

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 163280 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4885/86

(51) Int.Cl.5 A 61 K 37/66

(22) Indleveringsdag: 13 okt 1986

(41) Alm. tilgængelig: 16 apr 1987

(44) Fremlagt: 17 feb 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 15 okt 1985 CH 4433/85

(71) Ansøger: *F. Hoffmann-La Roche AG; Grenzacherstrasse 124-184; 4002 Basel, CH

(72) Opfinder: Harald *Gallati; CH, Inge *Pracht; CH

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft A/S

(54) **Stabiliseret interferonpræparat, fremgangsmåde til dets fremstilling og anvendelse af præparatet**

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 5658/82 (= DK 158873 B)

Andre publikationer: Cryobiology, vol 16 (1979), 301-314

(57) Sammen drag

4885-86

Humant interferon stabiliseres i opløsninger med phosphat og/eller polyphosphat.

DK 163280 B

- Den foreliggende opfindelse angår stabiliserede interferonpræparater der er ejendommelige ved at de indeholder en phosphatpuffer, der sikrer en pH-værdi på 6,0-9,0, især en pH-værdi på ca. 7,5, og som har en phosphatkonzentration på 500-1000 mmol/liter, især 1000 mmol/-
- 5 liter og/eller en koncentration af polyphosphat på 25-100 g/liter, især 50 g/liter, en fremgangsmåde til fremstilling deraf samt anvendelse af et sådant præparat til fremstilling af et præparat til terapi eller profylakse af sygdomme, især til terapi eller profylakse af virusinfektioner, immunregulatoriske anomalier eller neoplasier.
- 10 Til interferoner regnes en gruppe proteiner, som findes i kroppen og har antiviral og immunregulerende virkning. Den antivirale virkning opnås imidlertid ikke ved en direkte indflydelse på selve viraene, men ved indvirkning på disses målceller med henblik på en beskyttelse mod virusinfektionen. Ud over den antivirale aktivitet kan interfero-
- 15 nerne have iagttagelige virkninger på kræftsvulster, som gør dem egnede til anvendelse inden for kræftterapi, og de påvirker kroppens eget immunsystem, idet de fx aktiverer makrofager og NK-celler og forstærker ekspressionen af forskellige immunologisk betydningsfulde bestanddele i cellemembranen.
- 20 Interferoner (IFN- α , - β og - γ) kan i dag takket være rekombinant DNA-teknologi fremstilles ad mikrobiel vej i mængder, som tidligere trods de største anstrengelser ikke kunne tilvejebringes ved isolering fra naturligt materiale (leukocyter, fibroblaster, lymfocytter) og oprensning.
- 25 Først denne nye teknologi har derfor åbnet vej for den intensive kliniske afprøvning og eventuelle brede terapeutiske anvendelse af interferonerne og muliggør en tilstrækkelig forsyning med de aktive stoffer til personer, der skal behandles.
- 30 Blandt humaninterferonerne er IFN- γ det mest ustabile protein, hvis biologiske aktivitet hurtigt går tabt ved lagring, frysning eller lyofilisering. Denne ustabilitet vanskeliggør i betydeligt omfang fremstillingen, oprensningen, lagringen og den terapeutiske anvendelse af IFN- γ . Stabiliseringen af dets biologiske aktivitet spiller derfor en særlig vigtig rolle. I sammenligning med IFN- γ er humanin-

terferonerne α og β relativt stabile proteiner og kan oprenses, lagres og anvendes til terapi uden noget nævneværdigt tab af biologisk aktivitet.

- Til stabilisering af interferoner, især IFN- γ , er der tidligere
5 overvejet forskellige hjælpestoffer. Således beskrives stabilisering af interferoner med propylenglycol i USA patentskrift nr. 4.483.849. Det har dog vist sig, at propylenglycol ikke kan anvendes effektivt til stabilisering af rekombinant IFN- γ . Også stabilisering af IFN- γ med bovint serumalbumin (Rinderknecht et al., J. Biol. Chem. 259,
10 6790-6797 [1984]) er blevet prøvet og har ikke vist sig at være effektiv. Stabilisering af IFN- γ ved hjælp af 0,1% BSA og 0,5% gelatine (Devos et al., J. Interferon Res. 4, 461-468 [1984]) er ligeledes kendt. For at forhindre et aktivitetstab må sådanne præparater dog til stadighed opbevares ved -70°C.
- 15 Fra DK 5658/82 og Cryobiology, vol. 16 (1979), 301-304 kendes interferonpræparater, der indeholder et phosphatpuffersystem med en pH-værdi på henholdsvis 6,5-8 og 7. Desuden har phosphatpuffersystemet i ovennævnte reference fra Cryobiology, en phosphatkonzentration på 0,1M. Imidlertid er der i ingen af ovennævnte referencer nogen hen-
20 visning eller antydning til, at et phosphatpuffersystem med høj phosphatkonzentration på 500-1000 mmol/liter og/eller polyphosphat kan bevirke en interferonstabilisering.

