



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **94032** (13) **C2**
(51) **МПК** (2011.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) РІДКА СТАБАЛІЗОВАНА КОМПОЗИЦІЯ ІНТЕРФЕРОНУ БЕЗ HSA

1

(21) а200704143
(22) 29.04.2004
(24) 11.04.2011
(31) 03101210.7
(32) 01.05.2003
(33) EP
(31) 60/530,169
(32) 17.12.2003
(33) US
(62) 200509798, 29.04.2004
(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.
(72) Самарітані Фабріціо, ІТ, Дель Ріо Алессандра, ІТ
(73) ЕЙРЕС ТРЕЙДІНГ С.А., СН
(56) US 2002172661 A1, 21.11.2002
EP 1250932 A1, 23.10.2002
EP 0736303 A2, 09.10.1996
(57) 1. Стабілізована рідка фармацевтична композиція без HSA, що містить інтерферон-бета (IFN-бета), яка являє собою розчин, що містить буфер, поверхнево-активну речовину, якою є полоксамер 188, ізотонічний агент, бактеріостатичний препарат, яким є бензиловий спирт, і антиоксидант, яким є метіонін.
2. Композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що згаданим інтерфероном-бета є людський рекомбінантний IFN-бета.
3. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що згаданий буфер є присутнім у кількості, достатній для підтримання рН даної композиції у межах визначеного діапазону рН плюс/мінус 0,5 одиниці, причому визначений діапазон рН становить від приблизно 3,0 до приблизно 5,0.
4. Композиція за попереднім пунктом, яка **відрізняється** тим, що рН має значення $3,5 \pm 0,2$.
5. Композиція за попереднім пунктом, яка **відрізняється** тим, що рН має значення $4,5 \pm 0,2$.
6. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що концентрація буфера становить від 5 мМ до 500 мМ.
7. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що концентрація буфера становить 10 мМ.
8. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що згаданим буфером є

2

ацетатний буфер.
9. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що згаданим ізотонічним агентом є маніт.
10. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що концентрація ізотонічного агента становить від 0,5 мг/мл до 500 мг/мл.
11. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що концентрація ізотонічного агента становить 55 мг/мл.
12. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що концентрація поверхнево-активної речовини - полоксамеру 188 - становить від 0,01 мг/мл до 10 мг/мл.
13. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що концентрація поверхнево-активної речовини - полоксамеру 188 - становить 1 мг/мл.
14. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що концентрація антиоксиданта - метіоніну - становить від 0,01 мг/мл до 5,0 мг/мл.
15. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що концентрація антиоксиданта - метіоніну - становить 0,1 мг/мл.
16. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що концентрація інтерферону-бета становить від 10 мкг/мл до 800 мкг/мл.
17. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що концентрація інтерферону-бета становить 22 мкг/мл, 44 мкг/мл, 88 мкг/мл або 264 мкг/мл.
18. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що вона є водним розчином.
19. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що концентрація бактеріостатичного препарату - бензилового спирту - становить від 0,1 % до 2,0 %.
20. Композиція за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що концентрація бактеріостатичного препарату бензилового спирту - становить від 0,2 % до 0,3 %.
21. Спосіб одержання стабілізованої рідкої фармацевтичної композиції без HSA за будь-яким з пп. 1-20, який включає додання певної обчисленої

(13) **C2**

(11) **94032**

(19) **UA**

кількості поверхнево-активної речовини, якою є полоксамер 188, антиоксиданта, яким є метіонін, і ізотонічного агента до забуференого розчину з подальшим доданням інтерферону-бета (IFN-бета).

22. Контейнер, герметично закритий за стерильних умов і придатний до зберігання перед застосуванням, який містить рідку фармацевтичну компози-

цію за будь-яким із пп. 1-20.

23. Контейнер за п. 22, який являє собою заздалегідь заповнений шприц для введення однієї дози.

24. Контейнер за п. 22, який являє собою флакон.

25. Контейнер за п. 22, який являє собою капсулу для автоматичного інжектора.

26. Контейнер за п. 23 або п. 24, призначений для введення однієї або декількох доз.

Цей винахід у цілому стосується фармацевтичних композицій, що містять інтерферон (IFN), зокрема, стабілізованих композицій бета-інтерферону, вільних від людського сироваткового альбуміну (HSA) як додаткового фармацевтичного наповнювача.

Інтерферони є цитокінами, тобто розчинними білками, що передають інформаційні повідомлення між клітинами і відіграють суттєву роль у імунній системі завдяки тому, що допомагають знищувати мікроорганізми, які викликають інфекцію, і заліковують будь-яке наслідкове пошкодження. Природні інтерферони секретуються інфікованими клітинами, і вперше вони були ідентифіковані у 1957 році. Їхня назва виникла унаслідок того, що вони "втручаються (interfere)" у процес реплікації та продукування вірусів.

Інтерферони демонструють як антивірусну, так і антипроліферативну активність. На основі біохімічних та імунологічних властивостей, природні людські інтерферони розподіляються на три головні класи: альфа-інтерферон (лейкоцитарний), бета-інтерферон (фібробластний) та гамма-інтерферон (імунний). Альфа-інтерферон на цей час є схваленим у Сполучених Штатах та інших країнах для лікування лейкозу ворсистих клітин, гострокінцевих кондиллом, саркоми Капоші (рак, який звичайно уражує хворих, що страждають на синдром набутого імунodefіциту (СНІД)) та хронічного гепатиту ні А ні В.

Окрім того, інтерферони є глікопротеїнами, що продукуються організмом у відповідь на вірусну інфекцію. Вони пригнічують розмноження вірусів у захищених клітинах. Складаючись з білка більш низької молекулярної маси, інтерферони є найвищою мірою неспецифічні за своєю дією, тобто IFN, індукований одним вірусом, є ефективним проти широкого діапазону інших вірусів. Вони, однак, є видоспецифічними, тобто IFN, продукований одним видом, буде стимулювати антивірусну активність у клітинах лише того самого або близькоспорідненого виду. Інтерферони були першою групою цитокінів, які почали застосовуватись завдяки своїм потенційним протипухлинним та антивірусним активностям.

Три головні інтерферони позначаються як IFN- α , IFN- β та IFN- γ . Ці головні види інтерферонів початково були класифіковані за клітинами їх походження (лейкоцит, фібробласт або Т-клітина). Очевидним стало, однак, що однією клітиною може продукуватись декілька типів. З цієї причини лейкоцитарний IFN зараз називають IFN- α , фіб-

робластний IFN називають IFN- β , а інтерферон, що продукується Т-клітинами, називають IFN- γ . Існує також IFN четвертого типу, а саме лімфобластний інтерферон, що продукується лінією клітин "Namalwa" (яку одержали з лімфоми Бьоркіта), яка, як видається, продукує суміш як лейкоцитарного, так і фібробластного інтерферонів.

Одиниця інтерферону (U) або Міжнародна одиниця інтерферону (IU) є показником активності IFN, що визначається як кількість, необхідна для захисту 50 % клітин проти вірусного пошкодження. Аналізом, що може застосовуватись для визначення біологічної активності, є аналіз пригнічення цитопатичного ефекту. Опис цього аналізу наведено у літературних джерелах (Рубінштейн (Rubinstein) та інші, 1981; Фаміллетті П.К. (Familletti P.C.) та інші, 1981). За цим антивірусним аналізом, приблизно 1 Од/мл відповідає кількості інтерферону, яка пригнічує репродукцію вірусу на 50 %. Одиниці визначають за Міжнародним стандартом людського бета-інтерферону, який надається Національним інститутом здоров'я (США) (Пестка С. (Pestka S.), 1986).

Інтерферон кожного класу включає декілька різних типів. Кожен з IFN- β і IFN- γ є продуктом одного гена.

Білки, що класифікуються як альфа-інтерферони, є найбільш різноманітною групою, що включає приблизно 15 типів. В хромосомі 9 є кластер генів для IFN- α , що включає щонайменше 23 члени, 15 з яких є активними і транскрибуються. Зрілі альфа-інтерферони не гліколізуються.

Усі альфа- і бета-інтерферони мають однакову довжину (165 амінокислот або 166 амінокислот) і схожі біологічні активності. Гамма-інтерферони мають 146 амінокислот у довжину і меншою мірою походять на класи α та β . Лише гамма-інтерферони можуть активувати макрофаги або індукувати визрівання Т-клітин-кілерів. Ці терапевтичні засоби нових типів подеколи називають модуляторами біологічних реакцій (BRM), оскільки вони впливають на реакцію організму на пухлину, впливаючи на розпізнавання через імунomodуляцію.

Людський фібробластний інтерферон (IFN- β) має антивірусну активність і може також стимулювати природні клітини-кілери проти пухлинних клітин. Він являє собою поліпептид із приблизною масою 20000 Да, що індукується вірусами і двонитковими РНК. Повну амінокислотну послідовність цього білка визначили (Дерінк (Derynk) та інші, 1980) за нуклеотидною послідовністю гена для

фібробластного інтерферону, клонованого методами рекомбінантних ДНК. Його довжина становить 166 амінокислот.

Шепард (Shepard) та інші (1981) описали мутацію на основі 842 (Cys → Tyr у положенні 141), що ліквідує його антивірусну активність, і варіантний клон із делецією нуклеотидів 1119-1121.

Марк (Mark) та інші (1984) ввели штучну мутацію шляхом заміни основи 469 (T) на (A), унаслідок чого у положенні 17 відбулась амінокислотна заміна Cys → Ser. Повідомлялось, що одержаний IFN-β є таким самим активним, як і "нативний" IFN-β і стійким впродовж довготривалого зберігання (-70°C).

Ребіф (Rebif®) (фірма Serono - рекомбінантний людський бета-інтерферон), найостанніша розробка у галузі інтерферонотерапії розсіяного склерозу (MS), являє собою інтерферон (IFN)-бета-1a, що продукується клітинними лініями ссавців. Рекомендованою міжнародною непатентованою назвою (INN) для нього є "інтерферон-бета-1a".

Як і з усіма фармацевтичними засобами на основі білків, однією з головних перепон, яку необхідно подолати у разі застосування бета-інтерферону як терапевтичного засобу, є втрата фармацевтичної придатності, що може бути наслідком його нестійкості у фармацевтичних композиціях.

Фізичними нестійкостями, що загрожують активності та ефективності поліпептиду у фармацевтичних композиціях, є денатурація і утворення розчинних і нерозчинних агрегатів, у той час як хімічними нестійкостями є гідроліз, утворення імідів, окиснення, рацемізація і деамідування. Відомо, що деякі з цих змін ведуть до втрати або зниження фармацевтичної активності білка, що становить інтерес. У інших випадках точні наслідки цих змін є невідомими, однак одержані продукти розкладу все ще розглядаються як фармацевтично неприйнятні унаслідок потенційних або небажаних побічних ефектів.

Стабілізація поліпептидів у фармацевтичних композиціях залишається ділянкою, на якій головну роль відіграє метод спроб та помилок (оглядові статті Ванг (Wang) (1999), *Int. J. Pharm.*, 185:129-188; Ванг (Wang), Хансон (Hanson) (1988), *J. Parenteral Sci. Tech.*, 42:S3-S26). Наповнювачами, які додають до поліпептидних фармацевтичних композицій для підвищення їх стійкості, є буфери, цукри, поверхнево-активні речовини, амінокислоти, поліетиленгліколи і полімери, однак стабілізувальні ефекти цих хімічних домішок різняться у залежності від білка.

У сучасних композиціях на основі IFN-β HSA (людський сироватковий альбумін) застосовують як засіб, що підвищує розчинність IFN-β. Застосування HSA, однак, має певні вади. HSA є продуктом людської крові і повинен, таким чином, відбиратись у людей. Незважаючи на заходи, що вживаються для зменшення ризику, застосування продуктів людської крові, наприклад, HSA, тягне за собою потенційне введення людських вірусів, наприклад ВІЛ або вірусу гепатиту С.

Унаслідок цього існує необхідність у додатко-

вих фармацевтичних композиціях на основі IFN-β, що містять фізіологічно сумісні стабілізатори, які поліпшують розчинність цього білка і стабілізують білок проти утворення агрегатів, збільшуючи тим самим його фармацевтичну придатність.

Цей винахід спрямовано на стабілізовані фармацевтичні композиції, що містять інтерферон (IFN), і способи їх одержання. Ці композиції одержують без людського сироваткового альбуміну (HSA), і вони, таким чином, є вільними від цього фармацевтичного наповнювача. Такі композиції у цьому описі називають фармацевтичними композиціями IFN без HSA ("вільними від HSA"), і вони містять інтерферон (IFN) або його ізоформу, мутеїн, гібридний білок, функціональну похідну, активну фракцію або сіль, де згадана композиція являє собою розчин, що містить буфер, поверхнево-активну речовину, ізотонічний агент і антиоксидант.

За варіантом здійснення цього винаходу, згадана композиція містить також бактеріостатичний препарат.

Термін "інтерферон" або "IFN", що застосовується у цьому описі, означає будь-яку молекулу, що у літературі визначається як така, і включає, наприклад, інтерферони будь-яких типів, згадані у вищенаведеному розділі "Передумови створення винаходу". Вищенаведене визначення включає, зокрема, IFN-α, IFN-β і IFN-γ. IFN-β за цим винаходом є інтерфероном, якому віддають перевагу. Придатний за цим винаходом IFN-β є комерційно доступним, наприклад, як Rebif® (фірма Serono), Avonex® (фірма Biogen) або Betaferon® (фірма Schering). Перевагу за цим винаходом віддають застосуванню інтерферонів людського походження. Термін "інтерферон", що застосовується у цьому описі, означає його ізоформу, мутеїн, гібридний білок, функціональну похідну, активну фракцію або сіль.

Термін "бета-інтерферон (IFN-бета або IFN-β)", що застосовується у цьому описі, означає фібробластний інтерферон, зокрема, людського походження, який одержують шляхом виділення з біологічних рідин або за допомогою методів рекомбінантних ДНК із прокаріотних або еукаріотних клітин-хазяїв, а також його солі, функціональні похідні, варіанти, аналоги і активні фрагменти. За варіантом, якому віддають перевагу, IFN-бета означає інтерферон-бета-1a.

Термін "мутеїни", що застосовується у цьому описі, означає аналоги IFN, у яких один або декілька амінокислотних залишків природного IFN замінені різними амінокислотними залишками чи видалені, або один чи декілька амінокислотних залишків додані до природної послідовності IFN без значної зміни активності одержаних продуктів, порівняно з IFN дикого типу. Ці мутеїни одержують відомими методами синтезу та/або сайтспрямованого мутагенезу чи будь-яким іншим відомим придатним способом. До мутеїнів, яким віддають перевагу, належать, наприклад, мутеїни, описані Шепард (Shepard) та іншими (1981) або Марк (Mark) та іншими (1984).

Амінокислотна послідовність будь-якого з та-

ких мутеїнів, за варіантом, якому віддають перевагу, достатньою мірою повторює амінокислотну послідовність IFN, завдяки чому активність мутеїну є по суті подібною або навіть кращою за активність IFN. Біологічна функція інтерферону є добре відомою фахівцю у цій галузі. Встановлені біологічні стандарти, які є доступними, наприклад, від Національного інституту біологічних стандартів та контролю (<http://immunology.org/links/NIBSC>).

Описані біологічні аналізи для визначення активності IFN. Аналіз IFN може, наприклад, здійснюватись за описом, наведеним Рубінштейн (Rubinstein) та іншими, 1981. Так, за допомогою стандартних експериментальних методів можна визначити, чи є активність будь-якого даного мутеїну по суті подібною або навіть кращою за активність IFN.

Мутеїни IFN, які можуть застосовуватись за цим винаходом, або нуклеїнові кислоти, що їх кодує, включають кінцевий набір, по суті, відповідних послідовностей, як замінних пептидів або полінуклеотидів, які можуть бути поточним чином одержані пересічним фахівцем у цій галузі без зайвого експериментування, виходячи з інструкцій та настанов, наведених у цьому описі.

Змінами для мутеїнів, яким віддають перевагу за цим винаходом, є зміни, відомі як "консерватив-

ні" заміни. Консервативні амінокислотні заміни поліпептидів або білків за цим винаходом можуть включати синонімічні амінокислоти у межах групи, які мають достатньо подібні фізико-хімічні властивості, завдяки чому заміни між членами групи зберігають біологічну функцію цієї молекули. Зрозуміло, що у вищезазначених послідовностях можуть також здійснюватись інсерції або делеції без зміни функції згаданих послідовностей, зокрема, якщо інсерції або делеції залучають лише декілька амінокислот, наприклад менше тридцяти, за варіантом, якому віддають перевагу, менше десяти, і не видаляють або зміщують амінокислоти, що є критичними для функціональної конформації, наприклад, цистеїнові залишки.

Білки та мутеїни, одержані шляхом таких делецій та/або інсерцій, входять до сфери дії цього винаходу.

За варіантом, якому віддають перевагу, синонімічними амінокислотними групами є групи, зазначені у Таблиці I. За варіантом, якому віддають більшу перевагу, синонімічними амінокислотними групами є групи, зазначені у Таблиці II; і за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, синонімічними амінокислотними групами є групи, зазначені у Таблиці III.

Таблиця I

Групи синонімічних амінокислот, яким віддають перевагу

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gin, 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, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, 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 віддають більшу перевагу

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	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, 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

Прикладами здійснення амінокислотних замінів у білках, що можуть застосовуватись для одержання мутеїнів IFN для застосування у цьому винаході, є стадії будь-яких відомих методів, наприклад, наведені у патентах США № 4,959,314, №

4,588,585 і № 4,737,462, які були видані на ім'я Марк (Mark) та інші; № 5,116,943, який був виданий на ім'я Котс (Koths) та інші; № 4,965,195, який був виданий на ім'я Неймен (Namen) та інші; № 4,879,111, який був виданий на ім'я Чонг (Chong)

та інші; і № 5,017,691, який був виданий на ім'я Лі (Lee) та інші; та білки із заміною лізину, наведені у патенті США № 4,904,584 (Шоу (Shaw) та інші). Конкретні мутеїни IFN-бета були описані, наприклад, Марк (Mark) та іншими, 1984.

