



УКРАЇНА

(19) UA (11) 37757 (13) A

(51) 6 A61K38/21, A61K9/08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ АНТИВІ-РУСНОЇ, АНТИПРОЛІФЕРАТИВНОЇ ТА ІМУНО-
МОДУЛЮЮЧОЇ ДІЇ ТА СПОСІБ ЇЇ ОДЕРЖАННЯ

(21) 2000042075

(22) 11.04.2000

(24) 15.05.2001

(33) UA

(46) 15.05.2001, Бюл. № 4, 2001 р.

(72) Діденко Наталія Юріївна, Курищук Костянтин
Васильович, Винокурова Валентина Миколаївна,
Заря Любов Володимирівна(73) ДІДЕНКО НАТАЛІЯ ЮРІЇВНА, КУРИЩУК
КОСТЯНТИН ВАСИЛЬОВИЧ, ВІНОКУРОВА
ВАЛЕНТИНА МИКОЛАЇВНА, ЗАРЯ ЛЮБОВ
ВОЛОДИМИРІВНА

(57) 1. Фармацевтична композиція антивірусної, антипроліферативної та імуномодулюючої дії у формі ліофілізату, одержаного з водного розчину, що містить інтерферон, хлорид натрію, буферну суміш у вигляді суміші фосфатів та поліглюкін. яка відрізняється тим, що як інтерферон вона містить α -2b-інтерферон. одержаний за допомогою рекомбінантної плазмиди pIF 14 з двома генами інтерферону, що заражена фагом лямбда λ C1857 Q_{am117}R_{am54}, при такому вмісту компонентів у 1 мл водного розчину для ліофільного сушіння:

α -2b-інтерферон, МО	1×10^5 - 6×10^6
хлорид натрію, мг	8,9-9
поліглюкін 6%, мг	4,8-6
буферна суміш до рН розчину	6,0-6,9

2. Спосіб одержання фармацевтичної композиції антивірусної. антипроліферативної і імуномодулюючої дії у формі ліофілізату, що включає приготування водного розчину, що містить інтерферон, хлорид натрію, буферну суміш у вигляді суміші фосфатів та поліглюкін, заморожування розчину і ліофільне сушіння. який відрізняється тим, що при приготуванні розчину використовують α -2b-інтерферон, одержаний за допомогою рекомбінантної плазмиди pIF 14 з двома генами інтерферону, що заражена фагом лямбда λ C1857 Q_{am117}R_{am54} заморожування вказаного розчину здійснюють протягом 30-48 годин до температури (-45)-(-60)°C. а ліофільне сушіння ведуть при підвищенні температури від (-40) до +30 -+34°C протягом 30-48 годин.

Винахід стосується медицини, а саме інтерферонвмісних композицій, які можуть бути застосовані як антивіруси!, антипроліферативні і імуномодулюючі лікарські засоби, та способу їх одержання.

Використання інтерферонів як лікарського засобу ґрунтується на основних біологічних здатностях цієї групи білків, а саме: антивірусній, антипроліферативній та імуномодулюючій. Для інтерферонів характерна видоспецифічність, що обумовлює необхідність використовувати для добування інтерферону людини лейкоцитів периферичної крові, диплоїдних фібробластів тощо. Однак, інтерферон людини надто дорого коштує і одержання його пов'язане з трудомісткими операціями. Створення рекомбінантних інтерферонів, властивості яких будуть максимально наближені до людського інтерферону - єдина можливість забезпечити використання інтерферону у медичній практиці.

За своєю природою інтерферони належать до тканинних гормонів, які характеризуються поліпотентною дією: вони здатні індукувати резистентність клітин до широкого спектру вірусів, інгібувати клітинне ділення, модифікувати поверхневі властивості клітин, модифікувати клітинний фенотип та інше. Для збереження активності інтерферону необхідний стабілізатор. При створенні лікарських форм вибір придатного стабілізатора та допоміжних речовин має виняткове значення, оскільки, з одного боку, необхідно зберегти високу активність інтерферону, і, з іншого боку, не чинити токсичний, алергічний та інший негативний вплив на організм людини.

Відома фармацевтична композиція антивірусної, антипроліферативної та імуномодулюючої дії, що містить рекомбінантний інтерферон, біологічно сумісний полімер та антиоксидант (RU, патент, № 2140285. М.кл. A61K 38/21, 27.101999). Як біологічно сумісний полімер вказана композиція

(13) A

(11) 37757

(19) UA

містить полівінілпіролідон і/або поліетиленоксид., як антиоксидант - Трилон Б. Як інтерферон у відомій композиції використовують рекомбінантний (або генно-інженерний) α -, β - або γ -інтерферон. Одержаний за плазмідозалежною технологією, де сімпліфікатором цільового гена слугують плазмиди. Але така фармацевтична композиція поступається фармацевтичним композиціям з використанням природного інтерферону за біологічною активністю, що обумовлено як властивостями самого інтерферону так і необхідністю використання антиоксидантів. Зокрема виготовлення інтерферону за плазмідною технологією пов'язане з необхідністю ренатурації денатурованих молекул інтерферону, під час якої частково відбувається утворення неправильних мономерних форм рекомбінантного інтерферону, виникнення його олігомерних структур. Навіть високий ступінь очистки не забезпечує одержання такого інтерферону без згаданих мономерних форм.