- Ifølge opfindelsen har det vist sig, at interferoner i nærværelse af en høj koncentration af phosphat og/eller polyphosphat udviser en
25 fortræffelig stabilitet, således at interferonerne kan opbevares i opløsninger ved 2-8°C uden nævneværdigt tab af biologisk og immunologisk aktivitet.

- Den foreliggende opfindelse angår således et stabiliseret interferonpræparat, der er ejendommeligt ved, at det indeholder en phosphat-
30 puffer der sikrer en pH-værdi på 6,0-9,0 især en pH-værdi på ca. 7,5, og som har en phosphatkonzentration på 500-1000 mmol/liter, især 1000 mmol/liter og/eller en koncentration af polyphosphat på 25-100 g/liter, især 50 g/liter, samt en fremgangsmåde til fremstilling deraf,

ved hvilken en interferonopløsning tilsættes phosphat og/eller polyphosphat i overensstemmelse med ovenstående.

Stabiliseringen af præparatet ifølge opfindelsen kan anvendes på alle interferoner eller polypeptider med interferonlignende biologiske egenskaber samt på blandinger, der indeholder en interferon eller et sådant polypeptid. Fortrinsvis anvendes den med humaninterferon. Humaninterferonet kan være et naturligt eller rekombinant leukocytinterferon (IFN- α), fibroblastinterferon (IFN- β) eller immuninterferon (IFN- γ). Også såkaldte hybride interferoner, hvor fragmenter af to eller flere native interferonarter er forbundet, kan stabiliseres ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Et særlig foretrukket humaninterferon i nærværende sammenhæng er IFN- γ , især rekombinant IFN- γ , fortrinsvis IFN- γ D0 eller IFN- γ D3. Betegnelserne D0 og D3 tjener til skelnen mellem de sidstnævnte interferoner, idet D0 betegner et rIFN- γ , hvis N-terminale aminosyresekvens begynder med Cys-Tyr-Cys eller Met-Cys-Tyr-Cys, hvorimod der ved D3 forstås et rIFN- γ , som er forkortet med Cys-Tyr-Cys, og hvis N-terminale aminosyresekvens begynder med Gln eller Met-Gln.

Interferonindholdet i præparaterne ifølge opfindelsen er ikke kritisk. Koncentrationsområdet strækker sig over flere tierpotenser, og den øverste værdi begrænses i det væsentlige kun af det pågældende interferons opløselighed. Med hensyn til humant IFN- γ kan der fx blive tale om koncentrationer på op til 10^8 enheder (E)/ml, idet et foretrukket område er $4 \cdot 10^3$ - ca. 10^6 E/ml.

Præparaterne ifølge opfindelsen kan anvendes til fremstilling af et farmaceutisk præparat til terapi eller profylakse af sygdomme, især til terapi eller profylakse af virusinfektioner og immunregulatoriske anomalier eller neoplasier.

Phosphatpuffersystemet er således indrettet, at det opretholder en pH på 6,0-9,0, fortrinsvis 7,5, og har en phosphatkonzentration på 500-1000 mmol/liter, fortrinsvis 1000 mmol/liter. Som phosphatkilde kan der anvendes kaliumphosphater og natriumphosphater, fortrinsvis dinatriumhydrogenphosphat og mononatriumhydrogenphosphat. Et særlig foretrukket phosphatpuffersystem er således tilpasset, at der sikres

en pH på ca. 7,5 og har en phosphatkonzentration på 500-1000 mmol/liter, især 1000 mmol/liter, samt 25-100 g/liter, fortrinsvis 50 g/liter, polyphosphat, især kaliumpolyphosphat.

Polyphosphatopløsningerne med pH 7,5 anvendes i en koncentration på
 5 25-100 g/liter, fortrinsvis 50 g/liter polyphosphat, især kaliumpolyphosphat.

Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempler.

De i eksemplerne anvendte kemikalier var til analysebrug eller af højeste renhed.

- 10 Alle de interferoner, der kan stabiliseres ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, især det i eksemplerne anvendte rekombinante IFN- γ D3 kan fås i ren form ved kendte, i litteraturen beskrevne fremgangsmåder eller ved fremgangsmåder, som er åbenlyse for fagfolk.