Термін "гібридний білок" означає поліпептид, що містить IFN або його мутеїн, злитий з іншим білком, який, наприклад, має тривалий час перебування у рідинах у тілі людини. IFN може, таким чином, зливатися з іншим білком, поліпептидом тощо, наприклад імуноглобуліном або його фрагментом.

Словосполучення "функціональні похідні", що застосовується у цьому описі, означає похідні IFN та їхні мутеїни і гібридні білки, які можна одержати з функціональних груп, що існують у вигляді бічних ланцюгів на залишках, або N- чи C-кінцевих груп, способами, відомими у цій галузі, і які включають до цього винаходу доти, доки вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто, доки вони не знищують активності білка, яка є по суті подібною до активності IFN, і не наділяють токсичними властивостями композиції, що їх містять. До цих похідних можуть належати, наприклад, бічні ланцюги поліетиленгліколю, які можуть маскувати імунодомінантні сайти і подовжувати тривалість перебування IFN у рідинах у тілі людини. До інших похідних належать аліфатичні складні ефіри карбоксильних груп, амідні карбоксильних груп, одержані шляхом реакції з аміаком або з первинними чи вторинними амінами, N-ацильні похідні вільних аміногруп залишків амінокислот, які були одержані з ацильними складовими (наприклад, алканойльними або карбоциклічними ароїльними групами), або O-ацильні похідні вільних гідроксильних груп (наприклад, вільних гідроксильних груп серильних або треонільних залишків), які були одержані з ацильними складовими.

Під "активними фракціями" IFN або мутеїнів і гібридних білків у цьому винаході розуміються будь-які фрагменти або попередники поліпептидного ланцюга білкової молекули самостійно або разом із пов'язаними молекулами або залишками, зв'язаними з ними, наприклад залишки цукру чи фосфату або агрегати білкової молекули чи залишки цукру самі по собі, за умови, що згадана фракція не має значно зниженої активності, порівняно з відповідним IFN.

Термін "солі" у цьому описі означає як солі карбоксильних груп, так і солі аміногруп білків, опис яких було наведено вище, або їхніх аналогів, одержані шляхом додання кислоти. Солі карбоксильної групи можна одержати засобами, відомими у цій галузі, і до них належать неорганічні солі, наприклад, солі натрію, кальцію, амонію, заліза або цинку тощо, і солі, одержані за допомогою органічних основ, наприклад солі, одержані з амінами, наприклад, триетаноламіном, аргініном або лізином, піперидином, прокаїном тощо. До солей, одержаних доданням кислоти, належать, наприклад, солі, одержані з мінеральними кислотами, наприклад хлористоводневою кислотою або сірчаною кислотою, і солі, одержані органічними кислотами, наприклад оцтовою кислотою або щавлевою кислотою. Звичайно, будь-які з таких солей повинні

зберігати біологічну активність білків (IFN) за цим винаходом, тобто здатність до зв'язування відповідного рецептора і ініціювання передачі сигналу рецептором.

За цим винаходом, застосуванню рекомбінантного людського IFN-бета і сполук за цим винаходом віддають особливу додаткову перевагу.

Нещодавно було наведено опис варіанта інтерферону особливого: роду. Так звані "консенсусні інтерферони" є штучними варіантами IFN (патент США № 6,013,253). За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, сполуки за цим винаходом застосовують у комбінації з консенсусним інтерфероном.

Словосполучення "людський консенсусний інтерферон (IFN-con)", що застосовується у цьому описі, означає штучний поліпептид, який переважно включає ті амінокислотні залишки, що є спільними для субпопуляції IFN-альфа, репрезентативної для більшості послідовностей підтипу природного людського лейкоцитарного інтерферону, і який включає, у одному або декількох із тих положень, де немає амінокислоти, спільної для всіх підтипів, амінокислоту, яка переважно зустрічається у цьому положенні і у жодному разі не включає будь-якого амінокислотного залишку, який не існує у цьому положенні у принаймні одного природного підтипу. IFN-con включає (однак ними не обмежується) амінокислотні послідовності, позначені як IFN-con1, IFN-con2 і IFN-con3, які розкривають у патентах США № 4,695,623, № 4,897,471 і № 5,541,293. Послідовності ДНК, що кодують IFN-con, можна одержати, як описано у вищезгаданих патентах або за допомогою інших стандартних методів.

За додатковим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, гібридний білок включає злиття з Ig. Злиття може бути прямим або здійснюватись через короткий лінкерний пептид, довжина якого може не перевищувати 1-3 амінокислоти або який може бути довшим, наприклад, він може складатись з 13 амінокислотних залишків. Згаданий лінкер може бути, наприклад, трипептидом із послідовністю E-F-M (Glu-Phe-Met) або являти собою лінкерну послідовність із 13 амінокислот (Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gln-Phe-Met), введenu між послідовністю IFN і послідовністю імуноглобуліну. Одержаний гібридний білок може мати поліпшені властивості, наприклад триваліший час перебування у рідинах у тілі людини (період напіввиведення), підвищену питому активність, підвищений рівень експресії або покращення процесу очищення згаданого гібридного білка.

За додатковим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, IFN зливається з константною ділянкою молекули Ig. За варіантом, якому віддають перевагу, він зливається з ділянками важкого ланцюга, наприклад, доменами CH2 і CH3 людського IgG₁. Інші ізоформи молекул Ig є також придатними для одержання гібридних білків за цим винаходом, наприклад ізоформи IgG₂, IgG₃ або IgG₄ чи інших класів Ig, наприклад, IgM або IgA. Гібридні білки можуть бути мономерними або мультимерними, гетеро- або гомомультимерними.

За додатковим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, функціональні похідні включають щонайменше одну складову, приєднану до однієї або декількох функціональних груп, що зустрічаються у вигляді одного або декількох бічних ланцюгів на амінокислотних залишках. За варіантом, якому віддають перевагу, згаданою складовою є поліетилен (PEG). Поліетиленгліколізація може здійснюватись відомими способами, наприклад способами, опис яких наведено, наприклад, у WO 99/55377.

Кількість, введена індивіду у вигляді одноразової дози або багаторазових доз, буде змінюватись у залежності від ряду факторів, у тому числі, фармакокінетичних властивостей, шляху введення, стану і характеристик хворого (стать, вік, маса тіла, стан здоров'я, розміри), ступеня розвитку симптомів, одночасно здійснюваного лікування, частоти лікування і бажаного ефекту.

Стандартні дози людського IFN-бета коливаються у межах від 80000 МОд/кг на добу до 200000 МОд/кг на добу або від 6 млн. МОд (мільйонів Міжнародних одиниць) до 12 млн. МОд на хворого на добу чи від 22 мкг на хворого до 44 мкг на хворого. За цим винаходом IFN, за варіантом, якому віддають перевагу, може вводитись у дозі від приблизно 1 мкг до 50 мкг, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, від приблизно 10 мкг до 30 мкг або від приблизно 10 мкг до 20 мкг на хворого на добу.

Введення активних інгредієнтів за цим винаходом може здійснюватись внутрішньовенним, внутрішньом'язовим або підшкірним шляхом. Шляхом введення IFN, якому віддають перевагу, є підшкірний шлях.

IFN може вводитись щоденно, через день або рідше. За варіантом, якому віддають перевагу, IFN вводять один раз, двічі або тричі на тиждень.

Шляхом введення, якому віддають перевагу, є підшкірне введення, наприклад, тричі на тиждень. Додатковим шляхом введення, якому віддають перевагу, є внутрішньом'язове введення, яке може здійснюватись, наприклад, один раз на тиждень.

За варіантом, якому віддають перевагу, від 22 мкг до 44 мкг або від 6 млн. МОд до 12 млн. МОд IFN-бета вводять тричі на тиждень шляхом підшкірної ін'єкції.

IFN-бета може вводитись підшкірно у дозі від 25 мкг до 30 мкг або від 8 млн. МОд до 9,6 млн. МОд через день. 30 мкг або 6 млн. МОд IFN-бета можуть додатково вводитись внутрішньом'язово один раз на тиждень.

Термін "стійкість" означає фізичну, хімічну і структурну стійкість композицій інтерферону за цим винаходом (зі збереженням біологічної активності). Нестійкість білкової композиції може спричинюватись хімічним розкладом або агрегацією білкових молекул з утворенням полімерів вищого порядку, дегліколізацією, модифікацією гліколізації, окисненням або будь-якою іншою структурною модифікацією, що знижує щонайменше одну біологічну активність поліпептиду інтерферону, включеного до цього винаходу.

"Стиким" розчином або композицією є такий розчин або така композиція, де ступінь розкладу,

модифікації, агрегації, втрати біологічної активності тощо білків цього розчину або композиції є прийнятно контрольованим і з часом не підвищується до неприйнятного рівня. За варіантом, якому віддають перевагу, композиція зберігає вказану активність інтерферону впродовж періоду часу тривалістю від 12 міс до 24 міс щонайменше на рівні або приблизно на рівні 60 %, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щонайменше на рівні або приблизно на рівні 70 %, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, щонайменше на рівні або приблизно на рівні 80 %. Стабілізовані композиції IFN без HSA за цим винаходом, за варіантом, якому віддають перевагу, мають строк зберігання щонайменше приблизно 6 міс, 12 міс, 18 міс, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щонайменше 20 міс, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 22 міс., за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, щонайменше приблизно 24 міс при температурі зберігання 2-8 °C.

Способи контролювання стійкості фармацевтичних: композицій IFN без HSA за цим винаходом є доступними у цій галузі техніки, з включенням тих способів, опис яких наведено у прикладах, що розкриваються у цьому описі. Так, утворення агрегатів IFN під час зберігання рідкої фармацевтичної композиції за цим винаходом може легко визначатись шляхом вимірювання зміни кількості розчинного IFN у розчині з часом. Кількість розчинного поліпептиду у розчині може легко піддаватись кількісному визначенню за допомогою ряду аналітичних аналізів, адаптованих для виявлення IFN. Такі аналізи включають, наприклад, вискозоефективну рідинну хроматографію з оберненою фазою (RP-HPLC) і УФ-абсорбційну спектроскопію, як описано у наведених нижче Прикладах.

Визначення у рідких композиціях як розчинних, так і нерозчинних агрегатів під час зберігання може здійснюватись, наприклад, за допомогою аналітичного ультрацентрифугування, як вказується у Прикладах, наведених нижче, для розрізнення тієї частини розчинного поліпептиду, що є присутньою у вигляді розчинних агрегатів, і тієї частини, що є присутньою у неагрегованій, біологічно активній молекулярній формі.

Словосполучення "багатодозове застосування" включає застосування одного флакона, ампули або капсули композиції інтерферону для більше ніж однієї ін'єкції, наприклад для 2, 3, 4, 5, 6 або більше ін'єкцій. Ін'єкції, за варіантом, якому віддають перевагу, здійснюють впродовж періоду часу, який щонайменше дорівнює або приблизно дорівнює 12 год., 24 год., 48 год. тощо, за варіантом, якому віддають перевагу, впродовж періоду часу, який дорівнює або приблизно дорівнює 12 дням. Ін'єкції можуть відокремлюватись у часі, наприклад, часовим періодом тривалістю 6 год, 12 год., 24 год., 48 год. або 72 год.

Термін "буфер" або "фізіологічно прийнятний буфер" означає розчини сполук, які, як відомо, є безпечними для фармацевтичного або ветеринарного застосування у композиціях і які мають ефект підтримування або регулювання рівня pH композиції у діапазоні pH, бажаному для згаданої компо-

зиції. Прийнятими буферами для регулювання рівня pH у межах від помірно кислого pH до помірно основного pH є (але ними не обмежуються) такі сполуки, як фосфат, ацетат, цитрат, аргінін, трис і гістидин. "Трис" означає 2-аміно-2-гідроксиметил-1,3-пропандіол і будь-яку його фармацевтично прийнятну сіль. Буферами, яким віддають перевагу, є ацетатні буфери з фізіологічним розчином або прийнятна сіль.

"Ізотонічний агент" являє собою сполуку, що є фізіологічно прийнятною і яка наділяє композицію прийнятною ізотонічністю для запобігання результуючій течії води через клітинні мембрани, що контактують зі згаданою композицією. З цією метою, як правило, застосовуються такі сполуки як гліцерин із відомими концентраціями. Іншими придатними ізотонічними агентами є (але ними не обмежуються) амінокислоти або білки (наприклад, гліцин або альбумін), солі (наприклад, хлорид натрію) і цукри (наприклад, декстроза, маніт, цукроза і лактоза). За варіантом, якому віддають перевагу, ізотонічним агентом є маніт.

Термін "антиоксидант" означає сполуку, що запобігає взаємодії кисню або вільних радикалів кисню з іншими речовинами. Антиоксиданти входять до ряду наповнювачів, які, як правило, додають до фармацевтичних систем для підвищення фізичної та хімічної стійкості. Антиоксиданти додають для зниження до мінімального рівня або уповільнення процесів окиснення, що відбуваються з деякими лікарськими засобами або наповнювачами у разі піддання дії кисню або у присутності вільних радикалів. Ці процеси часто мають каталізуватись світлом, температурою, воднем (у разі підвищення концентрації), присутністю металевих мікроелементів або пероксидів. Як антиоксиданти у лікарських засобах часто застосовуються сульфіти, бісульфіти, тіосечовина, метіонін, солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA), бутилований гідрокситолуол (BHT) і бутилований гідроксіанізол (BHA). Було встановлено, що натрій-EDTA підсилює активність антиоксидантів завдяки утворенню хелатних сполук з іонами металів, які інакше каталізували б реакцію окиснення. Антиоксидантом, якому віддають найбільшу перевагу, є метіонін.

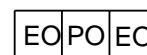
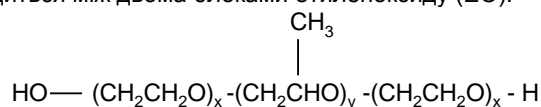
Термін "бактеріостатичний препарат" означає сполуку або композиції, що додаються до лікарської форми для відігравання ролі антибактеріального агента. Консервована композиція за цим винаходом, що містить інтерферон, за варіантом, якому віддають перевагу, задовольняє передбачувані законом інструктивним рекомендаціям щодо ефективності консерванта, який повинен бути комерційно життєздатним універсальним продуктом. Прикладами бактеріостатичних препаратів є фенол, m-крезол, p-крезол, o-крезол, хлоркрезол, бензиловий спирт, алкілпарабен (метил, етил, пропіл, бутил тощо), бензалконію хлорид, бензетонію хлорид, натрію дигідроацетат і тимеросал; За варіантом, якому віддають перевагу, бактеріостатичним препаратом є бензиловий спирт.

Термін "поверхнево-активна речовина" означає розчинну сполуку, що знижує поверхневий натяг рідин або знижує міжфазний натяг між двома

рідинами або рідиною і твердим тілом, де поверхневий натяг являє собою силу, що діє на поверхню рідини із намаганням звести до мінімуму площу поверхні. Поверхнево-активні речовини подеколи застосовують у фармацевтичних композиціях, у тому числі для спрямованої доставки лікарських засобів і поліпептидів низької молекулярної маси для модифікування абсорбції лікарського засобу або його спрямованої доставки до цільових тканин. Добре відомими поверхнево-активними речовинами є полісорбати (похідні поліоксіетилену; твін), а також плуронік (Pluronic).

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, було встановлено, що завдяки об'єднанню інтерферону з поверхнево-активною речовиною, вибраною з групи, що включає плуронік F77 (Pluronic® F77), плуронік F87, плуронік F88 і плуронік F68 (Pluronic® F68), за варіантом, якому віддають особливу перевагу, з плуронік F68 (фірма BASF, плуронік F68 є також відомим під назвою поллоксамер 188 (Poloxamer 188)), одержують стійкі композиції, які зводять до мінімального рівня втрату активного компонента, що спричинюється адсорбцією на поверхнях флакона та/або засобу для спрямованої доставки (наприклад, шприца, насоса, катетера тощо). Було встановлено також, що завдяки об'єднанню інтерферону з поверхнево-активною речовиною, вибраною з групи, що включає плуронік F77 (Pluronic® F77), плуронік F87, плуронік F88 і плуронік F68 (Pluronic® F68), за варіантом, якому віддають особливу перевагу, з плуронік F68 (фірма BASF, плуронік F68 є також відомим під назвою поллоксамер 188 (Poloxamer 188)), одержують стійку композицію, що є більш стійкою до окиснення і утворення білкових агрегатів.

Поверхнево-активні речовини типу плуронік є блокспівполімерами етиленоксиду (EO) і пропіленоксиду (PO). Блок пропіленоксиду (PO) знаходиться між двома блоками етиленоксиду (EO).



Поверхнево-активні речовини типу плуронік синтезують двостадійним способом:

1. Гідрофобну речовину бажаної молекулярної маси одержують шляхом контрольованого додання пропіленоксиду до двох гідроксильних груп пропіленгліколю; і

2. Етиленоксид додають для того, щоб гідрофобна речовина опинилась між гідрофільними групами.

У разі плуронік F77 (Pluronic® F77) відсотковий вміст поліоксіетилену (гідрофільна речовина) становить 70 %, а молекулярна маса гідрофобної речовини (поліоксипропілену) досягає приблизно 2306 Да.

У разі плуронік F87 відсотковий вміст поліоксіетилену (гідрофільна речовина) становить 70 %, а молекулярна маса гідрофобної речовини (поліоксипропілену) досягає приблизно 2644 Да.

У разі плюронік F88 відсотковий вміст поліоксietилену (гідрофільна речовина) становить 80 %, а молекулярна маса гідрофобної речовини (поліоксипропілену) досягає приблизно 2644 Да.

У разі плюронік F68 відсотковий вміст поліоксietилену (гідрофільна речовина) становить 80, а молекулярна маса гідрофобної речовини (поліоксипропілену) досягає приблизно 1967 Да.

