



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) Nr. 161036

(51) Int. Cl.⁴ A 61 K 45/02, C 07 K 15/26

(21) Patentsøknad nr. 824285

(22) Inngivelsesdag 20.12.82

(24) Lopedag 20.12.82

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(71)(73) Søker/Patenthaver **SCHERING CORPORATION,**
2000 Galloping Hill Road,
Kenilworth, NJ 07033,
USA.

(86) Internasjonal søknad nr. -

(86) Internasjonal inngivelsesdag -

(85) Videreføringsdag -

(41) Alment tilgjengelig fra 24.06.83

(44) Utlegningsdag 20.03.89

(72) Oppfinner **HENRY KING HONG KWAN,** Summit, NJ,
USA.

(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor A-S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 23.12.81, US, nr. 334052,
19.11.82, ZA, nr. 82/8580.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FREMGANGSMÅTE VED FREMSTILLING AV ET FRYSETØRRET,
FARMASØYTISK INTERFERONPREPARAT.**

(57) Sammendrag

Interferonpreparater med spesielt forbedret stabilitet er i form av et lyofilisert farmasøytisk preparat for rekondisjonering med sterilt vann, og omfatter interferon, en aminosyre eller derivat derav valgt fra glycin, α -alanin og farmasøytisk godtagbare salter derav, og et forlikelig puffersystem.

(56) Anførte publikasjoner Fransk (FR) patent nr. 2505657,
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, July 1979, Vol 16, No 1, p 49-55,
Methods in Enzymology, Vol 78, Part A, 1981, p 593-595.

Denne oppfinnelse angår en fremgangsmåte ved fremstilling av et frysetørret, farmasøytisk interferonpreparat for rekonstituering med sterilt vann. Interferonpreparatet er anvendelig for tilberedelse av sterile oppløsninger, særlig for injeksjon eller for anvendelse som nesespray, neseoppløsning eller oppløsning for øyebehandling, eller for fremstilling av salver, hvor interferon er den aktive legemiddelbestanddel.

Interferon er meget virksomt ved behandling av et bredt utvalgt av sykdomstilstander, spesielt forskjellige typer virusinfeksjoner.

Den velkjente ustabilitet av interferonoppløsninger gjør det vanskelig å fremstille stabile preparater for klinisk eller veterinær bruk. Følgelig har det vært foreslått å pakke interferon i frysetørret form for rekonstituering med sterilt vann. Et slikt preparat vil inneholde en buffer som vil gi den rekonstituerte oppløsning en for farmasøytiske formål godtagbar pH-verdi og dessuten en tilstrekkelig mengde natriumklorid til at den rekonstituerte oppløsning blir isotonisk. Selv i et slikt frysetørret preparat oppviser imidlertid interferonet meget begrenset og utilstrekkelig stabilitet.

Det har nu overraskende vist seg at innlemmelse av visse aminosyrer i frysetørrede interferonpreparater kan gi et frysetørret interferonpreparat med betydelig forbedret stabilitet. Videre er det på denne måte mulig å oppnå også andre fordeler, f.eks. å lette selve frysetørringstrinnet, lette rekonstitueringen av det frysetørrede preparat og å forbedre produktets utseende (spesielt blir dette mindre farget).

Med oppfinnelsen tilveiebringes det således en fremgangsmåte ved fremstilling av et frysetørret, farmasøytisk interferonpreparat for rekonstituering med sterilt vann, hvor en steril vannoppløsning av interferonet og et forlikelig buffersystem, som eventuelt er tilsatt albumin, frysetørres, og det som interferon anvendes et humant interferon, spesielt et leukocyttinterferon eller et fibroblastinterferon, for-

161036

trinnsvis α -interferon eller β -interferon, mer foretrukket α -2-interferon eller α -1-interferon, idet interferonet desuten fortrinnsvis er fremstilt ved rekombinant-DNA-metoder. Den nye fremgangsmåte er karakteristisk ved at det i oppløsningen, før frysetørringen foretas, innføres en aminosyre valgt blant glycin og α -alanin, idet aminosyren innføres i en mengde av fra 5 til 150 mg, fortrinnsvis fra 5 til 25 mg, pr. $1 \times 10^4 - 5 \times 10^8$ internasjonale enheter (I.U.) av interferonet.

10 Aminosyrene glycin og α -alanin anvendes aller helst i en mengde av fra 7 til 22 mg pr. 1×10^6 til 1×10^8 I.U. interferon.