- 15 Til bestemmelse af den immunologiske aktivitet af det rekombinante IFN- γ D3 blev der anvendt en enzymimmunologisk test (IFN- γ -EIA), der svarer til den enzymimmunologiske test, som er beskrevet af H. Gallati til bestemmelse af humant leukocytinterferon i J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 907-914 (1982).

- 20 Til stabilitetsanalyse af IFN- γ blev opløsninger med 4000-10000 E/ml IFN- γ og de tilsætningsstoffer, der skulle undersøges, inkuberet i glasampuller ved 37°C og efter visse tidsrum blev den immunologiske aktivitet af IFN- γ , der var tilbage i den inkuberede IFN- γ -opløsning, bestemt ved IFN- γ -EIA.

- 25 Opfindelsen belyses nærmere under henvisning til tegningen, hvor fig. 1 viser stabiliteten af den immunologiske aktivitet af IFN- γ afhængig af puffersystemet og pH-værdi. 6000 E/ml IFN- γ blev sat til hver af 0,1 mol/liter natriumacetat pH 2,0-6,0 (■), natriumphosphat, pH 5,5-8,0 (●), og i TRIS/acetat, pH 7,2-9,0 (▲) og inkuberet i lukkede glasampuller ved 37°C i 2 dage. Den immunologiske aktivitet
 30 af IFN- γ blev bestemt før inkubationen samt 1 og 2 dage efter inkubationen ved IFN- γ -EIA.

Fig. 2 viser stabiliteten af den immunologiske aktivitet af IFN- γ i 500 mmol/liter natriumphosphat afhængig af pH-værdien. 10000 E/ml IFN- γ blev sat til 500 mmol/liter natriumphosphatpuffer med en pH på 4,5-10 og inkuberet i glasampuller i 7 dage ved 37°C. Efter 3 dages inkubation (●—●) og efter 7 dages inkubation (○—○) blev den immunologiske aktivitet bestemt ved IFN- γ -EIA.

Fig. 3 viser stabiliteten af den immunologiske aktivitet af IFN- γ ved pH 7,5 afhængig af natriumphosphatkonzentrationen. 6000 E/ml IFN- γ sættes til opløsninger, som var pufret med forskellige natriumphosphatkonzentrationer og indstillet til pH 7,5. IFN- γ -opløsningerne blev inkuberet i glasampuller i 7 dage ved 37°C. Efter denne inkubation blev den immunologiske aktivitet i IFN- γ -opløsningerne bestemt ved IFN- γ -EIA.

Fig. 4 viser stabiliteten af den immunologiske aktivitet af IFN- γ afhængig af polyphosphatkonzentrationen i opløsningen. 4500 E/ml IFN- γ blev sat til opløsninger, som indeholdt forskellige koncentrationer af kaliumpolyphosphat, pH 7,5. Disse IFN- γ -opløsninger blev inkuberet i glasampuller i 16 dage ved 37°C. Efter 3 dages (●—●) og 16 dages inkubation (○—○) blev den immunologiske aktivitet af IFN- γ i de pågældende opløsninger bestemt ved IFN- γ -EIA.

Fig. 5 viser stabiliteten af den immunologiske aktivitet af IFN- γ afhængig af polyphosphatkonzentrationen i nærværelse og fraværelse af natriumphosphat. 8000 E/ml IFN- γ blev sat til opløsninger, der indeholdt forskellige koncentrationer af kaliumpolyphosphat, pH 7,5 (○—○). Desuden blev nogle af opløsningerne pufret med 1000 mmol/liter natriumphosphat, pH 7,5 (●—●). De i denne figur viste IFN- γ -aktiviteter blev målt efter 20 dages inkubation ved 37°C ved IFN- γ -EIA.

Fig. 6 viser sammenlignende stabilitetstest med IFN- γ i forskellige opløsningsmidler og ved forskellige temperaturer. 4000 E/ml IFN- γ sættes til hver af

- a) 20 mmol/liter natriumphosphat med 9 g/liter NaCl og 0,25 g/liter thimerosal (natrium-ethylmercurithiosalicylat, fra Fluka), pH 7,5 (□□).
- b) 20 mmol/liter natriumphosphat med 9 g/liter NaCl, 5 g/liter BSA og 0,25 g/liter Thimerosal, pH 7,5 (■), og
- c) 1000 mmol/liter natriumphosphat, 50 g/liter kaliumpolyphosphat og 0,25 g/liter Thimerosal, pH 7,5 (ΔΔ, ○, ●).

Disse IFN- γ -opløsninger blev inkuberet i glasampuller i 8 dage ved 2-8°C, 22°C og 37°C. Den immunologiske aktivitet af IFN- γ blev bestemt med bestemte tidsintervaller ved IFN- γ -EIA.