Нижче наведені типові властивості плюронік F77:

- середня молекулярна маса: 6600;
- точка плавлення/плинності: 48 °C;
- фізична форма при температурі 20 °C: тверде тіло;

- в'язкість (за Брукфілдом): 480 сП (0,48 Па·с) [рідини при температурі 25 °C, пасти при температурі 60 °C і тверді речовини при температурі 77 °C];

- поверхневий натяг, дин/см (Н/м) при температурі 25 °C:

0,1 % концентрація: 47,0 (0,047);

0,01 % концентрація: 49,3 (0,0493);

0,001 % концентрація: 52,8 (0,0528);

- міжфазний натяг, дин/см (Н/м) при температурі 2 °C порівняно з вазеліновим маслом:

0,1 % концентрація: 17,7 (0,0177);

0,01 % концентрація: 20,8 (0,0208);

0,01 % концентрація: 25,5 (0,0255);

- змочування (за Дрейвсом), у секундах при температурі 25 °C:

1,0 % концентрація: >360;

0,1 % концентрація: >360;

- висота піни:

(за методикою фірми Ross Miles), 0,1 %, мм при температурі 50 °C: 100;

(за методикою фірми Ross Miles), 0,1 %, мм при температурі 26 °C: 47;

(за результатами динамічних випробувань), 0,1 %, мм при 400 мл/хв.: >600;

- температура помутніння у водному розчині, °C:

1,0 % концентрація: >100;

10 % концентрація: >100;

- HLB (гідрофільно-ліпофільний баланс): 25.

Нижче наведені типові властивості плюронік F87:

- середня молекулярна маса: 7700;
- точка плавлення/плинності: 49 °C;
- фізична форма при температурі 20 °C: тверде тіло;

- в'язкість (за Брукфілдом): 700 сП (0,7 Па·с) [рідини при температурі 25 °C, пасти при температурі 60 °C і тверді речовини при температурі 77 °C];

- поверхневий натяг, дин/см (Н/м) при температурі 25 °C:

0,1 % концентрація: 44,0 (0,044);

0,01 % концентрація: 47,0 (0,047);

0,001 % концентрація: 50,2 (0,0502);

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

0,1 % концентрація: 17,4 (0,0174);

0,01 % концентрація: 20,3 (0,0203);

0,01 % концентрація: 23,3 (0,0233);

- змочування (за Дрейвсом), у секундах при

температурі 25 °C:

1,0 % концентрація: >360;

0,1 % концентрація: >360;

- висота піни:

(за методикою фірми Ross Miles), 0,1 %, мм при температурі 50 °C: 80;

(за методикою фірми Ross Miles), 0,1%, мм при температурі 26 °C: 37;

(за результатами динамічних випробувань), 0,1 %, мм при 400 мл/хв.: >600;

- температура помутніння у водному розчині, °C:

1,0 % концентрація: >100;

10 % концентрація: >100;

- HLB (гідрофільно-ліпофільний баланс): 24.

Нижче наведені типові властивості плюронік F88:

- середня молекулярна маса: 11400;
- точка плавлення/плинності: 54 °C;
- фізична форма при температурі 20 °C: тверде тіло;

- в'язкість (за Брукфілдом): 2300 сП (2,3 Па·с) [рідини при температурі 25 °C, пасти при температурі 60 °C і тверді речовини при температурі 77 °C];

- поверхневий натяг, дин/см (Н/м) при температурі 25 °C:

0,1 % концентрація: 48,5 (0,0485);

0,01 % концентрація: 52,6 (0,0526);

0,001 % концентрація: 55,7 (0,0557);

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

0,1 % концентрація: 20,5 (0,0205);

0,01 % концентрація: 23,3 (0,0233);

0,01 % концентрація: 27,0 (0,027);

- змочування (за Дрейвсом), у секундах при температурі 25 °C:

1,0 % концентрація: >360;

0,1 % концентрація: >360;

- висота піни:

(за методикою фірми Ross Miles), 0,1 %, мм при температурі 50 °C: 80;

(за методикою фірми Ross Miles), 0,1%, мм при температурі 26 °C: 37;

(за результатами динамічних випробувань), 0,1 %, мм при 400 мл/хв.: >600;

- температура помутніння у водному розчині, °C:

1,0 % концентрація: >100;

10 % концентрація: > 100;

- HLB (гідрофільно-ліпофільний баланс): 28.

Нижче наведені типові властивості плюронік F68:

- середня молекулярна маса: 8400;
- точка плавлення/плинності: 52 °C;
- фізична форма при температурі 20 °C: тверде тіло;

- в'язкість (за Брукфілдом): 1000 сП (1,0 Па·с) [рідини при температурі 25 °C, пасти при температурі 60 °C і тверді речовини при температурі 77 °C];

- поверхневий натяг, дин/см (Н/м) при температурі 25 °C:

0,1 % концентрація: 50,3 (0,0503);

0,01 % концентрація: 51,2 (0,0512);

0,001 % концентрація: 53,6 (0,0536);
 - міжфазний натяг, дин/см (Н/м) при температурі 2 °C порівняно з вазеліновим маслом:
 0,1 % концентрація: 19,8 (0,0198);
 0,01 % концентрація: 24,0 (0,024);
 0,01 % концентрація: 26,0 (0,026);
 - змочування (за Дрейвсом), у секундах при температурі 25 °C:
 1,0 % концентрація: >360;
 0,1 % концентрація: >360;
 - висота піни:
 (за методикою фірми Ross Miles), 0,1 %, мм при температурі 50 °C: 35;
 (за методикою фірми Ross Miles), 0,1 %, мм при температурі 26 °C: 40;
 (за результатами динамічних випробувань), 0,1 %, мм при - 400 мл/хв: >600;
 - температура помутніння у водному розчині, °C:
 1,0 % концентрація: >100;
 10 % концентрація >100;
 - HLB (гідрофільно-ліпофільний баланс): 29.

У композиціях за цим винаходом можуть також застосовуватись інші полімери, що мають властивості, подібні до наведених вище. Поверхнево-активною речовиною, якій віддають перевагу, є плуронік F68 і поверхнево-активні речовини, що мають подібні властивості.

Плуронік, зокрема плуронік F68, є присутнім у композиції, за варіантом, якому віддають перевагу, у концентрації, яка є достатньою для підтримання стійкості інтерферону впродовж необхідного періоду зберігання (наприклад, від 12 місяців до 24 місяців), а також у концентрації, яка є достатньою для запобігання втратам білка унаслідок адсорбції на поверхнях, наприклад, флакона, ампули, капсули або шприца.

За варіантом, якому віддають перевагу, концентрація плуронік, зокрема плуронік F68, у рідких композиціях становить від або приблизно від 0,01 мг/мл до або приблизно до 10 мг/мл, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, від або приблизно від 0,05 мг/мл до або приблизно до 5 мг/мл, за варіантом, якому віддають значно більшу перевагу, від або приблизно від 0,1 мг/мл до або приблизно до 2 мг/мл, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, вона дорівнює або приблизно дорівнює 1 мг/мл.

Концентрація IFN-бета у композиції, за варіантом, якому віддають перевагу, становить від або приблизно від 10 мкг/мл до або приблизно до 800 мкг/мл, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, від або приблизно від 20 мкг/мл до або приблизно до 500 мкг/мл, за варіантом, якому віддають значно більшу перевагу, від або приблизно від 30 мкг/мл до або приблизно до 300 мкг/мл, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, вона дорівнює або приблизно дорівнює 22 мкг/мл, 44 мкг/мл, 88 мкг/мл або 264 мкг/мл.

pH композицій за цим винаходом, за варіантом, якому віддають перевагу, знаходиться у межах приблизно від 3,0 до або приблизно до 5,0, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, pH дорівнює або приблизно дорівнює 3,7 або 4,7. Буфером, якому віддають перевагу, є ацетат, проти-

онами, яким віддають перевагу, є іони натрію або калію. Ацетатно-сольові буфери є добре відомими у цій галузі. Концентрації буфера у загальному об'ємі розчину можуть змінюватись і дорівнювати або приблизно дорівнювати 5 mM, 9,5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM і 500 mM. За варіантом, якому віддають перевагу, концентрація буфера дорівнює або приблизно дорівнює 10 mM. За варіантом, якому віддають особливу перевагу, концентрація буфера становить 10 mM у ацетатних іонах при pH 3,5±0,2 або 4,5±0,2.

У композиції за цим винаходом, за варіантом, якому віддають перевагу, антиоксидант, наприклад, метіонін, є присутнім у концентрації від або приблизно від 0,01 мг/мл до або приблизно до 5,0 мг/мл, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, від або приблизно від 0,05 мг/мл до або приблизно до 0,3 мг/мл, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, вона дорівнює або приблизно дорівнює 0,1 мг/мл.

Концентрація ізотонічного агента (наприклад, маніту) у рідких композиціях, за варіантом, якому віддають перевагу, становить від або приблизно від 0,5 мг/мл до або приблизно до 500 мг/мл, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, від або приблизно від 1 мг/мл до або приблизно до 250 мг/мл, за варіантом, якому віддають значно більшу перевагу, від або приблизно від 10 мг/мл до або приблизно до 100 мг/мл, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, вона дорівнює або приблизно дорівнює 55 мг/мл.

Цей винахід включає рідкі композиції. Розчинником, якому віддають перевагу, є вода для ін'єкцій.

Рідкі композиції можуть бути однодозовими або багатовдозовими. Згадані рідкі композиції інтерферону за цим винаходом, які є призначеними для багатовдозового застосування, за варіантом, якому віддають перевагу, містять бактеріостатичний препарат, наприклад, фенол, m-крезол, p-крезол, o-крезол, хлоркрезол, бензиловий спирт, алкілпарабен (метил, етил, пропіл, бутіл тощо), бензалконію хлорид, бензетонію хлорид, натрію дигідроацетат і тимеросал. Особливу перевагу віддають фенолу, бензиловому спирту і m-крезолу, більшу перевагу віддають бензиловому спирту. Згаданий бактеріостатичний препарат застосовують у кількості, яка забезпечує концентрацію, що є ефективною для підтримання згаданої композиції по суті вільною від бактерій (придатною для ін'єкцій) впродовж періоду введення багатовдозових ін'єкцій тривалістю від або приблизно від 12 год. або 24 год. до або приблизно до 12 днів, за варіантом, якому віддають перевагу, від або приблизно від 6 днів до або приблизно до 12 днів. Концентрація бактеріостатичного препарату, за варіантом, якому віддають перевагу, становить від або приблизно від 0,1 % (маса бактеріостатичного препарату/маса розчинника) до або приблизно до 2,0 %, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, від або приблизно від 0,2 % до або приблизно до 1,0 %. У разі бензилового спирту, особливу перевагу віддають концентраціям 0,2 % або 0,3 %. Однак застосування консерванта, наприклад, бензилового спирту, не обмежується багатовдозовими

композиціями, але він може додаватись також до одноклизових композицій.

Кількість інтерферону у композиціях за цим винаходом забезпечує після відновлення одержання концентрацій від приблизно 1,0 мкг/мл до приблизно 50 мкг/мл, хоча придатними є більш низькі і більш високі концентрації, що залежить від передбачуваного носія для спрямованої доставки, наприклад, розчинні композиції будуть відрізнятися від композицій, призначених для доставки за допомогою черезшкірного пластиру, легеневого, трансмукозного шляхами або за допомогою осмотичного чи мікронасоса. Концентрація інтерферону, за варіантом, якому віддають перевагу, становить від або приблизно від 5,0 мкг/мл до або приблизно до 2 мкг/мл, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, від або приблизно від 10 мкг/мл до або приблизно до 1 мкг/мл, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, від або приблизно від 30 мкг/мл до або приблизно до 100 мкг/мл.

За варіантом, якому віддають перевагу, активність інтерферону у композиціях за цим винаходом під час фасування зберігається щонайменше на рівні або приблизно на рівні 60 %, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щонайменше на рівні або приблизно на рівні 70 %, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, щонайменше на рівні або приблизно на рівні 80 % впродовж 24 міс.

За додатковим варіантом здійснення, якому віддають перевагу, цей винахід пропонує спосіб виготовлення рідкої фармацевтичної композиції, як описувалось вище.

За ще одним варіантом здійснення, якому віддають перевагу, цей винахід пропонує спосіб виготовлення фасованої фармацевтичної композиції, що включає фасування розчину, що містить активний інгредієнт і наповнювачі, як описувалось вище.

За ще одним варіантом здійснення, якому віддають перевагу, цей винахід пропонує готовий виріб для людського фармацевтичного застосування; що включає флакон, який містить фармацевтичні композиції, як; описувалось вище, і письмовий матеріал, у якому вказується, що такий розчин може зберігатись після першого застосування впродовж періоду часу, що дорівнює або приблизно дорівнює двадцяти чотирьом годинам або більше. За варіантом, якому віддають перевагу, письмовий матеріал вказує, що такий розчин може зберігатись впродовж періоду часу, що дорівнює або приблизно дорівнює 12 дням.

Після першого застосування багатодозової композиції, вона може зберігатись і застосовуватись щонайменше впродовж або приблизно впродовж 24 год., за варіантом, якому віддають перевагу, щонайменше впродовж або приблизно впродовж 4 днів, 5 днів або 6 днів, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, впродовж періоду часу тривалістю до 12 днів. Після першого застосування композицію, за варіантом, якому віддають перевагу, зберігають при температурі нижче кімнатної (тобто нижче або приблизно нижче 25 °C), за варіантом, якому віддають більшу перевагу, нижче або приблизно нижче 10 °C, за варіан-

том, якому віддають більшу перевагу, нижче або приблизно нижче 2-8 °C, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, нижче або приблизно нижче 4-6 °C

Композиції за цим винаходом можна одержати способом, який включає додання визначеної кількості наповнювачів до забуференого розчину, з подальшим доданням інтерферону.

Після цього одержаний розчин фасують у флакони, ампули або капсули. Пересічним фахівцем у цій галузі можуть бути визначені варіанти цього процесу. Наприклад, порядок, у якому додаються компоненти, чи застосовуються додаткові добавки, температура і рН, при яких одержують композицію, усе це є факторами, які можуть оптимізуватись відносно концентрації та застосованих засобів введення.

У разі композицій для багатодозового застосування, бактеріостатичний препарат може додаватись до розчину, що містить активний інгредієнт (інтерферон) або, за альтернативним варіантом, він може зберігатись у окремому флаконі або капсулі з подальшим змішуванням з розчином, що містить активний інгредієнт, у момент застосування.

Композиції, за цим винаходом можуть вводиться за допомогою визначених засобів. Прикладами таких одноампульних систем є автоматичні ін'єктори або шприци-ін'єктори для спрямованої доставки розчину, наприклад, Rebiject®.

Продукти, що заявляються у пунктах формули цього винаходу, включають пакувальний матеріал. Пакувальний матеріал, окрім інформації, яка вимагається органами державного регулювання, забезпечує умови, за яких згаданий продукт може застосовуватись. Пакувальний матеріал за цим винаходом, у разі продукту, розфасованого у двох флаконах (вологий/сухий), надає хворому, у разі необхідності, інструкції щодо одержання розчину і застосування такого готового розчину впродовж періоду часу тривалістю двадцять чотири години або більше. У разі розфасованого до одного флакона розчинного продукту, етикетка вказує, що такий розчин може застосовуватись впродовж періоду часу тривалістю двадцять чотири години або більше. Продукти, що заявляються у пунктах формули цього винаходу, є придатними для фармацевтичного застосування для людини.

Стійкі консервовані композиції можуть надаватись хворим у вигляді прозорих розчинів. Згаданий розчин може призначатись для одноразового застосування або може застосовуватись декілька разів, і його може вистачити для одного або декількох циклів лікування хворого і, таким чином, цей розчин надає можливість застосування більш зручної схеми лікування, аніж та, що є доступною на цей час.

Інтерферон у формі стійких або консервованих композицій або розчинів, опис яких наведено, може вводиться хворому за цим винаходом різними способами шляхом спрямованої доставки, у тому числі шляхом підшкірної або внутрішньом'язової ін'єкції; черезшкірним, легневим, трансмукозним шляхом, шляхом імплантації, за допомогою осмотичного насоса, капсули, мікронасоса, перораль-

ним шляхом або іншими засобами, які визначаються досвідченим фахівцем як добре відомі у цій галузі.

Термін "флакон" означає, у широкому значенні, резервуар, придатний для утримування інтерферону у твердій або рідкій формі у фасованому стерильному стані. Прикладами флакона, за цим описом, є ампули, капсули, витяжні прозорі упаковки або інший подібний резервуар, придатний для спрямованої доставки інтерферону хворому за допомогою шприца, насоса (у тому числі осмотичного), катетера, черезшкірного пластиру, легеневого або трансмукозного спрею. Флакони, придатні для фасування продуктів для парентерального, легеневого, трансмукозного або черезшкірного введення, є добре відомими і загальноновизнаними у цій галузі.

Термін "лікування" у контексті цього винаходу означає будь-який сприятливий ефект на розвиток хвороби, у тому числі послаблення, зменшення, зниження або полегшення патологічного розвитку після початку хвороби.

Фармацевтичні композиції за цим винаходом, що містять IFN або ізоформу, мутеїн, гібридний білок, функціональну похідну, активну фракцію або сіль, є придатними для діагностування, запобігання або лікування (місцевого або системного) клінічних показань, що реагують на лікування цим поліпептидом. Такі клінічні показання включають, наприклад, розлади або хвороби центральної нервової системи (ЦНС), головного мозку та/або спинного мозку, у тому числі, розсіяний склероз; автоімунні захворювання, у тому числі, ревматоїдний артрит, псоріаз, хворобу Крона; і рак, у тому числі рак молочної залози, передміхурової залози, сечового міхура, нирок і товстої кишки.

До цього опису шляхом посилання у повному обсязі включені усі посилання, наведені у цьому описі, у тому числі журнальні статті або реферати, опубліковані або неопубліковані американські або іноземні заявки на патенти, видані американські або іноземні патенти або будь-які інші посилання, у тому числі усі дані, таблиці, фігури і текст, подані у наведених посиланнях. Окрім того, до цього опису у повному обсязі включено шляхом посилання повний зміст посилань, які наводяться у наведених у цьому описі посиланнях.