Det humane interferon kan være et α -interferon, et β -interferon eller et γ -interferon. En rekke α -interferonarter er kjent, og disse betegnes vanligvis med et tall etter den greske bokstav. Innbefattet er også de såkalte hybridinterferoner hvori fragmenter av to eller flere naturlig forekommende interferonarter er forenet, se f.eks. EPA 51873, hvor hybrider av α -interferoner er beskrevet. Et eksempel 20 på et slikt hybrid α -interferon omfatter de første 92 aminosyrer av α -1-interferon bundet til et fragment inneholdende aminosyrer 92-165 av α -2-interferon (carboxy-terminaldel). En særlig foretrukken form av α -interferon for anvendelse i preparatene er α -2-interferon, særlig α -2-interferon fremstilt ved rekombinante DNA-metoder, f.eks. som beskrevet av 25 Nagata et al. i "Nature", bind 284, sider 316-320 (1980). En annen foretrukken form av α -interferon for anvendelse i preparatene er α -1-interferon, særlig α -1-interferon fremstilt ved rekombinante DNA-metoder.

30 Den spesifikke aktivitet av α -2-interferon anvendt i preparatene bør fortrinnsvis være på minst 5×10^7 I.U./mg protein (av interferonbestanddelen), fortrinnsvis minst 1×10^8 I.U./mg protein. Den spesifikke aktivitet kan bestemmes ved å måle den antivirale aktivitet sammenlignet med NIH-referansestandard og ved å måle det totale proteininnhold 35 under anvendelse av standardmetoder (f.eks. Lowry-metoden).

Likeledes er høy spesifikk aktivitet ønskelig for klinisk anvendelse av andre interferoner. Ved høye nivåer av spesifikk aktivitet har det hittil vært særlig vanskelig å opprettholde en ønsket stabilitet.

Som buffersystemet i det fremstilte preparat velges ett som er fysiologisk forlikelig og som opprettholder en ønsket pH i den rekonstituerte oppløsning og også i oppløsningen før frysetørring. pH-verdien av det rekonstituerte preparat, særlig et som inneholder α -2-interferon, bør være fra 6,5 til 8,0, fortrinnsvis fra 7,0 til 7,4. Et foretrukket buffersystem, særlig for preparater av α -2-interferon, inneholder dinatriumhydrogenfosfat og mononatriumdihydrogenfosfat.

Også andre bestanddeler kan være tilstede i det fremstilte preparat, forutsatt at de er fysiologisk forlikelige og ikke er skadelige for interferon. Særlig kan en ytterligere stabilisator tilsettes. En foretrukken ytterligere stabilisator er albumin, særlig menneskealbumin når preparatet er beregnet på klinisk anvendelse. For den ovennevnte mengde aminosyre, nemlig fra 5 til 150 mg (fortrinnsvis fra 5 til 25 mg glycin), kan opp til 10 mg albumin, særlig ca. 1 mg, tilsettes.

Hvis mengden av interferon (særlig α -interferon) i 1 ml rekonstituert oppløsning skal være mindre enn 5×10^6 I.U., er tilsetningen av albumin meget ønskelig.

Fortrinnsvis inneholder det fremstilte preparat de følgende ingredienser i de følgende mengder:

fra 1×10^6 til 1×10^8 I.U. α -interferon (særlig α -2-interferon),

fra 5 til 25 mg, fortrinnsvis fra 7 til 22 mg, α -alanin eller særlig glycin,

et forlikelig buffersystem beregnet på å gi en pH på fra 7,0 til 7,4 i den rekonstituerte oppløsning, og ca. 1 mg albumin.

Vannet anvendt ved rekonstituering av preparatet fremstilt ifølge oppfinnelsen kan også inneholde andre forlikelige bestanddeler, særlig konserveringsmidler, som f.eks. methyl-

161036

eller isopropyl-p-hydroxy-benzoat. Slike konserveringsmidler er fordelaktige når de resulterende oppløsninger skal anvendes ikke som en enkeltdose, men for flere påføringer, f.eks. som nasale eller ofthalmiske oppløsninger.

Et preparat på basis av α -2-interferon, fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen (Preparat I), ble sammenlignet med hensyn til lagringsstabilitet med et preparat av α -2-interferon i saltoppløsning med fosfatbuffer (Preparat II) og med sistnevnte preparat i frysetørret form (Preparat III). Resultatene av sammenligningsforsøkene er gitt i den nedenstående tabell.

Tabell

Prosentvis gjenvinning av α -2-interferon fra ulike preparater under diverse lagringsbetingelser

Lagringstid (måned)	Lagrings- temp. ($^{\circ}$ C)	% Gjenvinning av α -2-interferon		
		Preparater*		
		I	II	III
0 (ved start)	-	100	100	100
1	25	-	-	83
3	4	89	67	-
3	25	83	-	23
6	4	106	52	-
6	25	106	-	-
6	35	115	-	-

161036

* Preparater:

- i: Fremstilt ifølge oppfinnelsen, frysetørret.
 II: Saltoppløsning med fosfatbuffer, pH 7,4.
 III: Preparat II, frysetørret.