EKSEMPEL 1

I en første forsøgsrække blev IFN- γ -stabiliteten undersøgt i forskellige puffersystemer og ved forskellige pH-værdier. 6000 E/ml IFN- γ blev sat til hver af 0,1 mol/liter natriumacetat, pH 2,0-6,0, natriumphosphat, pH 5,5-8,0 og TRIS/acetat, pH 7,2-9,0 og inkuberet i 2 dage i lukkede glasampuller ved 37°C. IFN- γ 's immunologiske aktivitet blev bestemt før inkubationen samt 1 og 2 dage efter inkubationen ved IFN- γ -EIA. De i fig. 1 viste resultater viser generelt en dårlig stabilitet af den immunologiske aktivitet af IFN- γ i 0,1 mol/liter af de undersøgte puffersystemer. De bedste resultater blev opnået med phosphatpuffersystemet.

EKSEMPEL 2

I en yderligere forsøgsrække blev IFN- γ -stabiliteten i 500 mmol/liter natriumphosphat afhængig af pH-værdi (4,5-10) undersøgt. 10.000 E/ml IFN- γ blev sat til hver af 500 mmol/liter natriumphosphatpuffer, pH 4,5-10, og inkuberet i glasampuller i 7 dage ved 37°C. Efter 3 og 7 dages inkubation blev den immunologiske aktivitet bestemt ved IFN- γ -EIA. Det blev fastslået, at der på den ene side generelt kan opnås en væsentligt forbedret stabilitet ved den forhøjede phosphatkonzentra-

tion, og at IFN- γ på den anden side inden for det undersøgte pH-
område på 4,5-10 er mest stabilt ved pH 7,5 (fig. 2). Således kunne
man efter 7 dages inkubation ved 37°C med en med 500 mmol/liter
natriumphosphatpufret opløsning med en pH på 7,5 endnu genfinde 70%
5 af den oprindelige immunologiske aktivitet af det anvendte IFN- γ .

EKSEMPEL 3

På grund af de overraskende resultater i eksempel 2 blev indvirknin-
gen af natriumphosphatkonzentration ved pH 7,5 på IFN- γ -stabiliteten
ved en inkubationstemperatur på +37°C undersøgt. 6000 E/ml IFN- γ blev
10 sat til opløsninger, der var pufret med forskellige natriumphosphat-
konzentrationer og indstillet til pH 7,5. Disse IFN- γ -opløsninger
blev inkuberet i glasampuller i 7 dage ved 37°C. Efter denne inkuba-
tionstid blev den immunologiske aktivitet i IFN- γ -opløsningerne be-
stemt ved IFN- γ -EIA. Resultaterne, der er vist i fig. 3, bekræfter de
15 i fig. 1 og 2 viste undersøgelsesresultater, og viser en betydelig
forbedring af IFN- γ -stabiliteten med tiltagende phosphatkonzentra-
tion.

EKSEMPEL 4

Da natriumphosphatkonzentrationen af opløselighedsgrunde ikke væ-
20 sentligt kan overstige 1000 mmol/liter (udkrystallisation ved 4°C),
blev indvirkningen af polyphosphat på IFN- γ -stabiliteten ved 37°C
undersøgt i en yderligere forsøgsrække. 4500 E/ml IFN- γ blev sat til
opløsninger, som indeholdt forskellige koncentrationer af kaliumpo-
lyphosphat, pH 7,5. Disse IFN- γ -opløsninger blev inkuberet i glasam-
25 puller i 16 dage ved 37°C. Efter 3 og 16 dage blev den immunologiske
aktivitet af IFN- γ i de pågældende opløsninger bestemt ved IFN- γ -EIA.
Resultaterne (fig. 4) viser en lige så god effekt som ved høje natri-
umphosphatkonzentrationer.

EKSEMPEL 5

For at opklare indvirkningen af en kombination af kaliumpolyphosphat og natriumphosphat på stabiliteten af IFN- γ blev 8000 E/ml IFN- γ sat til opløsninger, som indeholdt forskellige koncentrationer af kaliumpolyphosphat, pH 7,5. Desuden blev nogle af opløsningerne pufret med 1000 mmol/liter natriumphosphat, ved pH 7,5. Resultaterne (fig. 5) viser en optimal stabilisering af IFN- γ med en kombination af 1000 mmol/liter natriumphosphat, pH 7,5, og 25-100 g/liter, fortrinsvis 50 g/liter polyphosphat.