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 далі опис конкретних варіантів здійснення цього винаходу з такою повнотою розкриє загальну природу винаходу, що інші зможуть, вживши знань у межах цієї галузі (з включенням змісту посилань, що згадувались у цьому описі), легко модифікувати та/або адаптувати для різних варіантів застосування такі конкретні варіанти здійснення без зайвого експериментування і без відхилення від загальної концепції цього винаходу. Таким чином, вважається, що усі подібні адаптації та модифікації входять до діапазону еквівалентів розкритих варіантів здійснення, виходячи з розк-

риття та методичних вказівок, наведених у описі. Слід розуміти, що фразеологія або термінологія, вжита у цьому описі, призначена для опису, а не для обмеження, завдяки чому термінологія або фразеологія цього опису повинна тлумачитись досвідченим фахівцем у світлі розкриття та методичних вказівок, наведених у цьому описі, у поєднанні зі знаннями пересічного фахівця у цій галузі.

ОПИС ФІГУР

На Фіг. 1 вказано відсоток окиснених форм, присутніх у багатодозових композиціях інтерферону бета-1а з різними концентраціями бензилового спирту після зберігання при температурі 40 °C.

На Фіг. 2 вказано відсоток окиснених форм, присутніх у багатодозових композиціях інтерферону бета-1а з різними концентраціями бензилового спирту після зберігання при температурі 25 °C.

На Фіг. 3 вказано відсоток окиснених форм, присутніх у багатодозових композиціях інтерферону бета-1а з різними концентраціями бензилового спирту після зберігання при температурі 2-8 °C.

На Фіг. 4 вказано відсоток загального об'єму агрегатів, присутніх у багатодозових композиціях інтерферону бета-1а з різними концентраціями бензилового спирту після зберігання при температурі 40 °C.

На Фіг. 5 вказано відсоток загального об'єму агрегатів, присутніх у багатодозових композиціях інтерферону бета-1а з різними концентраціями бензилового спирту після зберігання при температурі 25 °C.

На Фіг. 6 вказано відсоток загального об'єму агрегатів, присутніх у багатодозових композиціях інтерферону бета-1а з різними концентраціями бензилового спирту після зберігання при температурі 2-8 °C.

На Фіг. 7 вказано відсоток окиснених форм, присутніх у багатодозових композиціях інтерферону бета-1а з різними бактеріостатичними препаратами після зберігання при температурі 25 °C.

На Фіг. 8 вказано відсоток окиснених форм, присутніх у багатодозових композиціях інтерферону бета-1а з різними бактеріостатичними препаратами після зберігання при температурі 2-8 °C.

На Фіг. 9 вказано відсоток загального об'єму агрегатів, присутніх у багатодозових композиціях інтерферону бета-1а з різними бактеріостатичними препаратами.

На Фіг. 10 вказано відсоток окиснених форм, присутніх у багатодозових композиціях інтерферону бета-1а з EDTA після зберігання при температурі 25 °C.

На Фіг. 11 вказано відсоток загального об'єму агрегатів, присутніх у багатодозових композиціях інтерферону бета-1а з EDTA після зберігання при температурі 25 °C.

На Фіг. 12 показано ефективність 0,012% L-метіоніну як антиоксиданта (при температурі 2-8 °C).

На Фіг. 13 показано ефективність 0,012 % L-метіоніну як антиоксиданта (при температурі 25±2 °C).

Приклади

Приклад 1 - Рідка односторова композиція інтерферону бета-1а без HSA у попередньо заповне-

них шприцах

1.1 Попередні дослідження сумісності

Попередні експерименти здійснювали для перевірки захисного ефекту, що демонструється деякими наповнювачами, наприклад антиоксидантом і поверхнево-активними речовинами, оскільки очікувалось, що видалення людського сироваткового альбуміну (HSA) з існуючого продукту може вплинути на згаданий продукт із точки зору окиснення, утворення агрегатів і адсорбції на поверхнях.

Інтерферон бета-1а вводили до складу композиції з концентраціями 44 мкг/мл і 88 мкг/мл у натріацетатному буфері, що містив 54,6 мг/мл маніту у комбінації з декількома наповнювачами, наприклад, 0,4 % HSA, 0,012 % L-метіоніну, твін 20 (0,005 %, 0,007 %, 0,01 %), полоксамер 188 (0,05 %, 0,1 %, 0,5 %). Різні комбінації піддавали дії стресових умов (зберігання при температурі 40 °C або інтенсивне перемішування) і перевіряли на ступінь окиснення (RP-HPLC) і утворення агрегатів (SE-HPLC (гель-хроматографія)).

Таблиці DEP-1 і DEP-2 підсумовують рівні окиснення і утворення агрегатів після 2 тижнів зберігання при температурі 40 °C. Наслідком комбінування інтерферону бета-1а з обома випробуваними поверхнево-активними речовинами (твін 20 і полоксамер 188) виявилось підвищення рівня окиснення, який, для кожного типу поверхнево-активної речовини, є залежним від концентрації (Таблиця DEP-1, комбінації № 4-6 і № 7-9); при 0,5 % рівні полоксамеру 188 (який згадується також як плуронік F-68 або F-68) лікарська речовина повністю розкладається (Таблиця DEP-1, № 9). Підвищений рівень розкладання спостерігається у разі твін 20, як очікувалось, унаслідок окиснювальних різновидів (наприклад, пероксидів), що можуть бути присутніми, як залишки після синтезу.

Обидві поверхнево-активні речовини при різних перевірених концентраціях не впливають на рівень утворення агрегатів при зберіганні при температурі 40 °C (Таблиця DEP-2).

Таблиця DEP-1

Окиснені форми (%) за даними RP-HPLC після зберігання при температурі 40 °C

		T=0	2 тижні
№ 1	IFN 44 мкг	3,0	6,5
№ 2	IFN 44 мкг + 0,4 % HSA (існуючий продукт)	2,4	5,5
№ 3	IFN 44 мкг + 0,012 % L-Met	3,9	6,2
№ 4	IFN 44 мкг	3,5	6,0
№ 5	IFN 44 мкг	3,4	7,0
№ 6	IFN 44 мкг	3,5	8,7
№ 7	IFN 44 мкг	3,5	6,9
№ 8	IFN 44 мкг	3,3	8,0
№ 9	IFN 44 мкг	3,6	n.m.
№ 10	IFN 44 мкг + 0,012 % L-Met + 0,007% Твін-20	3,5	6,9
№ 11	IFN 44 мкг + 0,012 % L-Met + 0,1 F-68	3,5	7,6

n.m. = не визначалось унаслідок повного розкладу

Таблиця DEP-2

Загальний об'єм агрегатів (%) за даними SE-HPLC після зберігання при температурі 40 °C

		T=0	2 тижні
№ 1	IFN 44 мкг	2,6	2,8
№ 4	IFN 44 мкг	2,4	2,1
№ 5	IFN 44 мкг	2,8	2,0
№ 6	IFN 44 мкг	2,6	2,0
№ 7	IFN 44 мкг	2,5	2,9
№ 8	IFN 44 мкг	2,5	2,5
№ 9	IFN 44 мкг	2,6	2,9

Таблиця DEP-3 показує, що обидві поверхнево-активні речовини, твін 20 і полоксамер 188 (F-68), застосовані з критичною концентрацією міце-

лоутворення (CMC), допомагають запобігти агрегуванню, що індукується інтенсивним перемішуванням впродовж 5 хв.

Таблиця DEP-3

Загальний об'єм агрегатів (%) за даними SE-HPLC після 5 хв. інтенсивного перемішування

		T=0	Інтенсивне перемішування впродовж 5 хв.
№ 1	IFN 44 мкг	1,6	2,5
№ 3	IFN 44 мкг + 0,012 % L-Met	1,4	2,4
№ 10	IFN 44 мкг + 0,012 % L-Met + 0,007% Твін-20	1,4	1,3
№ 11	IFN 44 мкг + 0,012 % L-Met + 0,1 F-68	1,3	1,3

1.1.1 Фізико-хімічні характеристики

Фізико-хімічними характеристиками, які, як відомо, є критичними для якості лікарського продукту, є ступінь окиснення і вміст димерів/агрегатів. Ці характеристики розглядалися при проведенні досліджень на сумісність, підсумованих вище.

1.2 Наповнювачі

1.2.1 10 мМ натрійацетатний буфер, pH 3,5

10 мМ натрійацетатний буфер (pH 3,5), що містить 54,6 мг/мл маніту як ізотонічний агент, стабілізує продукт, як було показано під час проведення попередньої розробки існуючого ринкового продукту (Rebif®) і як описано у EP 759775.

1.2.2 Полоксамер 188

Полоксамер 188 (або плуоронік F-68) включають до складу композиції у об'ємі 0,1 % (критична концентрація міцелуотворення) для запобігання адсорбції лікарської речовини на поверхні контейнерів під час процесу виробництва; більш високі концентрації можуть негативно вплинути на стійкість продукту (підвищений ступінь окиснення); більш низькі концентрації можуть бути менш ефективними при обмеженні ступеня адсорбції.

Ефективність полоксамеру 188 щодо запобігання адсорбції лікарської речовини під час процесу виробництва була продемонстрована таким дослідженням: розчини, що містили 44 мкг/мл інтерферону бета-1а, об'єднували з поверхнево-активною речовиною (твін 20, полоксамер 188, HSA) з 3 різними концентраціями, імітуючи процес виробництва; зразки відбирали на різних стадіях (змішування, асептична фільтрація, заповнення) і випробували засобами кількісної RP-HPLC.

Відбирали такі зразки:

- перед фільтрацією (BF)
- після першої фільтрації (AF1)
- після другої фільтрації (AF2)
- після заповнення (готовий продукт у T=0)

Результати наведені у Таблиці DEP-4 у вигляді відношення рівень відновлення (%)/вихідне значення (тобто змішаний розчин перед фільтрацією): полоксамер 188 є ефективнішим за твін 20, і має таку саму ефективність, що і HSA відносно запобігання адсорбції лікарської речовини під час виготовлення.

Таблиця DEP-4

Процент відновлення інтерферону бета-1а під час виготовлення

	Без HSA/без поверхнево-активної речовини	HSA	0,003 % твін 20	0,007 % твін 20	0,02 % твін 20	0,05 % F-68	0,1 % F-68	0,2 % F-68
AF1	97,8	97,5	98,2	97,7	99,1	98,3	98,6	98,9
AF2	94,5	97,3	96,3	96,6	97,6	97,0	98,4	98,3
T=0	93,8	96,9	95,8	95,7	96,3	96,5	97,0	98,0

Полоксамер 188 різного ступеня чистоти, одержаний від різних постачальників, досліджували на вміст продуктів окиснення у разі прискорених умов випробування (2 тижні при температурі 40 °C) для визначення якості продукту для застосування: ви-

брали полоксамер 188 від фірми BASF, оскільки він мав більш низький рівень окиснення і постачається як реактив фармацевтичної чистоти. Результати підсумовані у Таблиці DEP-5:

Таблиця DEP-5

Процент окиснених форм, виявлений у композиціях, що містять 0,1 % полоксамеру 188 (різна якість, від різних постачальників)

Постачальник	Якість	T=0	1 тиждень при температурі 40 °C	2 тижні при температурі 40 °C
BASF	Фармацевтична чистота	2,6	-	3,2
Fluka	Для газової хроматографії	-	3,8	4,7
Sigma	Для біохімічних досліджень	-	3,2	4,4

1.2.3 L-метіонін

L-метіонін (L-Met) включають до складу композиції у об'ємі 0,012 % для обмеження окиснення. Ефективність цієї концентрації показують шляхом порівняння з композицією, що не містить L-

метіоніну; більш високі концентрації (0,05 %, 0,1 %) L-метіоніну показують порівнянний ефект відносно стійкості. Продукти окиснення, виявлені при зберіганні при температурі 40 °C, наведені у Таблиці DEP-6.

Таблиця DEP-6

% окиснених форм у композиціях інтерферону бета-1а, що містять різні рівні L-метіоніну (L-Met)

	T=0	1 тиждень при температурі 40 °C	3-4 тижні при температурі 40 °C
IFN β -1а 44 мкг	2,8	3,8	7,6
IFN β -1а 44 мкг + 0,012 % L-Met	-	2,9	5,3
IFN β -1а 44 мкг + 0,05 % L-Met	-	3,0	5,1
IFN β -1а 44 мкг + 0,1 % L-Met	-	2,6	5,0

Під час розробки композиції, ефективність L-метіоніну, як антиоксиданта, була підтверджена даними 3 місяців випробувань стійкості при температурі 2-8 °C і 25±2 °C, які були одержані з композиціями, що містили L-метіонін у комбінації з поверхнево-активними речовинами: L-метіонін є ефективним як антиоксидант при рівні 0,012 % і може гарантувати стійкість, порівнянну зі стійкістю, що спостерігається у існуючого продукту (див. Фіг. 12 і Фіг. 13).

1.3 Лікарський продукт

1.3.1 Розробка композицій

Розробка нової композиції інтерферону бета-1а без HAS була зосереджена на підтвердженні результатів попередніх досліджень (ефективність

L-метіоніну як антиоксиданта, включення полксамеру 188 для запобігання втратам під час виготовлення) у кінцевому контейнері.

Одержали розчини інтерферону бета-1а (44 мкг/мл і 88 мкг/мл), що містили 54,6 мкг/мл маніту у 10 мМ натріяцетатному буфері (pH 3,5), і до їх складу ввели такі наповнювачі:

- Твін 20 (0,003 %, 0,007 %, 0,02 %)
- Полксамер 188 (0,05 %, 0,1 %, 0,2 %)
- L-метіонін (0 %, 0,012 %)
- HSA (0,4 %, існуюча композиція, що позначається як "ref")

Склад композицій, що піддавались випробуванням, наведено у Таблиці DEP-7.

Таблиця DEP-7

Склад композицій, що містять інтерферон бета-1а

Композиція	IFN- β -1а (мкг)	Маніт (мг)	Твін 20 (мг)	Полксамер 188 (мг)	HSA (мг)	L-метіонін (мг)	10 мМ ацетатний буфер (pH 3,5)
IFN-1	44	54,6	0,03	-	-	-	Достатня кількість до 1 мл
IFN-2	44	54,6	0,07	-	-	-	Достатня кількість до 1 мл
IFN-3	44	54,6	0,2	-	-	-	Достатня кількість до 1 мл
IFN-4	44	54,6	-	0,5	-	-	Достатня кількість до 1 мл
IFN-5	44	54,6	-	1	-	-	Достатня кількість до 1 мл
IFN-6	44	54,6	-	2	-	-	Достатня кількість до 1 мл
IFN-7(ref)	44	54,6	-	-	4	-	Достатня кількість до 1 мл
IFN-8	44	54,6	-	-	-	-	Достатня кількість до 1 мл
IFN-9	44	54,6	0,2	-	-	0,12	Достатня кількість до 1 мл
IFN-10	44	54,6	-	2	-	0,12	Достатня кількість до 1 мл
IFN-11	88	54,6	-	1	-	0,12	Достатня кількість до 1 мл

Методика виготовлення композицій наведена нижче:

90 мл кожної композиції виготовляли за асептичних умов шляхом змішування необхідної кількості наповнювачів, розчинених у воді для ін'єкцій (WFI) з лікарською речовиною (інтерферон бета-1а); після цього композиції фільтрували через 0,22 мкм мембрану (фільтрували двічі через два мембранні фільтри), і 0,5 мл кожного розчину залива-

ли до 1 мл скляних шприців Нурак. Розмір партії становив приблизно 180 шприців.

Після цього композиції зберігали при температурі 2-8 °C, 25±2 °C і 40±2 °C з подальшим випробуванням стійкості тривалістю до 12 тижнів (до 6 тижнів у разі зразків, що зберігались при температурі 40±2 °C).

Під час розробки вдавались до таких аналітичних тестів та методів (докладніше щодо цих ана-

лізів дивись Приклад 2):

- біологічна активність (біологічний аналіз цитопатичного ефекту (CPE));
- аналіз (RP-HPLC);
- продукти окиснення (RP-HPLC);
- димери/агрегати (SE-HPLC і SDS-PAGE (еле-

ктрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію));

- рН (потенціометричний метод);
- осмотичний тиск (кріоскопічне вимірювання).

Результати та їх оцінка підсумовані у Таблицях DEP-8-DEP-17.

Таблиця DEP-8

Біоідентичність (млн. МОд/мл)

2-8 °C					
	Час 0	4 тижні	8 тижнів	12 тижнів	
IFN-1	11,7	12,4	11,6	11,0	
IFN-2	11,5	12,1	11,9	11,1	
IFN-3	11,3	10,0	9,9	9,7	
IFN-4	11,8	11,8	12,4	11,1	
IFN-5	12,1	12,3	12,6	11,6	
2-8 °C					
IFN-6	12,1	12,2	11,4	10,7	
IFN-7	12,1	12,4	12,6	11,1	
IFN-8	11,2	11,4	11,5	10,8	
IFN-9	11,2	12,4	12,7	11,9	
IFN-10	12,0	13,0	12,4	11,6	
25 °C					
	Час 0	2 тижні	4 тижні	8 тижнів	12 тижнів
IFN-1	11,7	11,2	11,5	11,0	10,7
IFN-2	11,5	11,8	11,3	11,1	10,7
IFN-3	11,3	10,7	10,6	10,4	8,9
IFN-4	11,8	10,8	11,8	12,2	11,6
IFN-5	12,1	12,3	12,5	12,0	10,9
IFN-6	12,1	12,9	12,0	11,5	10,5
IFN-7	12,1	11,2	12,7	12,8	11,3
IFN-8	11,2	11,1	11,5	11,6	10,9
IFN-9	11,2	11,0	12,1	11,5	10,9
IFN-10	12,0	11,7	11,8	12,5	11,6
40 °C					
	Час 0	2 тижні	4 тижні	6 тижнів	
IFN-1	11,7	9,4	9,4	9,6	
IFN-2	11,5	10,0	9,7	9,6	
IFN-3	11,3	7,8	7,2	6,0	
IFN-4	11,8	10,9	11,4	13,0	
IFN-5	12,1	12,1	13,1	12,1	
IFN-6	12,1	11,6	12,7	11,4	
IFN-7	12,1	11,0	12,2	12,0	
IFN-8	11,2	11,0	11,6	12,0	
IFN-9	11,2	10,1	9,1	7,1	
IFN-10	12,0	12,3	12,0	11,0	

Криві, обчислені шляхом лінійного регресійного аналізу і підсумовані у Таблиці DEP-9, показують зниження біологічної активності усіх композицій, що містять твін 20 (№ 1, № 2, № 3, № 9) і які зберігались при температурі 40 °C; зниження біо-

логічної активності спостерігалось також у композицій № 3 і № 6 (найвища концентрація поверхнево-активних речовин) після зберігання при температурі 25 °C і 2-8 °C.

