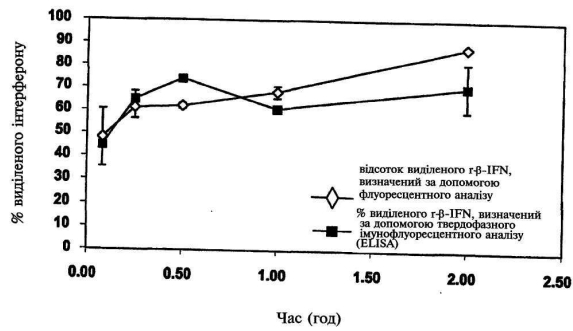
$$AUC = AUC_z + C_z / \lambda_z$$

%AUCext: Відсоток екстрапольованої AUC (тобто одержаної шляхом екстраполяції), обчисленої за допомогою наведеного нижче рівняння:

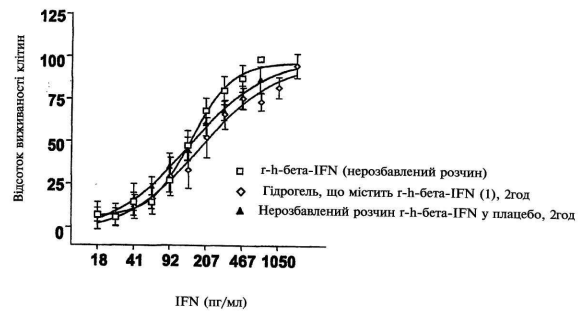
$$\%AUC_{ext} = (AUC - AUC_z) / AUC \cdot 100$$

Цей експеримент можна здійснити з паралельною Групою 2 тварин із застосуванням ринкової композиції β-IFN, як еталону (наприклад, Rebif®: розчинна композиція, що містить сироватковий альбумін людини (HSA), маніт та ацетат натрію, як наповнювачі, у попередньо наповнених шприцах з голкою №21 (ін'єкційний об'єм 0,5мл, концентрація 44мкг г-н-бета-IFN 1а (12МОд)). У цьому разі, кожній мавпі у Групі 2 (від 5 до 8 тварин) вводять повний вміст (0,5мл) одного шприца, попередньо наповненого Rebif®.

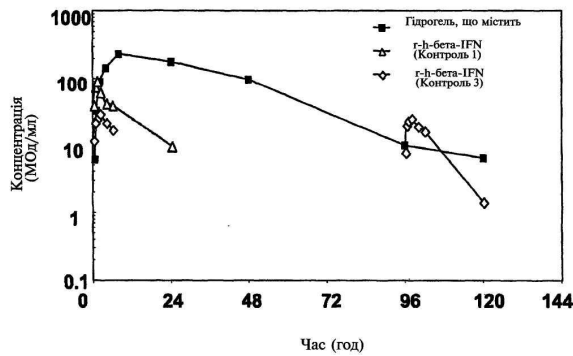
Досліджувана речовина: бета-інтерферон (г-н-бета-IFN 1а):



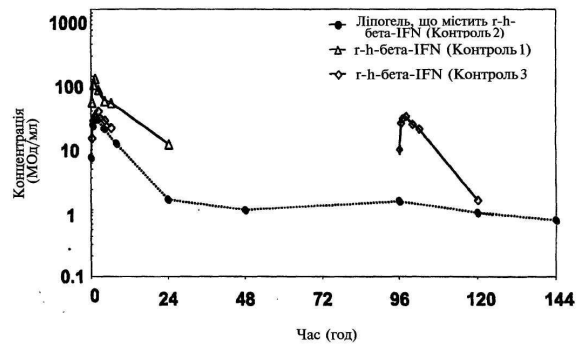
ФІГ. 1



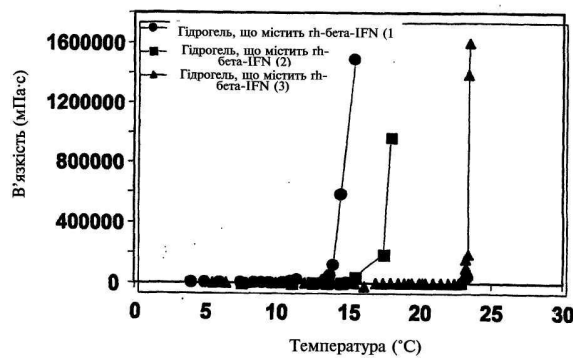
ФІГ. 2



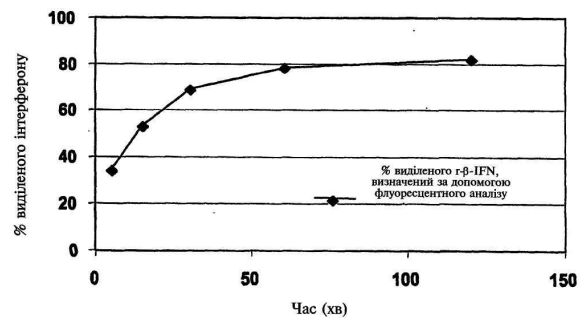
ФІГ. 3



ФІГ. 4



ФІГ. 5



ФІГ. 6