10 EKSEMPEL 6

Endelig blev stabiliteten af IFN- γ i forskellige opløsningsmidler undersøgt. Således blev 4000 E/ml IFN- γ sat til hver af a) 20 mmol/liter natriumphosphat med 9 g/liter NaCl og 0,25 g/liter Thimerosal, pH 7,5, b) 20 mmol/liter natriumphosphat med 9 g/liter NaCl, 5 g/liter BSA og 0,25 g/liter Thimerosal, pH 7,5, og c) 1000 mmol/liter natriumphosphat, 50 g/liter kaliumpolyphosphat og 0,25 g/liter Thimerosal, pH 7,5. Disse IFN- γ -opløsninger blev inkuberet i glasampuller i 8 dage ved 2-8°C, 22°C og 37°C. Den immunologiske aktivitet af IFN- γ blev bestemt ved bestemte tidsintervaller. Som vist i fig. 6 viser sammenligningen af lagerstabiliteten af IFN- γ i PBS, PBS-BSA samt i 1000 mmol/liter natriumphosphat/50 g/liter kaliumpolyphosphat, pH 7,5, at den immunologiske aktivitet af IFN- γ i PBS og i PBS-BSA ved en inkubationstemperatur på 22°C næsten fuldstændig er gået tabt efter allerede 1 dag, hvorimod den i phosphat/polyphosphatopløsningen næsten er fuldstændig bevaret efter 8 dages inkubation ved 4°C, 22°C og 37°C.

PATENTKRAV

1. Stabiliseret interferonpræparat,
k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder en phosphatpuffer, der sikrer en pH-værdi på 6,0-9,0 især en pH-værdi på ca. 7,5, og som har en phosphatkonzentration på 500-1000 mmol/liter, især 1000 mmol/-

liter og/eller en koncentration af polyphosphat på 25-100 g/liter, især 50 g/liter.

2. Præparat ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at phosphatpuffersystemet indeholder
5 dinatriumhydrogenphosphat og mononatriumhydrogenphosphat.

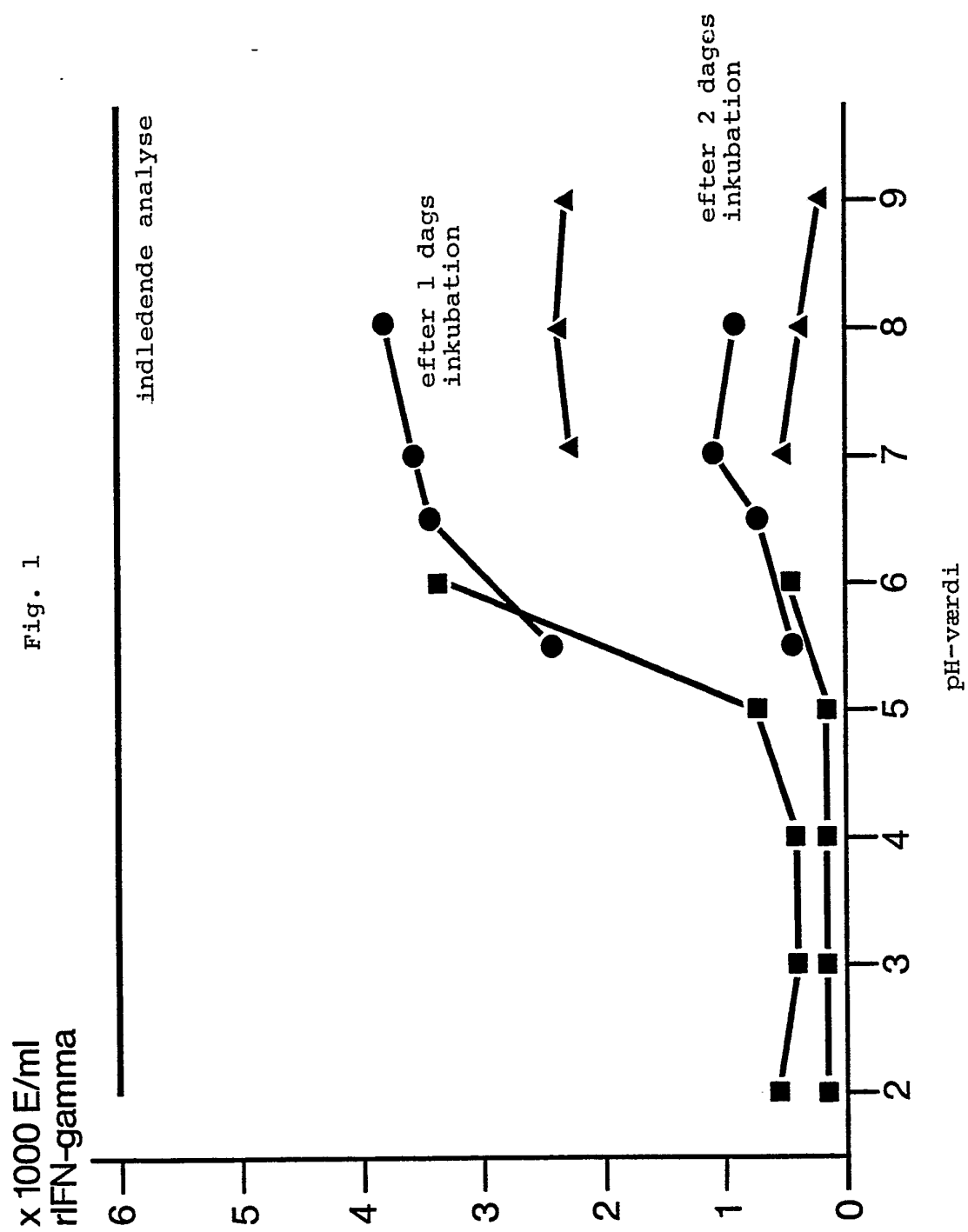
3. Præparat ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder kaliumpolyphosphat.