Найбільш близькою є фармацевтична композиція антивірусної, антипроліферативної та імунomodуючої дії у формі ліофілізату, одержаного з водного розчину, що містить інтерферон, хлорид натрію, буферну суміш у вигляді суміші фосфатів та поліглюкін (RU, патент, № 2095081, М.кл. А61К 38/21, 9/08). Композиція характеризується високою специфічною активністю і задовільною стабільністю, але як інтерферон використовують α - або γ -інтерферон людини, який дуже дорогий і, крім того, існує небезпека контамінації вірусами.

Найбільш близьким є також спосіб одержання фармацевтичної композиції антивірусної, антипроліферативної та імунomodуючої дії у формі ліофілізату, який включає приготування водного розчину, що містить інтерферон, хлорид натрію, буферну суміш у вигляді суміші фосфатів та поліглюкін, заморожування розчину (-40°C) і ліофільне сушіння (RU, патент, № 2095081, М.кл. А61К 38/21, 9/08). Ліофільне сушіння проводять таким чином: через 3-4 години після набору вакууму піднімають температуру до кімнатної зі швидкістю $0,5^{\circ}\text{C}/\text{год}$ і через 2-3 години знімають вакуум.

Відомий спосіб дозволяє одержати фармацевтичну композицію антивірусної, антипроліферативної та імунomodуючої дії з високою специфічною активністю і задовільною стабільністю, але в її склад входить інтерферон людини.

Задача винаходу полягає у створенні фармацевтичної композиції антивірусної, антипроліферативної та імунomodуючої дії, яка за рахунок використання інтерферону, одержаного за допомогою бактеріофага, і визначення складу і співвідношення компонентів є безпечною по відношенню контамінації вірусами при і високій специфічній активності і тривалій стабільності. Термін зберігання запропонованої композиції - до 36 міс.

Задачею винаходу є також створення способу одержання фармацевтичної композиції, в якому за рахунок використання інтерферону, одержаного за допомогою бактеріофага, і підбору умов ліофілізації забезпечується одержання стабільної високо-специфічної композиції, безпечної по відношенню контамінації вірусами при її використанні.

Поставлена задача вирішується фармацевтичною композицією антивірусної, антипроліферативної і імунomodуючої дії у формі ліофіліза-

ту, одержаного з водного розчину, що містить інтерферон, хлорид натрію, буферну суміш у вигляді суміші фосфатів та поліглюкін, в якій як інтерферон міститься α -2b-інтерферон, одержаний за допомогою рекомбінантної плазмиди рIF 14 з двома генами інтерферону, що заражена фагом лямбда лямбда λ C1857 $Q_{am117}R_{am54}$, при такому вмісті компонентів у 1 мл водного розчину для ліофільного сушіння :

α -2b-інтерферон, МО	1×10^5 - 6×10^6
хлорид натрію, мг	8,9-9
поліглюкін 6%, мг	4,8-6
буферна суміш до рН	6,0-6,9
розчину	

Поставлена задача вирішується також способом одержання фармацевтичної композиції антивірусної, антипроліферативної і імунomodуючої дії у формі ліофілізату, що включає приготування водного розчину, що містить інтерферон, хлорид натрію, буферну суміш у вигляді суміші фосфатів та поліглюкін, заморожування одержаного розчину і ліофільне сушіння, в якому при приготуванні розчину використовують α -2b-інтерферон, одержаний за допомогою рекомбінантної плазмиди рIF 14 з двома генами інтерферону, що заражена фагом лямбда лямбда λ C1857 $Q_{am117}R_{am54}$, заморожування вказаного розчину здійснюють протягом 30-48 годин до температури (-45)-(-60) $^{\circ}\text{C}$, а ліофільне сушіння ведуть при підвищенні температури від (-40) до 30 - 34°C протягом 30-48 годин.