Det sees av tabellen at lagringsstabiliteten av preparatet fremstilt i henhold til oppfinnelsen er vesentlig bedre enn for de to kjente preparatformer.

De følgende ikke-begrensende eksempler belyser fremstillingen av et sterilt, frysetørret pulver for fremstilling av injiserbare oppløsninger av et interferon; idet det foretrukne interferon er α -2-interferon.

Eksempel 1

Oppløsning for frysetørring (1000 ampuller; 1 ml pr. ampulle).

Sammensetning

Interferon	$7,5 \times 10^{10}$ I.U.
Vannfritt dinatriumhydrogen-	
20 fosfat, USP	2,27 gram pr. liter
Natriumdihydrogenfosfat, USP	0,55 gram pr. liter
Glycin, USP	20,0 gram pr. liter
Menneskealbumin, USP	1,0 gram pr. liter
25 Vann for injeksjon, USP, inntil	1,0 liter

Fremstilling

1. Innfør en del av vannet i et passende kar forsynt med en rører.
2. Innfør og oppløs natriumfosfatene under omrøring.
- 30 3. Innfør og oppløs glycinet under omrøring.
4. Innfør og oppløs albuminet under omrøring.
5. Innfør og oppløs interferonet under omrøring.
6. Bring satsen til sluttvolumet med vann for injeksjon, USP.
- 35 7. Filtrer oppløsningen aseptisk inn i et sterilt kar gjennom et sterilt 0,2 μ m filter som er blitt vasket og prøvet på integritet. Prøv filterets integritet etter filtreringen.

161036

8. Fyll oppløsningen aseptisk i steriliserte ampuller.
9. Anbring de fylte ampuller aseptisk i en sterilisert frysetørrer.
10. Frysetørr oppløsningen aseptisk.
- 5 11. Kork ampullene aseptisk.
12. Påfør forsegling og krymp ampullene.

Fremgangsmåte ved frysetørring (under anvendelse av en frysetørrer av brett-typen).

- 10 1. Kjøl brettene til -30°C .
2. Innfør ampullene i kammeret.
3. Tillat oppløsningene å fryse. Avkjøl kjøleren til -45°C eller lavere. Sett på vakuomet. Hold brett-temperaturen ved -30°C i minst 12 timer.
- 15 4. Øk brett-temperaturen med en relativt konstant hastighet til høyst $+25^{\circ}\text{C}$ i løpet av minst 24 timer.
5. Når produkttemperaturen når $+25^{\circ}\text{C}$, flømmes kammeret med sterilt nitrogen, inntil atmosfæretrykk er nådd. Kork ampullene i kamrene.
- 20 6. Fjern ampullene fra kammeret og forsegl dem.

Eksempel 2

- Et foretrukket preparat hvor interferonet er α -2-interferon, fremstilles ved å følge fremgangsmåten i eksempel 1
- 25 under anvendelse av α -2-interferon som interferonet, men ved å erstatte glycinet med α -alanin.

Eksempel 3

- Et foretrukket preparat hvor interferonet er α -1-interferon, fremstilles ved å følge fremgangsmåten i eksempel 1,
- 30 men ved å anvende α -1-interferon som interferon.

Eksempel 4

- Et annet foretrukket preparat fremstilles ved å følge fremgangsmåten i eksempel 1, men ved å anvende α -1-interferon
- 35 som interferonet og å erstatte glycinet med α -alanin.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte ved fremstilling av et frysetørret, farmasøytisk interferonpreparat for rekonstituering med sterilt
5 vann, hvor en steril vannoppløsning av interferonet og et forlikelig buffersystem, som eventuelt er tilsatt albumin, frysetørres, og det som interferon anvendes et humant interferon, spesielt et leukocyttinterferon eller et fibroblastinterferon, fortrinnsvis α -interferon eller β -interferon, mer
10 foretrukket α -2-interferon eller α -1-interferon, idet interferonet dessuten fortrinnsvis er fremstilt ved rekombinant-DNA-metoder,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det i oppløsningen, før frysetørringen foretas, innføres en aminosyre valgt blant
15 glycin og α -alanin, idet aminosyren innføres i en mengde av fra 5 til 150 mg, fortrinnsvis fra 5 til 25 mg, pr. $1 \times 10^4 - 5 \times 10^8$ internasjonale enheter (I.U.) av interferonet.
- 20 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det pr. $1 \times 10^6 - 1 \times 10^8$ internasjonale enheter av interferonet anvendes fra 5 til 25 mg, og særlig fra 7 til 22 mg, α -alanin eller glycin.
- 25 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det som aminosyre anvendes glycin.