4. Præparat ifølge et hvilket som helst af kravene 1-3,
k e n d e t e g n e t ved, at interferonet er et humaninterferon, fx
10 et naturligt eller rekombinant IFN- γ såsom rIFN- γ D0 eller rIFN- γ D3.

5. Præparat ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder rekombinant human IFN- γ
D3 i 1000 mmol/liter natriumphosphatpuffer, pH 7,5 og 50 g/liter
kaliumpolyphosphat.

15 6. Fremgangsmåde til fremstilling af et præparat ifølge et hvilket
som helst af kravene 1-5,
k e n d e t e g n e t ved, at en interferonopløsning tilsættes phosphat og/eller polyphosphat i overensstemmelse med krav 1.

7. Anvendelse af et præparat ifølge et hvilket som helst af kravene
20 1-5 til fremstilling af et farmaceutisk præparat til terapi eller
profylakse af sygdomme, især til terapi eller profylakse af virusinfektioner, immunregulatoriske anomalier eller neoplasier.



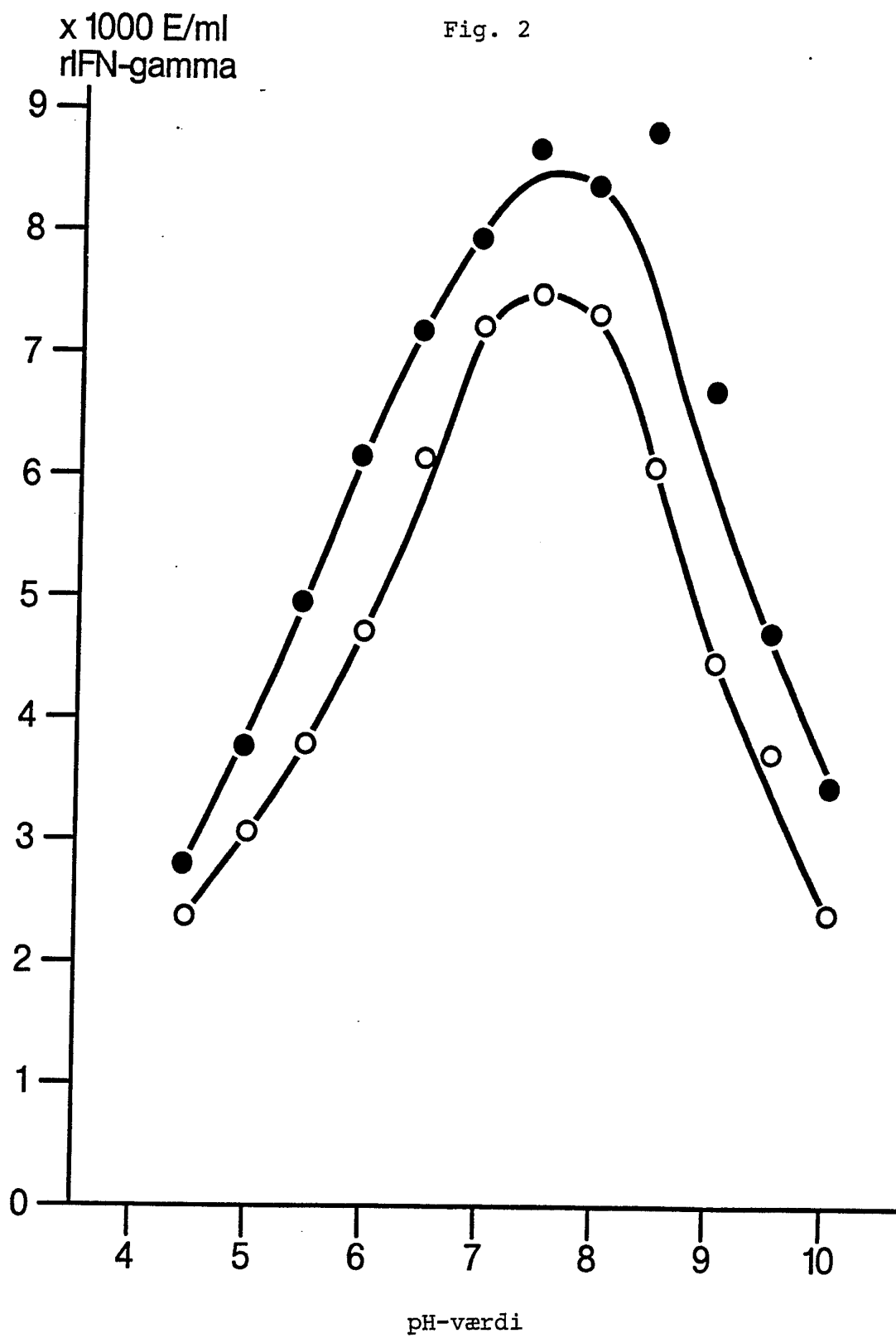
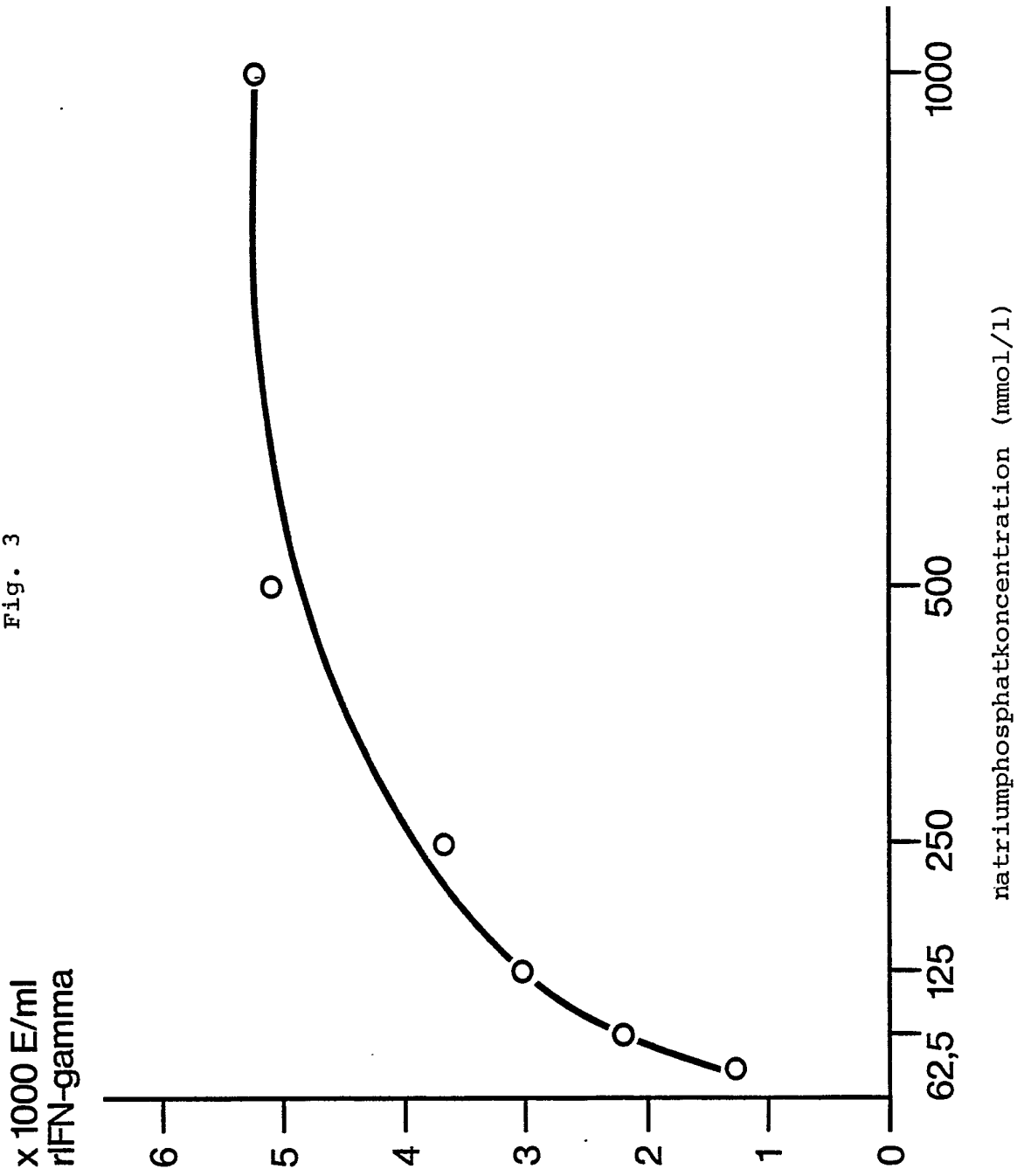