Авторами експериментальне була одержана лікарська форма, яка завдяки всієї сукупності ознак - як складу так і умовам одержання - є не контамінованою інфекційними агентами і при цьому має високу активність і стабільність. На відміну від плазмідної технології добування α -2b-інтерферону, одержаний за допомогою рекомбінантної плазмиди рIF 14 з двома генами інтерферону, що заражена фагом лямбда лямбда λ C1857 $Q_{am117}R_{am54}$, ґрунтується на використанні як сімпліфікатора цільового гена бактеріофага. (SU, авторське свідоцтво, № 1593231). Синтез організований таким чином, що інтерферон накопичується поза клітиною, в культуральному середовищі. Тому при його добуванні відсутні операції денатурації білків та ренатурації молекул інтерферону, що впливає на специфічну активність рекомбінантного α -2b-інтерферону. Поліглюкін використовується у медичній практиці як препарат гемодинамічної дії. Його суттєва стабілізуюча дія відома тільки по відношенню до лейкоцитарного інтерферону людини. Авторами було встановлено, що при невеликому зміщенні рН розчину у бік кислотності і при визначених режимах заморожування і ліофільного сушіння поліглюкін ефективно стабілізує α -2b - інтерферон, одержаний за допомогою бактеріофага. Запропонована фармацевтична композиція антивірусної, антипроліферативної і імунomodуючої дії у формі ліофілізату є активною протягом трьох років.

У композиції використовуються:

α -2b -інтерферон, одержаний за допомогою рекомбінантної плазмиди рIF 14 з двома генами інтерферону, що заражена фагом лямбда лямбда λ C1857 $Q_{am117}R_{am54}$ (одержаний за згаданим авторським

свідоцтвом # 1593231) - високочистий препарат з питомою активністю $(1-2) \cdot 10^8$ МО на 1 мг білка;

поліглюкін - ФС 42-2023-83;

натрій хлористий - ФС 42-5272-95;

буферна суміш: калій фосфорнокислий однозаміщений - ГОСТ 4198-75; натрій фосфорнокислий двозаміщений - ГОСТ 4172-76.

Група винаходів реалізується таким чином.

Водний розчин для ліофільного сушіння готують таким чином.

Окремо розчиняють наважки натрію хлористого, натрію фосфорнокислого двозаміщеного, калію фосфорнокислого однозаміщеного та поліглюкіну з розрахунку на 1000 мл води для ін'єкцій:

натрій хлористий	8,9-9г
калій фосфорнокислий однозаміщений	0,023-0,027г
натрій фосфорнокислий двозаміщений	0,360-0,364г
поліглюкін (6%-ний розчин)	4,8-6г

Після стерилізуючої фільтрації приготовлені розчини змішують і додають стерильний розчин α -2b -інтерферон, одержаний за допомогою рекомбінантної плазмиди рIF 14 з двома генами інтерферону, що заражена фагом лямбда λ C1857 $Q_{am117}R_{am54}$ з розрахунку $1 \times 10^5 - 6 \times 10^6$ МО у 1 мл. рН суміші становить 6,0-6,9.

Одержаний розчин розливають в ампули або флакони по 0,5 мл, 1 мл, 2 мл. заморожують до температури $(-45)^{\circ}\text{C}$ - $(-60)^{\circ}\text{C}$ протягом 30-48 годин і подають на ліофільне сушіння. Ліофільне сушіння здійснюють, наприклад, витримуючи ампули чи флакони з вмістом на полицях ліофілізатора протягом години при температурі $(-40)^{\circ}\text{C}$ з наступним підвищенням температури - до температури $30-34^{\circ}\text{C}$ протягом 30-48 годин під вакуумом (60-70 Па).

Прикладі.

Приготування водного розчину для ліофільного сушіння. Окремо розчиняють наважки натрію хлористого, натрію фосфорнокислого двозаміщеного, калію фосфорнокислого однозаміщеного та поліглюкіну з розрахунку на 1000 мл води для ін'є-

кцій: натрій хлористий - 8,9 г; калій фосфорнокислий однозаміщений - 0,027 г; натрій фосфорнокислий двозаміщений 0,360 г; поліглюкін (6%-ний розчин) - 6 г. Після стерилізуючої фільтрації приготовлені розчини змішують і додають стерильний розчин 2b -інтерферон, одержаний за допомогою рекомбінантної плазмиди рIF 14 з двома генами інтерферону, що заражена фагом лямбда λ C1857 $Q_{am117}R_{am54}$ з розрахунку 1×10^5 МО у 1 мл. рН суміші становить 6.

Одержаний розчин розливають в ампули по 0,5 мл, 1 мл, 2 мл, заморожують до температури $(-60)^{\circ}\text{C}$ протягом 30 годин і подають на ліофільне сушіння. Ліофільне сушіння здійснюють, витримуючи ампули з вмістом на полицях ліофілізатора протягом години при температурі $(-40)^{\circ}\text{C}$ з наступним підвищенням температури до температури 34°C протягом 30 годин під вакуумом (60-70 Па).

Приклади 2-5.