Таблиця DEP-9

Лінійний регресійний аналіз біоідентичності (нахил кривих у млн. МОд/мл x тиждень)

	IFN-1	IFN-2	IFN-3	IFN-4	IFN-5	IFN-6	IFN-7	IFN-8	IFN-9	IFN-10
2-8 °C	-0,07	-0,04	-0,12	-0,04	-0,03	-0,13	-0,06	-0,03	0,06	-0,06
25 °C	-0,08	-0,08	-0,17	0,03	-0,10	-0,17	-0,02	-0,01	-0,02	0,00
40 °C	-0,32	-0,29	-0,83	0,20	0,05	-0,05	0,06	0,16	-0,67	-0,17

Таблиця DEP-10

Аналіз (мкг/шприц) засобами RP-HPLC

2-8 °C					
	Час 0	4 тижні	8 тижнів	12 тижнів	
IFN-1	23,4	21,5	22,8	21,2	
IFN-2	22,9	21,4	22,2	21,1	
IFN-3	22,4	20,8	20,8	20,2	
IFN-4	22,9	22,4	23,1	21,2	
IFN-5	23,6	23,3	21,7	22,2	
IFN-6	23,1	21,4	22,9	21,2	
IFN-7	23,0	22,8	23,4	22,0	
IFN-8	21,2	20,0	23,5	20,0	
IFN-9	23,0	21,7	21,6	22,1	
IFN-10	22,8	22,6	22,7	23,2	
IFN-11	45,6	43,9	44,3	44,7	
25 °C					
	Час 0	2 тижні	4 тижні	8 тижнів	12 тижнів
IFN-1	23,4	20,5	20,7	20,7	20,1
IFN-2	22,9	21,2	19,8	20,8	19,7
IFN-3	22,4	19,9	19,1	17,6	16,6
IFN-4	22,9	21,5	22,2	22,5	21,1
IFN-5	23,6	23,4	23,0	23,6	21,4
IFN-6	23,1	22,6	20,7	22,0	20,5
IFN-7	23,0	23,1	22,9	23,2	22,6
IFN-8	21,2	20,8	19,8	20,8	19,7
IFN-9	23,0	20,5	20,2	18,2	18,6
IFN-10	22,8	22,2	22,6	22,0	22,3
IFN-11	45,6	45,2	44,6	43,4	44,8
40 °C					
	Час 0	2 тижні	4 тижні	6 тижнів	
IFN-1	23,4	18,8	17,8	16,6	
IFN-2	22,9	18,5	16,2	15,4	
IFN-3	22,4	15,1	11,2	10,4	
IFN-4	22,9	20,1	19,8	18,7	
IFN-5	23,6	21,8	21,0	19,6	
IFN-6	23,1	20,7	18,8	18,7	
IFN-7	23,0	20,6	18,8	16,7	
IFN-8	21,2	19,6	18,3	18,1	
IFN-9	23,0	16,8	12,7	13,1	
IFN-10	22,8	20,5	19,8	19,9	
IFN-11	45,6	43,4	41,5	40,1	

Криві, обчислені шляхом лінійного регресійного аналізу і підсумовані у Таблиці DEP-11, показують більш високу втрату вмісту білка для компози-

цій, що містять твін 20 (№ 1, 2, 3, 9) і які зберігались при температурі 40 °C; така сама тенденція спостерігається при температурі 25 °C, а також у

разі композицій № 5 і № 6. Значне зменшення вмісту білка відбувається при температурі 2-8 °C у

композицій № 1, № 2, № 3 (з твін 20), № 4, № 5 (з полоксамером 188) і № 9 (з твін 20 і L-метіоніном).

Таблиця DEP-11

Лінійний регресійний аналіз даних аналізу засобами RP-HPLC (нахил кривих у мкг/шприц х тиждень)

	IFN-1	IFN-2	IFN-3	IFN-4	IFN-5	IFN-6	IFN-7	IFN-8	IFN-9	IFN-10	IFN-11
2-8 °C	-0,13	-0,11	-0,16	-0,11	-0,14	-0,11	-0,06	0,00	-0,07	0,03	-0,06
25 °C	-0,19	-0,20	-0,44	-0,09	-0,15	-0,18	-0,03	-0,09	-0,34	-0,04	-0,10
40 °C	-1,10	-1,20	-2,00	-0,64	-0,64	-0,76	-1,00	-0,53	-1,70	-0,47	-0,92

Таблиця DEP-12

Процент окиснених форм за даними RP-HPLC

2-8 °C					
	Час 0	4 тижні	8 тижнів	12 тижнів	
IFN-1	2,8	2,8	3,3	3,4	
IFN-2	2,5	2,9	3,4	3,4	
IFN-3	2,7	3,0	4,2	4,5	
IFN-4	2,6	2,6	3,6	3,2	
IFN-5	2,8	2,8	3,6	3,2	
IFN-6	2,5	3,1	4,5	4,4	
IFN-7	1,5	1,5	1,7	1,3	
IFN-8	2,8	2,9	3,2	3,1	
IFN-9	3,3	3,4	3,4	3,6	
IFN-10	3,0	3,2	3,0	3,0	
IFN-11	2,6	2,9	2,9	2,9	
25 °C					
	Час 0	2 тижні	4 тижні	8 тижнів	12 тижнів
IFN-1	2,8	3,0	3,1	4,2	4,3
IFN-2	2,5	3,0	3,1	3,4	4,6
IFN-3	2,7	3,5	3,9	6,7	6,8
IFN-4	2,6	3,0	3,1	4,7	4,8
IFN-5	2,8	3,0	3,1	4,4	4,5
IFN-6	2,5	3,0	3,2	5,3	5,7
IFN-7	1,5	1,7	1,9	2,0	2,3
IFN-8	2,8	3,1	2,9	4,1	4,3
IFN-9	3,3	3,4	3,5	3,9	4,4
IFN-10	3,0	3,0	3,2	3,3	3,5
IFN-11	2,6	2,8	3,1	3,2	3,4
40 °C					
	Час 0	2 тижні	4 тижні	6 тижнів	
IFN-1	2,8	6,0	8,3	12,4	
IFN-2	2,5	3,7	8,7	10,7	
IFN-3	2,7	8,8	12,3	16,9	
IFN-4	2,6	4,1	6,7	10,3	
IFN-5	2,8	3,7	7,2	9,6	
IFN-6	2,5	4,9	7,6	13,3	
IFN-7	1,5	2,8	3,9	11,8	
IFN-8	2,8	3,8	7,6	10,7	
IFN-9	3,3	5,7	8,6	12,8	
IFN-10	3,0	3,6	9,3	9,7	
IFN-11	2,6	3,2	5,3	6,8	

Криві, обчислені шляхом лінійного регресійного аналізу і підсумовані у Таблиці DEP-13, показують, що композиції, які містять твін 20, мають більш високу швидкість окиснення у разі їх порівняння з композиціями, які містять полоксамер 188, і рівень окиснення, залежний від концентрації твін 20.

Ефективність L-метіоніну щодо обмеження окиснення при різних перевірених температурах також показана шляхом порівняння композиції № 9 (твін 20+L-метіонін) з композицією № 3 (твін 20) і композиції № 10 (полоксамер 188+L-метіонін) з композицією № 6 (полоксамер 188).

Таблиця DEP-13

Лінійний регресійний аналіз окиснених форм (нахил кривих у % окиснених форм/тиждень)

	IFN-1	IFN-2	IFN-3	IFN-4	IFN-5	IFN-6	IFN-7	IFN-8	IFN-9	IFN-10	IFN-11
2-8 °C	0,06	0,08	0,17	0,07	0,05	0,17	-0,01	0,03	0,02	0,00	0,02
25 °C	0,14	0,16	0,38	0,21	0,16	0,29	0,06	0,14	0,09	0,04	0,06
40 °C	1,60	1,50	2,30	1,30	1,20	1,80	1,60	1,40	1,60	1,30	0,74

Таблиця DEP-14

Загальний вміст агрегатів (%) за даними SE-HPLC або SDS-PAGE

2-8 °C					
	Час 0	4 тижні	8 тижнів	12 тижнів	
IFN-1	0,8	0,5	0,7	0,5	
IFN-2	0,8	0,4	0,7	0,3	
IFN-3	1,1	0,6	0,9	1,2	
IFN-4	1,2	0,9	1,4	1,7	
IFN-5	1,0	1,4	0,9	1,6	
IFN-6	1,1	1,8	0,9	1,5	
IFN-7*	≤ 3 %	<3 %	<3 %	<4,5 %	
IFN-8	1,2	1,6	1,2	2,0	
IFN-9	1,7	1,4	1,7	1,2	
IFN-10	1,4	1,3	1,3	1,3	
IFN-11	1,4	0,9	0,4	1,7	
25 °C					
	Час 0	2 тижні	4 тижні	8 тижнів	12 тижнів
IFN-1	0,8	0,4	0,2	0,2	0,3
IFN-2	0,8	0,4	0,1	0,3	0,0
IFN-3	1,1	0,6	0,3	0,3	0,5
IFN-4	1,2	1,2	0,6	0,9	0,9
IFN-5	1,0	0,6	0,8	0,4	0,9
IFN-6	1,1	0,7	0,9	0,6	0,8
IFN-7*	≤ 3 %	<3 %	<3 %	<3 %	<4,5 %
IFN-8	1,2	0,8	0,9	0,4	0,9
IFN-9	1,7	0,6	0,9	0,6	0,5
IFN-10	1,4	0,5	0,7	0,5	0,5
IFN-11	1,4	1,1	0,9	0,5	1,4
40 °C					
	Час 0	2 тижні	4 тижні	6 тижнів	
IFN-1	0,8	0,5	0,4	0,9	
IFN-2	0,8	0,6	0,6	0,8	
IFN-3	1,1	0,7	0,5	0,6	
IFN-4	1,2	1,4	0,6	1,1	
IFN-5	1,0	0,9	1,1	1,4	
IFN-6	1,1	1,1	1,2	1,4	
IFN-7*	≤ 3 %	<3 %	<3 %	<4,5 %	
IFN-8	1,2	0,8	0,7	0,6	
IFN-9	1,7	0,8	1,0	0,6	
IFN-10	1,4	0,8	1,4	1,0	
IFN-11	1,4	1,3	1,2	1,8	

* за допомогою SDS-PAGE

Криві, обчислені шляхом лінійного регресійного аналізу і підсумовані у Таблиці DEP-15, показують відсутність значного збільшення загального

вмісту агрегатів після зберігання при різних температурах.

Таблиця DEP-15

Лінійний регресійний аналіз загального вмісту агрегатів (нахил кривих у % загального вмісту агрегатів/тиждень)

	IFN-1	IFN-2	IFN-3	IFN-4	IFN-5	IFN-6	IFN-8	IFN-9	IFN-10	IFN-11
2-8 °C	-0,01	-0,03	0,01	0,04	0,04	0,01	0,05	-0,03	-0,01	0,01
25 °C	-0,04	-0,05	-0,04	-0,03	-0,01	-0,03	-0,03	-0,07	-0,05	-0,01
40 °C	0,01	0,01	-0,09	-0,07	0,07	0,05	-0,10	-0,15	-0,03	0,07

Таблиця DEP-16

Значення pH при температурі 2-8 °C

2-8 °C						
	Час 0	4 тижні	8 тижнів	12 тижнів	24 тижні	104 тижні
IFN-1	3,7	3,7	3,7	3,7	-	-
IFN-2	3,7	3,7	3,7	3,7	-	-
IFN-3	3,7	3,7	3,6	3,6	-	-
IFN-4	3,7	3,8	3,7	3,6	-	-
IFN-5	3,7	3,7	3,7	3,7	-	-
IFN-6	3,6	3,7	3,7	3,7	-	3,7
IFN-7	3,6	3,5	3,6	3,6	-	3,6
IFN-8	3,6	3,6	3,7	3,7	-	3,7
IFN-9	3,6	3,7	3,6	3,7	-	-
IFN-10	3,6	3,7	3,7	3,7	-	3,7
IFN-11	3,5	3,6	3,6	3,6	3,6	-
25 °C						
	Час 0	2 тижні	4 тижні	8 тижнів	12 тижнів	24 тижні
IFN-1	3,7	3,6	3,8	3,6	3,7	-
IFN-2	3,7	3,6	3,8	3,6	3,7	-
IFN-3	3,7	3,6	3,8	3,7	3,7	-
IFN-4	3,7	3,6	3,8	3,7	3,7	-
IFN-5	3,7	3,7	3,6	3,7	3,7	-
IFN-6	3,6	3,7	3,7	3,6	3,7	-
IFN-7	3,6	3,6	3,5	3,6	3,6	-
IFN-8	3,6	3,7	3,6	3,7	3,7	-
IFN-9	3,6	3,7	3,7	3,6	3,6	-
IFN-10	3,6	3,7	3,7	3,7	3,6	-
IFN-11	3,5	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
40°C						
	Час 0	2 тижні	4 тижні	6 тижнів		
IFN-1	3,7	3,6	3,7	3,7		
IFN-2	3,7	3,6	3,7	3,8		
IFN-3	3,7	3,6	3,7	3,8		
IFN-4	3,7	3,6	3,7	3,8		
IFN-5	3,7	3,7	3,6	3,7		
IFN-6	3,6	3,7	3,6	4,0		
IFN-7	3,6	3,6	3,6	3,6		
IFN-8	3,6	3,6	3,7	3,7		
IFN-9	3,6	3,6	3,7	3,7		

IFN-10	3,6	3,7	3,7	3,6		
IFN-11	3,5	3,6	3,5	3,6		

Зсуву pH під час зберігання не спостерігалось.

Таблиця DEP-17

Осмотичний тиск (OSM/kg)

IFN-1	0,348
IFN-2	0,345
IFN-3	0,345
IFN-4	0,346
IFN-5	0,354
IFN-6	0,358
IFN-7	0,399
IFN-8	0,354
IFN-9	0,369
IFN-10	0,366
IFN-11	0,361

Осмотичний тиск перевірених композицій є відповідним.

Виходячи з результатів перевірки розроблених композицій, вибрали таку композицію без HSA:

- Розчин інтерферону бета-1а (44 мкг/мл або 88 мкг/мл) у натрійацетатному буфері (pH 3,5), що містить

- маніт (54,6 мг/мл);
- полоксамер 188 (1 мг/мл);
- L-метіонін (0,12 мг/мл).

1.3.2 Допустимі надлишки

Надлишки не застосовувались.

1.3.3 Фізико-хімічні і біологічні властивості

Ці характеристики розглядались під час досліджень з розробки композицій, як описувалось вище.

1.4 Розробка способу виготовлення

1.4.1 Розробка способу виготовлення

Існуючий спосіб виготовлення був пристосований для одержання лабораторних партій нової композиції: лікарську речовину безпосередньо змішували з інгредієнтами; після цього здійснювали подвійну фільтрацію для імітації промислового способу виготовлення, яким передбачається асептична фільтрація з подальшою фільтрацією перед заповненням шприца. Після цього шприці вручну заповнювали готовим стерильним розчином.

Стадії фільтрації і заповнення шприців здійснювали у шафах із ламінарним потоком повітря.

Нижче наведено опис кожної стадії способу.

1.4.2 Попередні обчислення

Кількість лікарської речовини (інтерферон бета-1а) D (мг), необхідна для одержання розчину з концентрацією 44 мкг/мл:

$$D (\text{мг}) = 44 \text{ мкг/мл} \times 90 \text{ мл} = 3960 \text{ мкг} = 3,96 \text{ мг}$$

Об'єм лікарської речовини (інтерферон бета-1а) B (мл), що відповідає кількості D (мг):

$$B (\text{мл}) = 3,96 \text{ мг} : \text{об'ємний титр (мг/мл)}$$

Об'єм розчину наповнювача V (мл), необхідний для одержання 90 мл розчину з концентрацією 44 мкг/мл:

$$V (\text{мл}) = 90 \text{ мл} - B (\text{мл})^*$$

*(d ≈ 1 г/мл)

1.4.3 Одержання 1 М розчину гідроксиду натрію

Для одержання 1 М розчину гідроксиду натрію використали WFI.

1.4.4 Одержання 0,01 М натрійацетатного буфера (pH 3,5)

Відповідну кількість льодяної оцтової кислоти додавали до WFI і pH доводили до 3,5±0,2 за допомогою 1 М розчину NaOH або 50 % розбавленої оцтової кислоти. Розчин доповнювали WFI до одержання кінцевого об'єму.

1.4.5 Одержання розчину наповнювача

Обчислену кількість наповнювачів (маніт, твін 20, полоксамер 188, L-метіонін) зважували і розчиняли у необхідній кількості 0,01 М натрійацетатного буфері (pH 3,5); після цього перевіряли pH і, у разі потреби, доводили до рівня 3,5±0,2 за допомогою 1 М розчину NaOH або 50 % розбавленої оцтової кислоти; після цього розчин доповнювали 0,01 М натрійацетатним буфером до одержання кінцевої маси.

1.4.6 Змішування розчину лікарської речовини
Необхідну кількість B (г) лікарської речовини (інтерферон бета-1а) додають до необхідної кількості розчину наповнювача V (г), і обережно перемішують до одержання однорідного розчину.

1.4.7 Перша фільтрація розчину лікарської речовини

Після цього змішаний розчин фільтрують через 0,2 мкм нейлонову мембрану (Ultipor N₆₆ 0,2 мкм, Ø 2,5 см, Pall), встановлену у тримачі з нержавіючої сталі у атмосфері азоту (1 бар=0,1 МПа тах), і збирають до скляної хімічної склянки.

1.4.8 Друга фільтрація розчину лікарської речовини

Розчин після першої фільтрації знову фільтрують через нову 0,2 мкм нейлонову мембрану за тих самих умов.

1.4.9 Наповнення шприців

1 мл скляні шприци наповнювали за асептичних умов 0,5 мл готового розчину.