Fig. 3



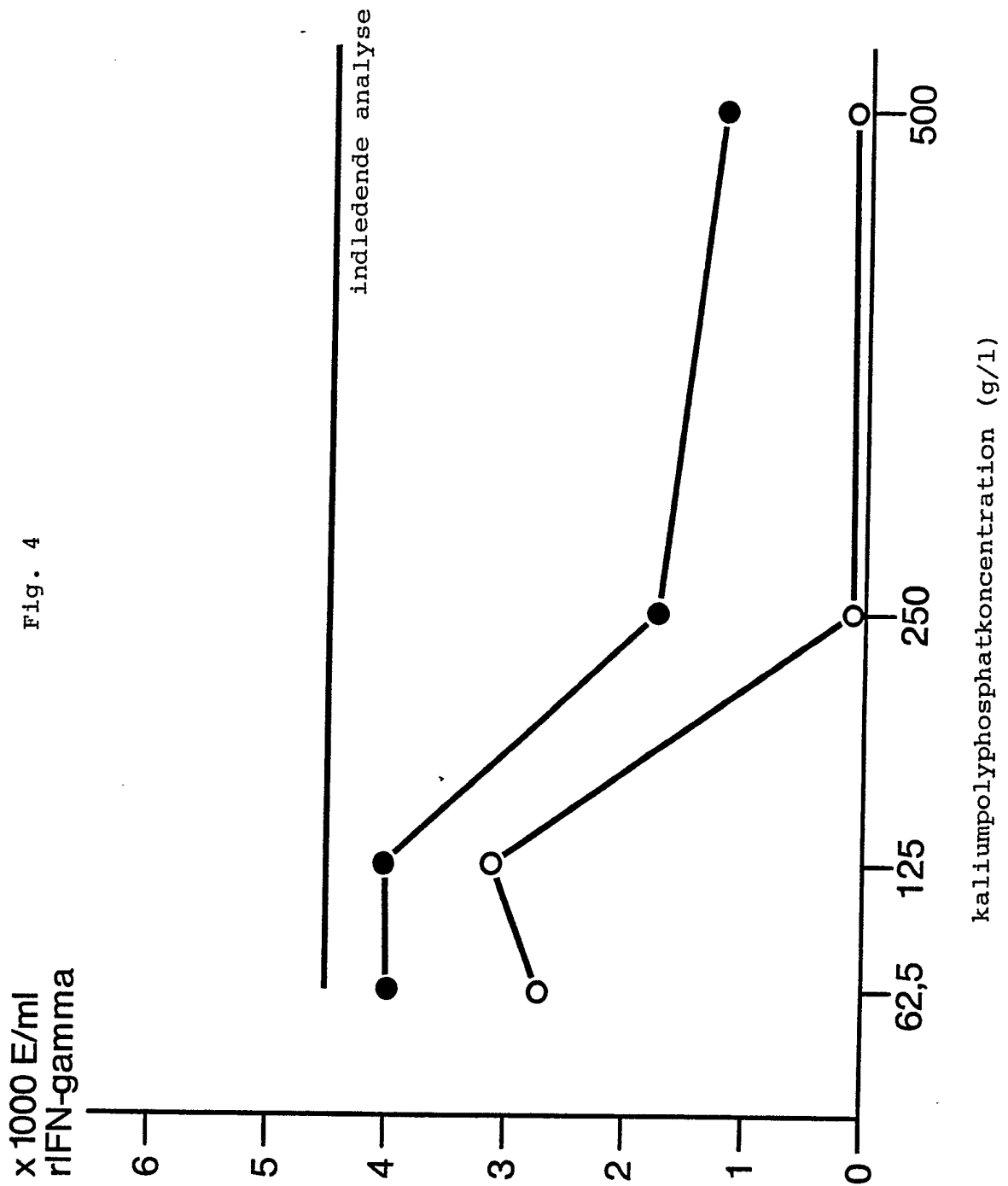


Fig. 5