Аналогічно були приготовлені інші композиції, конкретний склад і умови їх одержання вказані у таблиці 1, приклади 2-5.

Одержаний сухий препарат являє собою білий аморфний порошок із залишковою вологістю не більш як 5 %, добре розчинний у дистильованій воді. Після розчинення розчин прозорий, не опалесціє.

Біологічну активність одержаних лікарських форм визначали при порівнянні останніх з стандартним зразком 2nd WHO International Standard 1999 NIBSC Code No: 95/566. Відносна біологічна активність вказаних композицій, наведена у таблиці 2.

Як видно з таблиці 2, висока біологічна активність запропонованої композиції - 100-105 % відносно стандартного зразка - зберігається протягом трьох років. При тому, що активність запропонованої композиції знаходиться на тому рівні, що і при застосуванні композиції на основі нативного лейкоцитарного інтерферону, запропонована композиція є безпечною по відношенню контамінації вірусами. Крім того, запропонована композиція значно дешевша.

Таблиця 1

Приклади	Склад, на 1 мл розчину для ліофільного сушіння						Умови одержання: заморожування		ліофільне сушіння: підвищення t	
	α -2b- інтерферон, МО	6%-ний поліглюк. Мг	NaCl мг	KH ₂ PO ₃ мг	Na ₂ HPO ₃ мг	pH	протягом, год	до t, °C	протягом, год	до t, °C
1	1x10 ⁵	6,0	8,9	0,027	0,360	6	30	-60	30	34
2	1x10 ⁶	5,8	8,95	0,027	0,360	6,1	32	-60	35	30
3	3x10 ⁶	5,5	9	0,026	0,362	6,3	36	-60	40	34
4	3,2x10 ⁶	5,0	8,99	0,025	0,362	6,5	42	-45	48	32
5	6x10 ⁶	4,8	9	0,023	0,364	6,9	48	-45	48	32

Таблиця 2

Термін зберігання, міс.	Приклади Біологічна активність запропонованої композиції по відношенню до стандартного зразка (NIBSC Code No: 95/566), %				
	1	2	3	4	5
2	100	101	103	104	103
6	101	103	102	103	102
9	102	104	103	105	104
12	102	101	104	101	102
18	101	102	104	101	99
24	104	103	103	102	103
30	105	104	103	104	103
32	102	102	103	102	100
36	103	101	104	101	102

Проведено токсикологічне вивчення одержаних композицій, досліджені ембріотоксичні властивості, алергізувальна та імунотоксична дія, мутагенна та ДНК-пошкоджувальна активність, а також канцерогенна дія. У перелічених дослідженнях не виявлена пошкоджувальна дія препарату на основні органи та системи організму піддослідних тварин (миші, пацюки, кролики, собаки, мавпи).

Успішно завершилися клінічні випробування запропонованої фармацевтичної композиції у формі ліофілізату, в яких продемонстрована протівірусна, протипухлинна, імуномодуюча активність.

Запропонована фармацевтична композиція застосовувалась у комплексній терапії при гострих вірусних, бактеріальних та змішаних інфекцій, гострому і хронічному вірусному гепатиті В, гострих і хронічних септичних захворювань вірусної та бактеріальної природи, герпетичних інфекцій різної локалізації, папіломовірусних інфекцій, розсіяного склерозу, вірусних енцефалітів та енцефаломієлітів та деяких пухлин.

Спосіб застосування (шлях введення: внутрішньом'язове, інтраназальне, ендолімфатичне, парабульбарне) і дози визначалися захворюванням, станом, віком та іншими особливостями пацієнтів.

Так, склад за прикладом 1 використовували при лікуванні грипу та гострих респіраторних вірусних інфекцій.

Склад за прикладами 2-3 використовували при лікуванні генітальних інфекцій, хламідіозі, банальних та підошовних бородавок, розсіяного склерозу, увеальної меланоми, гострому гепатиту В, папіломи вірусного генезу, розсіяного енцефаломієліту, оперезувального лишаю, раку молочної залози, шлунку, товстого кишечника, сечового міхура, Саркоми Капоші, базально-клітинного раку волохатоклітинної лейкемії.

Склад за прикладом 4-5 використовувались при лікуванні хронічного гепатиту В, С, септичного стану в оперативній гінекології, хронічного мієлолейкозу, раку яєчника та нирок, множинної мієломи та меланоми шкіри.

Результати клінічних випробувань запропонованої композиції засвідчили позитивний терапевтичний ефект, аналогічний тому, який спостерігається при застосуванні нативного лейкоцитарного інтерферону, а саме полегшення протікання хвороб, скорочення курсу лікування, сприяння іншим лікувальним процедурам і інш. Але запропонована композиція є більш безпечною, оскільки при її застосуванні відсутня небезпека контамінації вірусами.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