1.4.10 Температура під час процесу

Впродовж усього процесу температуру підтримують із максимальним наближенням до умов охолодження шляхом застосування охолодженої WFI і зберігання розчину наповнювачів і змішаних розчинів при температурі 2-8°C.

Приклад 2 - Рідка багатодозова композиція інтерферону бета-1а без HSA у капсулах, придатна для введення за допомогою автоматичного ін'єктора

Необхідність розробки багатодозового продукту у капсулах виникла під час розробки нової композиції без HSA, що мала на меті видалення HSA з існуючого ринкового продукту у шприцах. Багатодозова композиція підвищила б зручність для хворого завдяки тому, що надавала б можливість самостійного введення за допомогою автоматичного ін'єктора.

Найпоширеніші бактеріостатичні препарати (0,3 % розчин m-крезолу, 0,5 % розчин фенолу і

0,9 % розчин бензилового спирту) спочатку досліджувались у комбінації з активною речовиною і порівнювались з одностововою композицією у шприці, яка була вибрана у рамках розробки одностовової композиції (розчин інтерферону (44 мкг/мл або 88 мкг/мл), маніту (54,6 мг/мл), полоксамеру 188 (1 мг/мл), L-метіоніну (0,12 мг/мл) у 10 мМ натріяцетатному буфері (pH 3,5)); спостерігали таке:

- включення кожного з бактеріостатичних препаратів у концентраціях, які широко застосовуються для запобігання мікробного забруднення, визначало підвищення вмісту окиснених форм і сприяло різкому посиленню агрегації;

- 0,3 % m-крезолу і комбінація 0,5 % фенолу з 0,1 % полоксамеру 188 визначали різке посилення агрегації.

Виходячи з інформації, яка була одержана на стадії попередньої розробки композицій, процес розробки початково зосередили на застосуванні бензилового спирту і фенолу (без полоксамеру 188), а також додаткових бактеріостатичних препаратів (хлорбутанол, фенілетанол); досліджували також застосування EDTA у комбінації з бензиловим спиртом; окиснення і агрегація активної лікарської речовини були головними шляхами розкладу, що спостерігались; було показано, що зменшення кількості бензилового спирту у композиції підвищує строк зберігання продукту.

Усі інші консерванти, досліджені на цій стадії, не забезпечили значного поліпшення стійкості продукту.

У кінці розробки композицій були ідентифіковані такі претенденти багатодозові композиції:

- Композиція В - розчин інтерферону бета-1а (264 мкг), маніту (163,8 мг), полоксамеру 188 (3 мг), L-метіоніну (0,36 мг), бензилового спирту (6 мг) у 3 мл 10 мМ натріяцетатного буфера (pH 3,5)).

- Композиція А - розчин інтерферону бета-1а (264 мкг), маніту (163,8 мг), полоксамеру 188 (3 мг), L-метіоніну (0,36 мг) у 2,7 мл 11 мМ натріяцетатного буфера (pH 3,5) для змішування з 0,3 мл 3 % розчину бензилового спирту у WFI з одержанням у такий спосіб готової багатодозової композиції.

Виготовили три партії кожної претендентної композиції, які піддали перевірці методами визначення стійкості впродовж 6 місяців; значного розкладу обох претендентних композицій при зберіганні при температурі 2-8 °C не спостерігалось; основним типом розкладу, що відбувався у разі прискорених умов випробування (25 °C), є окиснення.

У кінці дослідження були ідентифіковані дві претендентні багатодозові композиції з порівняним профілем стійкості:

- Композиція В - готова для застосування багатодозова композиція, що містить 0,2 % бензилового спирту;

- Композиція А - багатодозова композиція, що містить 0,3 % бензилового спирту, яку одержують після змішування вмісту 2 капсул (одна з яких містить активний компонент і наповнювачі, а друга містить необхідну кількість бензилового спирту

для одержання готової лікарської форми).

2.1 Мета дослідження

Мета дослідження полягала у розробці багатодозової композиції інтерферону бета-1а (264 мкг) без HSA у 3 мл капсулах із можливістю введення за допомогою автоматичного ін'єктора.

2.2 Експериментальна частина

2.2.1 Матеріали

Інтерферон бета-1а (фірма Serono S.A.)

Маніт DAB, Ph Eur, BP, USP, FCC, E421 (фірма Merck)

100 % льодяна оцтова кислота, чиста для аналізів (фірма Merck).

Гранульований гідроксид натрію, чистий для аналізів (фірма Merck)

Полоксамер 188 (Lutrol F 68 DAC, USP/NF, фірма BASF).

L-метіонін для біохімічних досліджень (фірма Merck)

m-крезол для синтезу (фірма Merck).

Фенол для синтезу (фірма Merck)

Бензиловий спирт Ph Eur, BP, NF (фірма Merck)

Хлорбутанол (фірма Aldrich)

Фенілетанол (фірма Sigma)

Натрію метилпарабен BP, USP/NF (фірма Formenti)

Натрію пропілпарабен BP, USP/NF (фірма Formenti)

Двонатрієва сіль EDTA (фірма Fluka)

Надчистий 1,2-пропандіол DAB, Ph Eur, BP, USP (фірма Merck)

Ацетонітрил (фірма Merck)

Трифтороцтова кислота (фірма Baker)

Гептафтормасляна кислота (фірма Perce)

2.2.2 Обладнання

Системи HPLC (фірма Waters)

Програмні засоби Millenium 32 (фірма Waters)

Осмометр (Osmomat 030-D, фірма Gonotec)

pH-метр (модель 654, фірма Metrohm)

Калібровані піпетки (фірма Gilson)

0,2 мкм нейлонові мембрани Ultipor N66, FTKNF, Ø 4,7 см (фірма Pall)

0,2 мкм нейлонові мембрани Ultipor N66, NR14225, Ø 14,2 см (фірма Pall)

Тримачі з нержавіючої сталі, Ø 4,7 см і Ø 10 см (фірма Sartorius)

Резервуар із нержавіючої сталі (фірма Sartorius)

5 мкм колонка C4 (0,46x25 см) (фірма Baker)

Колонка C4, Supelcosil LC-304 5 мкм (0,46x25см) (фірма Supelco)

Колонка TSK, G2000SWXL (0,46x25 см) (фірма TosoHaas)

2.3 Дослідження, що передувало виготовленню композицій

Найчастіше застосовувані бактеріостатичні препарати (0,3 % розчин m-крезолу, 0,5 % розчин фенолу і 0,9 % розчин бензилового спирту) спочатку досліджували у комбінації з активною речовиною і сумішами різних наповнювачів у кінцевому контейнері (3 мл капсули): ацетатний буфер, ацетатний буфер/маніт, ацетатний буфер/маніт/L-Met/полоксамер 188. Сумісність активної речовини у різних середовищах досліджували з точки зору

окиснення (RP-HPLC) і асерації (SE-HPLC) при зберіганні при температурі 40 °С. Експериментальні дані, одержані при дослідженні композицій на різних стадіях попередньої фази, в узагальненому вигляді наведені у Таблиці 1.

Ефект включення кожного бактеріостатичного препарату порівнювали з однодозовою композицією (еталон), вибраною у рамках розробки однодозових композицій у шприці (розчин інтерферону бета-1а (44 мкг/мл або 88 мкг/мл), маніту (54,6 мг/мл), полоксамеру 188 (1 мг/мл), L-метіоніну (0,12 мг/мл) у 10 мМ натрійацетатному буфері (рН 3,5)).

Таблиця 1

Склад багатодозових композицій інтерферону бета-1а (попереднє змішування)

Композиція	Склад
Еталон	Ace/Man/Plu/Met1
E	Ace/CR
F	Ace/PH
G	Ace/BA
H	Ace
I	Ace/Man/CR
J	Ace/Man/PH
K	Ace/Man/BA
L	Ace/Man
M	Ace/Man/PH
N	Ace/Man/Met1/PH

O	Ace/Man/Met2/PH
P	Ace/Man/Plu/PH
Q	Ace/Man/Plu/Met1/PH
R	Ace/Man/Plu/Met2/PH
S	Ace/Man/BA
T	Ace/Man/Met1/BA
U	Ace/Man/Met2/BA
V	Ace/Man/Plu/BA
W	Ace/Man/Plu/Met1/BA
X	Ace/Man/Plu/Met2/BA

Ace=10 мМ розчин натрійацетатного буфера (рН 3,5); Man = 54,6 мг/мл; Plu = полоксамер 188 (1 мг/мл); Met = L-метіонін (0,12 мг/мл); Met2 = L-метіонін (0,24 мг/мл); CR=м-крезол (3 мг/мл); PH=фенол (5 мг/мл); BA=бензиловий спирт (9 мг/мл).

2.4. Розробка композицій

Виходячи з інформації, яка була одержана під час досліджень, що передували виготовленню композицій, розробку композицій спочатку зосередили на бензиловому спирті і фенолі; досліджували також додаткові консерванти (хлорбутанол, фенілетанол) і EDTA, об'єднану з бензиловим спиртом. Одержали також порівняльну композицію (MS-3) у капсулах, що відповідала новій однодозовій композиції інтерферону бета-1а без HSA, яку застосовували, як еталон.

Склад (у мг/мл) композиції, виготовленої на цій стадії, наведено у Таблицях 2-5:

Таблиця 2

Багатодозові композиції інтерферону бета-1а, що містять бензиловий спирт (склад у мг/мл)

№	INF	Маніт	Полоксамер 188	L-метіонін	Бензиловий спирт	Ацетатний буфер
MS-3 (еталон)	0,088	54,6	1	0,12	-	Достатня кількість до 1 мл
MS-13	0,088	54,6	1	0,12	1,5	Достатня кількість до 1 мл
MS-14	0,088	54,6	-	0,12	1,5	Достатня кількість до 1 мл
MS-15	0,088	54,6	1	0,12	3	Достатня кількість до 1 мл
MS-16	0,088	54,6	-	0,12	3	Достатня кількість до 1 мл
MS-17	0,088	54,6	1	0,12	4,5	Достатня кількість до 1 мл
MS-18	0,088	54,6	-	0,12	4,5	Достатня кількість до 1 мл
MS-1	0,088	54,6	1	0,12	9	Достатня кількість до 1 мл
MS-2	0,088	54,6	-	0,12	9	Достатня кількість до 1 мл

Таблиця 3

Багатодозові композиції інтерферону бета-1а, що містять фенол (у мг/мл)

№	INF	Маніт	Пропіленгліколь	Фенол	Ацетатний буфер
MS-4	0,088	54,6	-	5	Достатня кількість до 1 мл
MS-5	0,088	54,6	100	5	Достатня кількість до 1 мл

Таблиця 4

Багатодозові композиції інтерферону бета-1а, що містять хлорбутанол і фенілетанол (у мг/мл)

№	INF	Маніт	Полоксамер 188	L-метіонін	Хлорбутанол	Фенілетанол	Ацетатний буфер
MS-35	0,088	54,6	1	0,12	1	-	Достатня кількість до 1 мл
MS-34	0,088	54,6	1	0,12	-	1	Достатня кількість до 1 мл
MS-34b	0,088	54,6	1	0,12	-	1	Достатня кількість до 1 мл

Таблиця 5

Багатодозові композиції інтерферону бета-1а, що містять EDTA (у мг/мл)

№	INF	Маніт	L-метіонін	Полоксамер 188	EDTA	Бензиловий спирт	Ацетатний буфер
MS-32	0,088	54,6	0,12	1	1	2	Достатня кількість до 1 мл
MS-33	0,088	54,6	-	1	1	2	Достатня кількість до 1 мл
MS-36	0,088	54,6	0,12	1	0,5	1	Достатня кількість до 1 мл

У кінці розробки композицій були ідентифіковані такі претендентні багатодозові композиції:

- Композиція В - розчин інтерферону бета-1а (264 мкг) у 3 мл ацетатного буфера (рН 3,5), що містить маніт (54,6 мг/мл), полоксамер 188 (1 мг/мл), L-метіонін (0,12 мг/мл) і бензиловий спирт (2 мг/мл) (0,2 % розчин бензинового спирту).

- Композиція А - розчин інтерферону бета-1а (264 мкг) у 2,7 мл ацетатного буфера (рН 3,5), що містить маніт (54,6 мг/мл), полоксамер 188 (1 мг/мл) і L-метіонін (0,12 мг/мл), для змішування з 0,3 мл 3 % розчину бензинового спирту у WFI з одержанням у такий спосіб готової багатодозової композиції (0,3 % розчин бензинового спирту).

2.5 Випробування ефективності консерванта

Багатодозові композиції, що містили бензиловий спирт у різних концентраціях (від 0,2 % до 0,9 %), відбирали за результатами випробування ефективності консерванта відповідно до вимог

Європейської Фармакопеї та Фармакопеї США.

Попередні випробування здійснювали, відбираючи *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* і *Candida albicans*, як індикатори: дані про те, що кислий рН композиції сам по собі виявляє бактеріостатичний ефект на бактерії (*Staphylococcus aureus*) і те, що, за повідомленням, деякі штами *Candida albicans* виживають навіть при низьких значеннях рН (рН близько 2), привели до того, що для випробувань, як критичний індикатор, вибрали *Candida albicans*. Застосовували критерії прийнятності випробування ефективності консерванта, описані як у Європейській Фармакопеї, так і у Фармакопеї США.

2.6 Претендентні композиції

2.6.1 Композиція А

Виготовили три лабораторні партії (приблизно 140 капсул/партію); склад наведено у Таблиці 6:

Таблиця 6

Склад багатодозової композиції А інтерферону бета-1а

INFβ-1а	Маніт	Полоксамер 188	L-метіонін	11 мМ розчин ацетату натрію (рН 3,5)
97,8 мкг	60,7 мг	1,11мг	0,13 мг	Достатня кількість до 1 мл

Активний компонент змішували з розчином наповнювачів, після чого фільтрували через 0,22 мкм нейлонову мембрану; капсули заповнювали 2,7 мл готового розчину. Зразки відбирали перед фільтрацією, після фільтрації і після заповнення для контролювання втрат активного компонента під час процесу.

Зразки зберігали і випробували на стійкість при температурі 2-8 °C (6 місяців), 25±2 °C (3 місяці) і 40±2 °C (1 місяць).

Виготовили шість лабораторних партій 3 % розчину бензинового спирту у WFI для змішування з активним компонентом, що містився у капсулах; склад згаданих партій наведено у Таблиці 7:

Таблиця 7

Композиція, що містить 3 % бензинового спирту у

WFI

Бензиловий спирт	WFI
30мг	Достатня кількість до 1 мл

Необхідну кількість бензинового спирту додавали до WFI, після чого фільтрували через 0,22 мкм мембрану Dugapore; потім капсули заповнювали 0,5 мл розчину і на завершення стерилізували шляхом обробки у автоклаві.

Зразки зберігали при температурі 25±2 °C і перевіряли на вміст бензинового спирту і рН до 1 місяця.

2.6.2 Композиція В

Виготовили три лабораторні партії (приблизно 500 капсул/партію); склад наведено у Таблиці 8:

Таблиця 8

Склад багатодозової композиції В інтерферону бета-1а

INFβ-1	Маніт	Полоксамер 188	L-метіонін	Бензиловий спирт	10 мМ розчин ацетату натрію (pH 3,5)
88 мкг	54,6 мг	1 мг	0,12 мг	2мг	Достатня кількість до 1 мл

Активний компонент змішували з розчином наповнювачів, після чого фільтрували через 0,22 мкм нейлонову мембрану; капсули заповнювали 3 мл готового розчину. Зразки відбирали перед фільтрацією, після фільтрації і після заповнення для контролювання втрат активного компонента під час процесу.

Зразки зберігали і випробували на стійкість при температурі 2-8 °C (6 місяців), 25±2 °C (6 місяців) і 40±2 °C (3 тижні).

2.6.3 Випробування ефективності консерванта

Обидві претенденті композиції випробували на ефективність консерванта відповідно до вимог Європейської Фармакопеї та Фармакопеї США.

2.7 Аналітичні тести та методи

Аналітичні тести і методи, опис яких наведено нижче, застосовували для контролювання стійкості лабораторних композицій:

pH (потенціометричний вимір)

Кількісний аналіз білка (RP-HPLC)

Кількісне визначення білка здійснюють на 5 мкм колонці C4 Wide-Pore Butyl (фірма Baker); довжина хвилі дорівнює 214 нм, елювання здійснюють зі швидкістю 1 мл/хв із застосуванням такої рухомої фази і градієнта:

A = вода/трифтороцтова кислота (0,1 %) - B = ацетонітрил/трифтороцтова кислота (0,1 %) - C=ацетонітрил

Градієнт:

0 хв.	70 % A	30 % B	0 % C
5,0 хв.	70 % A	30 % B	0 % C
6,0 хв.	58 % A	42 % B	0 % C
15,0 хв.	57 % A	43 % B	0 % C
30,0 хв.	46 % A	54 % B	0 % C
35,0 хв.	45 % A	55 % B	0 % C
40,0 хв.	40 % A	60 % B	0 % C
40,1 хв.	20 % A	80 % B	0 % C
45,0 хв.	20 % A	80 % B	0 % C
45,1 хв.	0 % A	0 % B	100 % C
50,0 хв.	0 % A	0 % B	100 % C
50,1 хв.	70 % A	30 % B	0 % C
65,0 хв.	70 % A	30 % B	0 % C

Тривалість=65 хв.

Зразки аналізують шляхом введення 100 мкл об'єму без попередньої обробки (зразки з концентрацією 44 мкг/мл) або після розведення (1:1) у еквівалентному об'ємі плацебо (для зразків з концентрацією 88 мкг/мл).

Кількісний аналіз зразків здійснюють за стандартною кривою (у діапазоні 0,0125 мг/мл - 0,2 мг/мл), яка була одержана за допомогою еталонного стандартного матеріалу.

Окиснені форми (RP-HPLC)

Кількісне визначення окиснених форм здійс-

нюють на колонці C4, Supelcosil LC-304 (фірма Supelco) при температурі 40 °C; довжина хвилі дорівнює 208 нм, елювання здійснюють зі швидкістю 1 мл/хв із застосуванням такої рухомої фази і градієнта:

A=вода 60 %/ацетонітрил 40 %/гептафтормасляна кислота 0,14 % - B=вода 20 %/ацетонітрил 80 %/гептафтормасляна кислота 0,14 % - C=вода 20 %/ацетонітрил 80 %/трифтороцтова кислота 0,1 %

Градієнт:

0 хв.	70 %A	30 %B	0 %C	
5 хв.	70 %A	30 %B	0 %C	
58 хв.	62 %A	38 %B	0 %C	Крива 6
63 хв.	0 %A	100%B	0 %C	Крива 1
68 хв.	0 %A	0 %B	100%C	Крива 1
69 хв.	70 %A	30 %B	0 %C	Крива 6

Тривалість=96 хв. (70 хв. + зрівноважування впродовж 26 хв.)

Зразки аналізують шляхом введення 200 мкл (зразки з концентрацією 88 мкг/мл) або 400 мкл

(зразки з концентрацією 44 мкг/мл) об'єму без попередньої обробки.

Загальний об'єм агрегатів (SE-HPLC)

Визначення загального вмісту агрегатів здійснюють на колонці TSK G2000SWXL (фірма TosoHaas): елювання здійснюють ізократичним способом зі швидкістю 0,5 мл/хв із застосуванням суміші ацетонітрилу:води (30:70)+0,2 % трифтороцтової кислоти; довжина хвилі дорівнює 214 нм. Тривалість дорівнює 20 хв.

Зразки аналізують шляхом введення 100 мкл (зразки з концентрацією 88 мкг/мл) або 200 мкл (зразки з концентрацією 44 мкг/мл) об'єму без попередньої обробки.

Біологічна активність (біологічний аналіз in vitro)

Біологічну активність визначають шляхом антивірусного аналізу, виходячи з індукованого IFN- β захисту клітин (клітинна лінія WISH - людська амніотична тканина) проти цитопатичного ефекту вірусу (вірус везикулярного стоматиту).

Осмотичний тиск (кріоскопічний вимір)

Визначення осмотичного тиску здійснюють шляхом кріоскопічного вимірювання, виходячи зі зниження точки замерзання, що спостерігається у

розчину, який піддається випробуванню.

Аналіз на бензиловий спирт (газова хроматографія)

У газово-хроматографічному методі виявлення бензинового спирту застосовують калібрування за однією точкою, із застосуванням як еталону бензинового спирту, що постачається фірмою Merck. На додаток до цього, застосовують внутрішній стандарт (фенілетиловий спирт) для нормалізації площі піків експериментальних зразків, розчину контрольного зразку і стандартного розчину. Згаданий метод здійснюють на сталевій колонці (6 футів (1,829 м)х2 мм (внутрішній діаметр)) з 10 % Carbowax 20M на сітці (меш 80/100) Supelcoport із полум'яно-іонізаційним детектором (FID).

Результати наведені у мг бензинового спирту/мл.

2.7.1 Результати

2.7.1.1 Дослідження, що передували виготовленню композицій

Виявлені рівні вмісту окиснених форм і загального об'єму агрегатів за стресових умов (40 °C) подані у Таблицях 9 і 10:

Таблиця 9

Процент окиснених форм у багатодозових композиціях інтерферону бета-1а при зберіганні при температурі 40 °C (RP-HPLC)

Композиція	Склад	T=0	3 дні при температурі 40°C	6 днів при температурі 40°C
Еталон	Ace/Man/Plu/Met1	3,0	-	4,2
E	Ace/CR	2,8	2,7	-
F	Ace/PH	2,6	3,5	-
G	Ace/BA	2,6	6,3	-
H	Ace	3,6	2,7	-
I	Ace/Man/CR	2,3	3,0	-
J	Ace/Man/PH	3,6	2,5	-
K	Ace/Man/BA	4,0	4,7	-
L	Ace/Man	2,9	2,3	-
M	Ace/Man/PH	2,9	-	6,3
N	Ace/Man/Met1/PH	2,7	-	5,3
O	Ace/Man/Met2/PH	2,5	-	4,9
P	Ace/Man/Plu/PH	2,3	-	6,8
Q	Ace/Man/Plu/Met1/PH	2,2	-	7,2
R	Ace/Man/Plu/Met2/PH	2,1	-	4,2
S	Ace/Man/BA	2,6	-	5,0
T	Ace/Man/Met1/BA	2,7	-	5,0
U	Ace/Man/Met2/BA	2,5	-	4,8
V	Ace/Man/Plu/BA	2,5	-	5,0
W	Ace/Man/Plu/Met1/BA	2,6	-	5,0
X	Ace/Man/Plu/Met2/BA	3,0	-	6,2

Ace=10 mM розчин натрійацетатного буфера (pH 3,5); Man=54,6 мг/мл; Plu=полоксамер 188 (1 мг/мл); Met1=L-метіонін (0,12 мг/мл); Met2=L-метіонін (0,24 мг/мл); CR=m-крезол (3 мг/мл); PH=фенол (5 мг/мл); BA=бензиловий спирт (9 мг/мл)

Таблиця 10

Загальний об'єм агрегатів (%) у багатодозових композиціях інтерферону бета-1а при зберіганні при температурі 40°C (RP-HPLC)

Композиція	Склад	T=0	3 дні при температурі 40°C	6 днів при температурі 40°C
Еталон	Ace/Man/Plu/MetI	3,2	-	3,2
E	Ace/CR	1,8	9,4	8,5
F	Ace/PH	2,2	39,8	9,4
G	Ace/BA	2,0	4,7	7,2
H	Ace	2,8	2,5	1,7
I	Ace/Man/CR	2,4	15,6	20,1
J	Ace/Man/PH	2,0	2,3	2,1
K	Ace/Man/BA	2,3	3,6	4,5
L	Ace/Man	3,0	3,2	2,3
M	Ace/Man/PH	2,2	-	4,4
N	Ace/Man/Met1/PH	2,2	-	5,8
O	Ace/Man/Met2/PH	2,3	-	8,8
P	Ace/Man/Plu/PH	2,2	-	40,3
Q	Ace/Man/Plu/Met1/PH	2,3	-	46,3
R	Ace/Man/Plu/Met2/PH	2,3	-	35,9
S	Ace/Man/BA	2,5	-	3,4
T	Ace/Man/Met1/BA	2,6	-	5,4
U	Ace/Man/Met2/BA	1,4	-	3,0
V	Ace/Man/Plu/BA	2,9	-	4,8
W	Ace/Man/Plu/Met1/BA	2,9	-	5,8
X	Ace/Man/Plu/Met2/BA	1,6	-	5,8

Ace=10 мМ розчин натрійацетатного буфера (pH 3,5); Man=54,6 мг/мл; Plu=полосамер 188 (1 мг/мл); Met1=L-метіонін (0,12 мг/мл); Met2=L-метіонін (0,24 мг/мл); CR=m-крезол (3 мг/мл); PH=фенол (5 мг/мл); BA=бензиловий спирт (9 мг/мл)

Включення кожного з бактеріостатичних препаратів у концентраціях, які широко застосовуються для запобігання мікробного забруднення, визначало підвищення вмісту окиснених форм і сприяло різкому посиленню агрегації, порівняно з одностовою композицією (еталон).

Комбінація 0,5 % фенолу і 0,1 % полоксамеру 188 негативно впливала на стійкість продукту, оскільки відбулась майже 40 % агрегація (композиції P-Q-R). 0,3 % m-крезолу виключили для додаткової розробки, оскільки він негативно впливав на стійкість продукту унаслідок посилення агрегації (композиція I).

2.7.1.2 Розробка композицій

Усі дані відносно стійкості (необроблені дані) зібрані у розділі "Таблиці"; для оцінки даних застосовували лінійний регресійний аналіз.

2.7.1.2.1 Композиції, що містять бензиловий спирт

Висока концентрація бензилового спирту (0,9 %) негативно впливала на стійкість продукту як з точки зору окиснених форм, так і вмісту агрегатів, як показано на Фігурах 1-6:

- за стресових умов (40 °C) посилення окиснення є більшим у композицій, що містять 0,9 % бензилового спирту (MS-1 і MS-2), як показано на Фіг. 1;

- за прискорених умов (25 °C) посилення окиснення є більшим в усіх композицій, що містять бензиловий спирт, порівняно з композицією без бензилового спирту (MS-3, еталон), як показано на Фіг. 2;

- при тривалому зберіганні (2-8°C) більш інтенсивне окиснення спостерігалось в усіх композицій, що містять 0,9% бензилового спирту (MS-1 і MS-2); порівняння інтенсивності розкладу була виявлена у композицій з вмістом бензилового спирту нижче за 0,45% (Фіг. 3);

Відносно рівня агрегатів, спостерігалось таке:

- за стресових умов (40 °C) посилення агрегації спостерігалось у композицій, що містять 0,9 % бензилового спирту (MS-1 і MS-2), як показано на Фіг. 4;

- за прискорених умов і за умов тривалого зберігання (25 °C і 2-8 °C) у жодній з композицій не спостерігалось посилення агрегації, як показано на Фіг. 5 і Фіг. 6.

Зниження біологічної активності спостерігалось у композицій, що містять 0,9 % бензилового спирту (MS-1 і MS-2), при температурі 40 °C; подібного у зразків, що зберігались при температурах 25 °C і 2-8 °C, не спостерігалось.

У разі зберігання при усіх температурах зниження титру не спостерігалось.

У разі зберігання при усіх температурах зсуву pH не спостерігалось.

2.7.1.2.2 Композиції, що містять альтернативні бактеріостатичні препарати (фенол, хлорбутанол, фенілетанол)

Фенол (MS-4 і MS-5) негативно впливав на стійкість продукту з точки зору вмісту окиснених форм, у той час як хлорбутанол (MS-35) і фенілетанол (MS-34 і MS-34b) демонстрували стійкість, порівнянню з еталонним розчином (MS-3, без бактеріостатичного препарату), як показано на Фіг. 7 і

Фіг. 8.

Відносно загального об'єму агрегатів, різке посилення агрегації спостерігалось за стресових умов (40 °C) у композицій, що містили фенол (MS-4 і MS-5), як показано на Фіг. 9; при більш низьких температурах (25 °C і 2-8 °C) посилення агрегації не відбувалось.

2.7.1.2.3 Композиції, що містять EDTA

Додання EDTA до композицій, що містили 0,1 % - 0,2 % бензилового спирту (MS-32, MS-33, MS-36), не знижувало рівня окиснення (Фіг. 10); зростання об'єму агрегатів спостерігалось за прискорених умов у композицій, що містили 0,1 % EDTA і 0,2 % бензилового спирту (MS-32, MS-33) (Фіг. 11); порівнянний ступінь розкладу спостерігався при температурі 2-8 °C.

2.7.1.2.4 Випробування ефективності консерванта

Результати відбіркових досліджень показали,

що критерії Фармакопеї США і Європейської Фармакопеї задовольняються принаймні у разі концентрацій бензилового спирту, що дорівнюють або є вищими за 0,3 % (для *Candida albicans*).

2.8 Претендентні композиції

Усі дані оцінювали таким чином: кожен партію піддавали лінійному регресійному аналізу з подальшим коваріаційним аналізом (значення $P > 0,25$) для визначення мінливості між партіями; у разі відсутності мінливості при зберіганні, формальний статистичний аналіз не проводили.

2.8.1 Претендентна композиція А

2.8.1.1 Відновлення під час виготовлення

Дані щодо відновлення інтерферону бета-1а у зразках, що відбирались у процесі виготовлення (перед та після фільтрації, готовий продукт) претендентної композиції А підсумовані у Таблиці 11: значних втрат активного компонента не спостерігалось.

Таблиця 11

Процент відновлення інтерферону бета-1а під час виготовлення претендентної композиції А

	RT-01	RT-02	RT-03
Після першої фільтрації	98,6	99,7	98,0
Після другої фільтрації	98,3	98,5	103,8
Готовий продукт у капсулах	98,4	97,5	100,7

2.8.1.2 Стійкість активної лікарської речовини

Для рівня окиснених форм у трьох партіях, що зберігались при різних температурах, визначили

спільний нахил кривої і точку перетину; результати статистичного аналізу наведені у Таблиці 12:

Таблиця 12

Результати статистичного аналізу багатодозової претендентної композиції А інтерферону бета-1а (окиснені форми)

2-8 °C		25 °C		40 °C	
Згрупований нахил кривої (%/тиждень)	Згрупована точка перетину (%)	Згрупований нахил кривої (%/тиждень)	Згрупована точка перетину (%)	Згрупований нахил кривої (%/тиждень)	Згрупована точка перетину (%)
0,063	2,73	0,322	2,67	2,206	2,51

Значущої мінливості для загального об'єму агрегатів і аналізу не спостерігалось; з цієї причини формальний статистичний аналіз не проводили. Різний вміст агрегатів у трьох партіях обумовлюється різним об'ємом нерозфасованого лікарського засобу, що застосовувався для виробництва.

2.8.2 Претендентна композиція В

2.8.2.1 Відновлення під час виготовлення

Дані щодо відновлення інтерферону бета-1а у зразках, що відбирались у процесі виготовлення (перед та після фільтрації, готовий продукт) претендентної композиції В, підсумовані у Таблиці 15: значних втрат активного компонента не спостерігалось.

Таблиця 15

Процент відновлення інтерферону бета-1а під час виготовлення претендентної композиції В

	MS-01	MS-02	MS-03
Після першої фільтрації	100,7	116,5	97,38
Після другої фільтрації	101,2	114,9	98,82
Готовий продукт у капсулах	100,6	112,0	95,76

2.8.2.2 Стійкість активної лікарської речовини

Статистичний аналіз, якому піддали рівень окиснених форм, показав таке:

- спільний нахил кривої і точку перетину визначили для 3 партій при температурі 40 °C; згрупований нахил кривої становить 1,42 %/тиждень і згрупована точка перетину становить 2,72 %;

- спільного нахилу кривої для 3 партій при температурі 25 °C (значення $P=0,095$) визначити не вдалось, тому вдалися до аналізу найгіршого варіанта (партія MS-03): після зберігання впродовж 1 місяця спостерігалось 1,17 % зростання вмісту окиснених форм (0,27 %/тиждень);

- спільного нахилу кривої для 3 партій при температурі 2-8 °C (значення $P=0,016$) визначити не вдалось, тому вдалися до аналізу найгіршого варіанта (партія MS-03): після зберігання впродовж 1 місяця спостерігалось 0,1 % зростання вмісту окиснених форм (0,047 %/тиждень).

Значущої мінливості за результатами визначення стійкості для загального об'єму агрегатів і аналізу не спостерігалось; з цієї причини формальний статистичний аналіз не проводили.

Зниження біологічної активності при зберіганні не спостерігали навіть за стресових умов (40 °C).

2.9 Висновки

У кінці дослідження були ідентифіковані дві претенденті багатодозові композиції з порівнянням профілем стійкості:

- Претендентна Композиція В являє собою готову для застосування багатодозову композицію, що містить 0,2 % бензилового спирту;

- Претендентна Композиція А являє собою багатодозову композицію, що містить 0,3 % бензилового спирту, яку одержують після змішування вмісту 2 капсул (одна з яких містить активний компонент і наповнювачі, а друга містить необхідну кількість бензилового спирту для одержання готової лікарської форми).

Ці претендентні розчини випробували також при підвищеному рН ($4,5\pm 0,2$); значущих змін профілю стійкості не спостерігалось. Зараз Заявник встановив, що цей дещо підвищений рівень рН композицій IFN підвищує місцеву стерпність підшкірних ін'єкцій. Таким чином, 2 вищезгадані претендентні розчини при рН 4,5 або рН 4,7 могли б забезпечити додаткові переваги з точки зору піддатливості хворих лікуванню.

Приклад 3: Спосіб виготовлення багатодозової претендентної композиції А

Спочатку, шляхом розчинення 20 г гранул гідроксиду натрію у 500 г WFI, одержали 1-н. розчин гідроксиду натрію.

Після цього, шляхом додання 1,32 г льодяної

оцтової кислоти до приблизно 1800 г WFI, одержали 0,011 М натрійацетатний буфер (рН $3,5\pm 0,2$). За допомогою 1-н. розчину NaOH довели рН розчину до рівня рН $3,5\pm 0,2$. Після цього розчин довели до кінцевої маси у 2000 г. Після цього рН знову довели до рівня $3,5\pm 0,2$ за допомогою 1-н. розчину NaOH або 50 % розбавленої оцтової кислоти. Після цього розчин довели до кінцевої маси у 2000 г.

Готовий розчин одержували як описано нижче.

Обчислену кількість наповнювачів зважували і розчиняли у необхідній кількості 11 мМ натрійацетатного буфера (рН $3,5\pm 0,2$), рН розчину перевіряли і регулювали (у разі потреби); потім додавали необхідну кількість рекомбінантного людського (г-н) інтерферону бета-1а (який одержують методами генної інженерії з клітин CHO (яєчник китайського хом'ячка)); кінцеву масу одержували шляхом додання 11 мМ натрійацетатного буфера (рН $3,5\pm 0,2$).

Відбирали 1 мл зразок готового розчину для випробування засобами кількісної RP-HPLC (зразок BF=перед першою фільтрацією).

Після цього готовий розчин фільтрували через 0,2 мкм мембрану, встановлену у тримачі з нержавіючої сталі, і розчин збирали до скляної хімічної склянки.

Відбирали 1 мл зразок готового розчину для випробування засобами кількісної RP-HPLC.

Готовий розчин фільтрували, як описувалось у попередньому абзаці, через другу 0,2 мкм мембрану, встановлену у тримачі з нержавіючої сталі.

Відбирали 1 мл зразок готового розчину для випробування засобами кількісної RP-HPLC.

3 мл скляні капсули заповнювали 2,7 мл готового розчину і закривали пробками.

Цей розчин є готовим для змішування з вмістом капсули, що містить 3 % розчин бензилового спирту у WFI.

Приклад 4: Спосіб виготовлення багатодозової претендентної композиції В

Спочатку, шляхом розчинення 20 г гранул гідроксиду натрію у 500 г WFI, одержали 1-н. розчин гідроксиду натрію.

Після цього, шляхом додання 1,32 г льодяної оцтової кислоти до приблизно 1800 г WFI, одержали 0,011 М натрійацетатний буфер (рН $3,5\pm 0,2$). За допомогою 1-н. розчину NaOH довели рН розчину до рівня рН $3,5\pm 0,2$. Після цього розчин довели до кінцевої маси у 2000 г. Після цього рН знову довели до рівня $3,5\pm 0,2$ за допомогою 1-н. розчину NaOH або 50 % розбавленої оцтової кислоти. Після цього розчин довели до кінцевої маси у 2000 г.

Готовий розчин одержували як описано нижче.

Обчислену кількість наповнювачів зважували і

розчиняли у необхідній кількості 10 мМ натрійацетатного буфера (pH $3,5 \pm 0,2$), pH розчину перевіряли і регулювали (у разі потреби); потім додавали необхідну кількість рекомбінантного людського (g-h) інтерферону бета-1a (який одержують методами генної інженерії з клітин CHO (яєчник китайського хом'ячка)); кінцеву масу одержували шляхом додання 10 мМ натрійацетатного буфера (pH $3,5 \pm 0,2$).

Відбирали 1 мл зразок готового розчину для випробування засобами кількісної RP-HPLC.

Після цього готовий розчин фільтрували через 0,2 мкм мембрану, встановлену у тримачі з нержавіючої сталі, і розчин збирали до скляної хімічної склянки.

Відбирали 1 мл зразок готового розчину для випробування засобами кількісної RP-HPLC.

Готовий розчин фільтрували, як описувалось у попередньому абзаці, через другу 0,2 мкм мембрану, встановлену у тримачі з нержавіючої сталі.

Відбирали 1 мл зразок готового розчину для випробування засобами кількісної RP-HPLC.

3 мл скляні капсули заповнювали 3 мл готового розчину і закривали пробками.

Посилання

1. Study Group. The Lancet 1998; 352, 1498-1504.
2. Clegg and Bryant, Exp. Opin. Pharmacother

2001; 2(4): 623-639.

3. Derynk R. et al., Nature 1980; 285, 542-547.

4. Familletti P.C., Rubinstein S. and Pestka S. 1981 "A Convenient and Rapid Cytopathic Effect Inhibition Assay for Interferon," in Methods in Enzymology, Vol. 78 (S. Pestka, ed.), Academic Press, New York, 387-394;

5. Hultgren C., Milich D.R., Weiland O., Sallberg M. (1998). The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th)1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. J. Gen. Virol. 1998; 79:2381-2391.

6. McCormick J.B., King I.J., Webb P.A., Scribner C.L., Craven R.B., Johnson K.M., Elliott L.H., Belmont-Williams R. Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. N. Engl. J. Med. 1986 Jan. 2; 314(1):20-6.

7. Mark D.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81 (18) 5662-5666 (1984).

8. Pestka S. (1986) "Interferon Standards and General Abbreviations in Methods in Enzymology (S. Pestka, ed.), Academic Press, New York 119, 14-23.

9. Rubinstein S., Familletti P.C. and Pestka S. Convenient Assay for Interferons. J. Virol. 1981; 37, 755-758.

10. Shepard H.M. et al., Nature 1981; 294, 563-565.

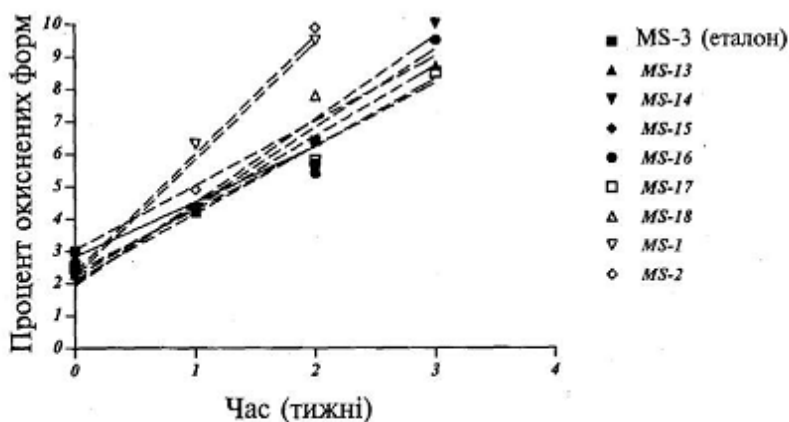
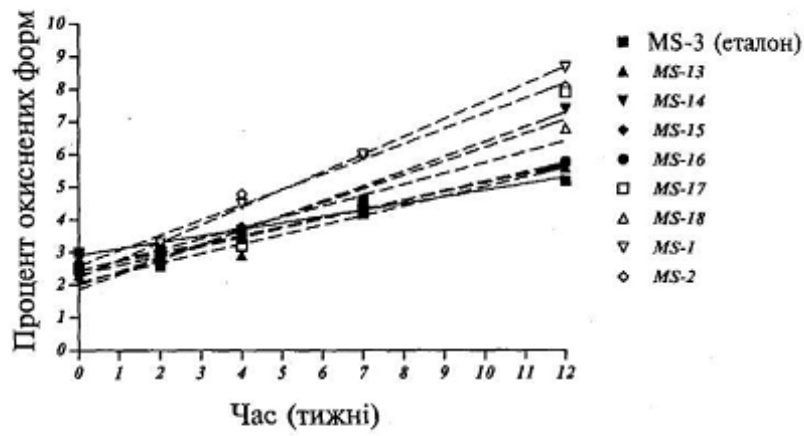
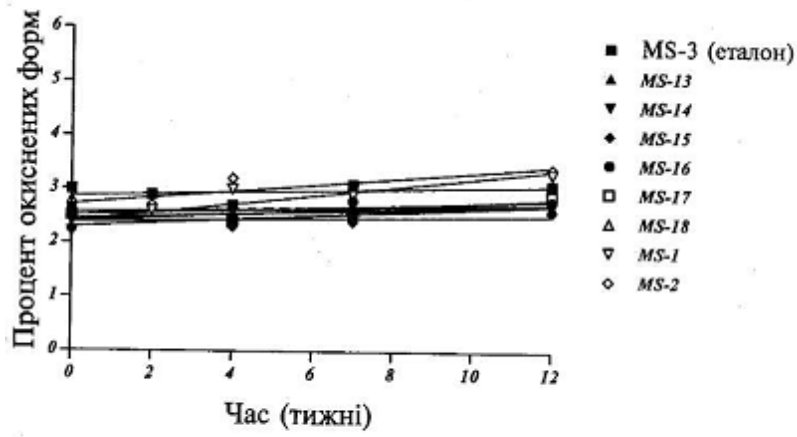


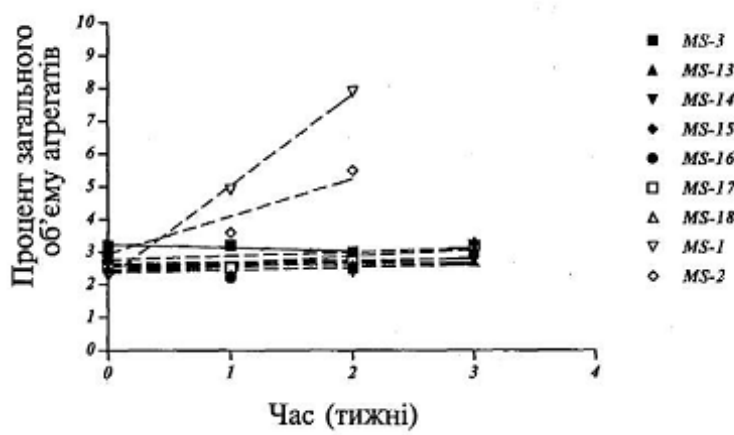
Fig. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

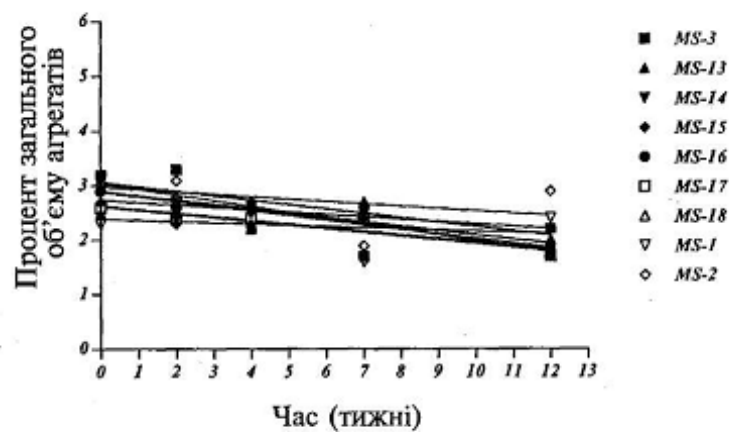


Fig. 5

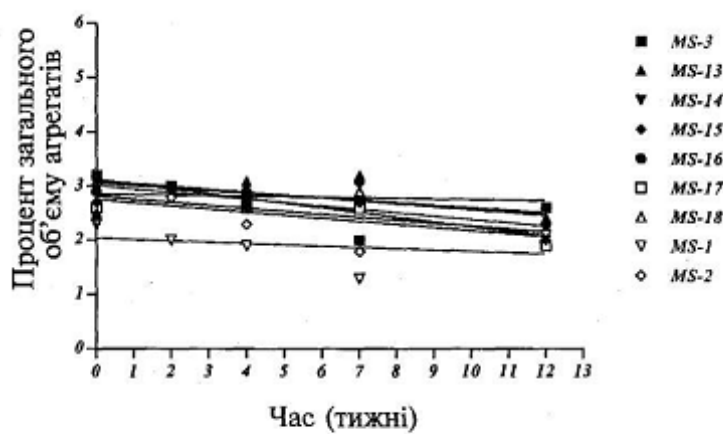


Fig. 6

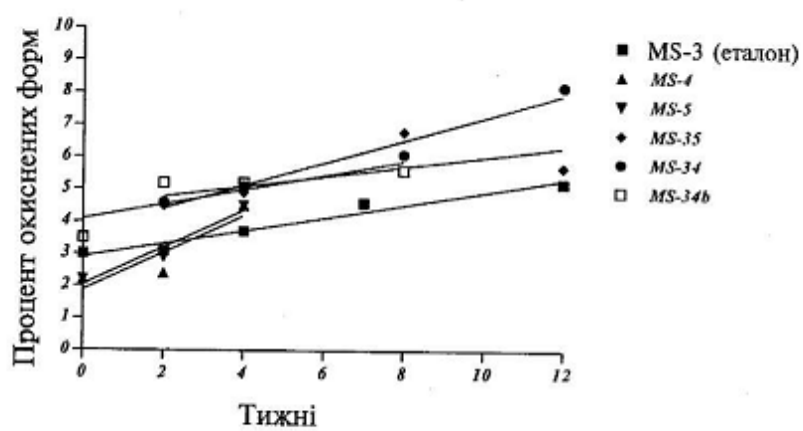
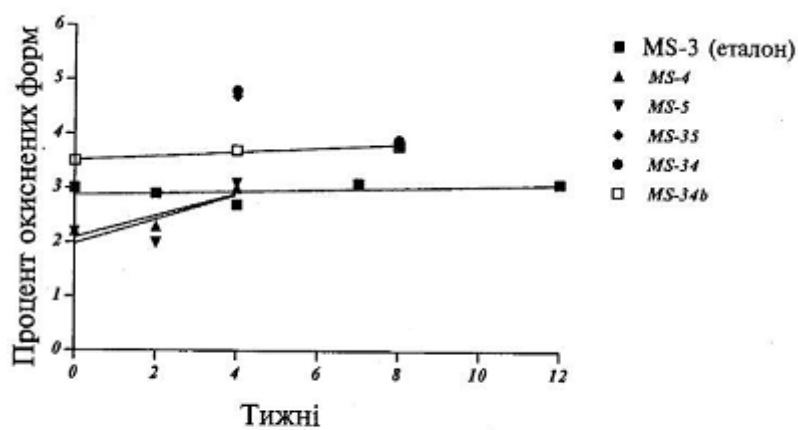
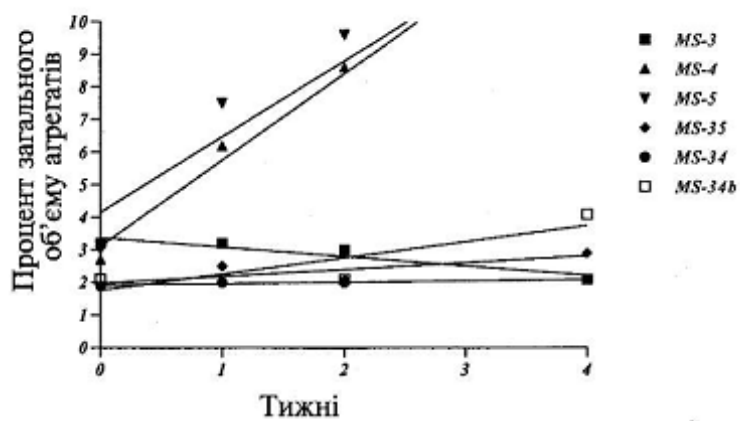


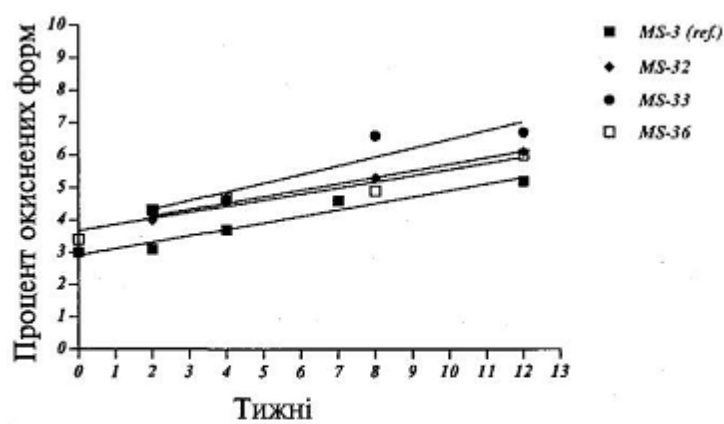
Fig. 7



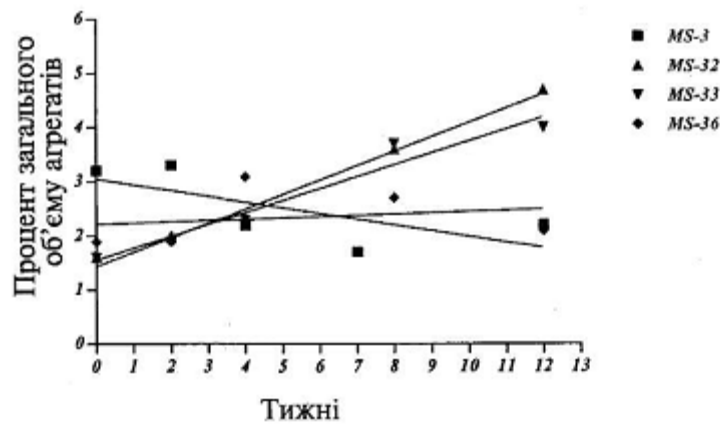
Фіг. 8



Фіг. 9

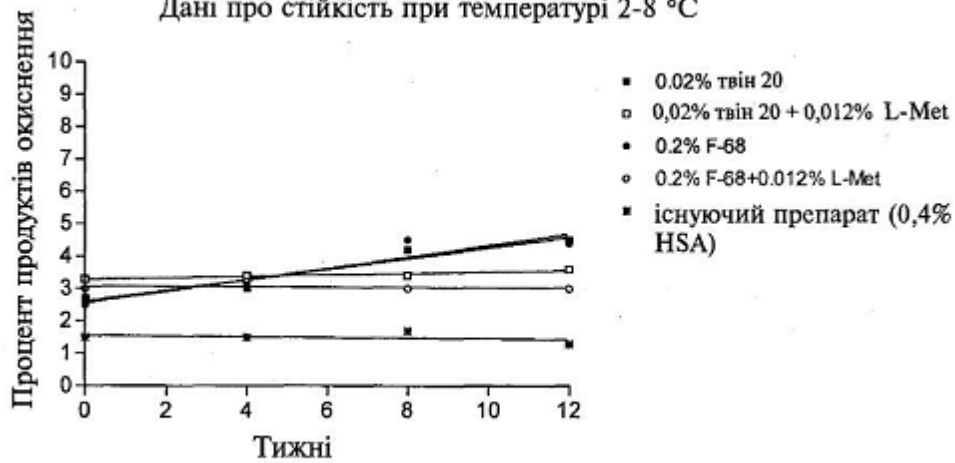


Фіг. 10



Фіг. 11

Ефективність L-Met відносно окиснення IFN.
Дані про стійкість при температурі 2-8 °C



Фіг. 12

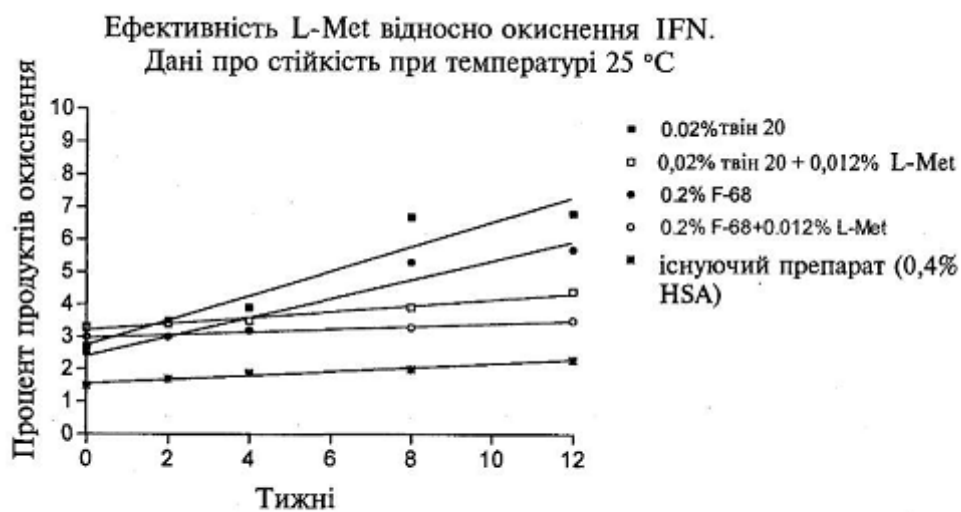


Fig. 13