MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	**101994900367359**
Data Deposito	**16/05/1994**
Data Pubblicazione	**16/11/1995**

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

FORMULAZIONI LIQUIDE DI INTERFERONE BETA

Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo: "FORMULAZIONI LIQUIDE DI INTERFERONE BETA", a nome della ditta delle Antille Olandesi Applied Research Systems ARS Holding N.V., con sede in Curacao, Antille Olandesi.

*****

La presente invenzione riguarda formulazioni liquide di Interferone beta stabilizzate con un poliolo, uno zucchero non riducente o un amminoacido. In particolare riguarda formulazioni contenenti mannitolo e tampone acetato.

Gli interferoni (alfa, beta, gamma) sono glicoproteine prodotte nelle cellule dei vertebrati a seguito di induzione. Gli induttori più classici sono i virus ma come tali si comportano anche altri agenti microbici, altre sostanze naturali e composti sintetici.

L'interferone beta è indotto in fibroblasti umani, ha attività antivirale ma nella terapia di alcune forme di tumori, possono essere sfruttate altre attività unitamente all'azione antivirale, come quella antiproliferativa cellulare e immunoregolatrice.

La produzione da culture di fibroblasti umani e in

particolare da techniche di DNA ricombinante, permette oggi di avere quantità commerciali di interferone beta.

E' noto che le proteine in forma purificata sono particolarmente suscettibili alla degradazione, anche per normale azione di agenti atmosferici. Questa peculiarità si evidenzia in maniera ancora più spiccata per le proteine prodotte secondo la tecnica del DNA ricombinante.

Proprio in conseguenza del fatto che le proteine altamente purificate sono facilmente soggette ad una denaturazione, diventa desiderabile l'ottenimento di formulazioni stabili che assicurino al prodotto un ciclo di vita più lungo possibile.

La stabilizzazione di formulazioni contenenti proteine altamente purificate può essere realizzata con l'aggiunta di uno o più eccipienti che impediscano o ritardino una degradazione del principio attivo.

Sono note composizioni farmaceutiche contenenti interferone beta. La domanda di brevetto EP 089245 (INTER-YEDA LTD) descrive una composizione liofilizzata, di interferone beta contenente

mannitolo, albumina umana e polivinilpirrolidone, quest'ultimo come agente stabilizzante. Sono note anche composizioni farmaceutiche liquide contenenti altri interferoni.

La domanda di brevetto internazionale WO 89/04177 (GENENTECH - Priority 03/11/87) descrive composizioni farmaceutiche liquide di interferone gammma comprendenti un tampone che mantiene il pH entro il range 4.0-6.0, uno zucchero poliidrossilato come stabilizzante e un detergente non ionico.

Non sono comunque note composizioni farmaceutiche liquide di interferone beta.

E' altamente desiderabile ottenere tali preparazioni in maniera da evitare la ricostituzione del liofilizzato e permettere così una facilità d'uso.

E' stato ora sorprendentemente trovato che composizioni farmaceutiche liquide comprendenti interferone beta stabilizzate con un poliolo, uno zucchero non riducente o un amminoacido in un tampone opportuno risultano particolarmente stabili e mantengono attività biologica per un prolungato periodo di tempo.

Lo scopo principale della presente invenzione è quello di fornire una formulazione farmaceutica liquida comprendente interferone beta e un poliolo, uno zucchero non riducente o un amminoacido come stabilizzante.

Preferibilmente lo stabilizzante è scelto fra mannitolo, saccarosio e glicina, in particolare lo stabilizzante è mannitolo.

Preferibilmente la formulazione farmaceutica liquida include un tampone avente un pH compreso tra 3 e 4, in particolare tampone acetato.

Un ulteriore scopo è fornire un procedimento per la preparazione di tale formulazione farmaceutica liquida comprendente lo stadio della diluizione dell'interferone beta con una soluzione degli eccipienti.

Un altro scopo è fornire una forma di presentazione della formulazione farmaceutica liquida comprendente la suddetta formulazione ermeticamente chiusa in condizione sterile in un contenitore adatto per lo stoccaggio prima dell'uso.

Per studiare la stabilità di formulazioni liquide di

interferone beta sono state preparate diverse formulazioni diluendo il bulk di interferone beta in diversi tamponi a vari pH, quindi i campioni sono stati conservati a differenti temperature e saggiati con test immunologico ad intervalli di tempo determinati. Scelta la soluzione tampone e il pH preferito con cui si ottiene la migliore stabilità, si è proceduto alla preparazione delle formulazioni stabilizzate diluendo il bulk di interferone con la soluzione tampone contenente anche gli eccipienti. La stabilità delle varie formulazioni è stata determinata misurando l'attività residua di interferone beta dopo stoccaggio della soluzione alle temperature di 50°C, 37°C, e 25°C ad intervalli di tempo fissi.

Per determinare tale attività i campioni sono stati saggiati con test immunologico e biologico.

Il dosaggio immunologico è stato eseguito adoperando il kit TORAY, (Human IFN-beta ELISA Kit, TORAY INDUSTRIES, Inc), seguendo la metodica riportata nelle istruzioni allegate.

Il dosaggio biologico è stato eseguito come descritto da Armstrong, J.A. (1981), Cytopathic effect

inhibition assay for interferon, in Methods in Enzymology 73 381-387. Il test permette la misura dell'attività dell'interferone beta sfruttando la sua capacità antivirale.

La misura dell' attività è espressa in Unità Internazionali per millilitro di soluzione (IU/ml) o in Mega Unità Internazionali per millilitro di soluzione (MIU/ml). (1 MIU/ml=1.000.000 IU/ml).

Una Unità Internazionale, è calcolata come descritto nella Research Reference Reagent Note No. 35, pubblicata dal National Institute of Health, Bethesda, Maryland, in rapporto al HuIFN-beta NIH Reference Reagent Gb 23-902-531, usato come standard.

La misura viene qui riportata come percentuale di recupero dell'attività del campione di Interferone beta nelle varie formulazioni, assumendo l'attività del campione al tempo zero pari al 100%.

I dosaggi sono stati eseguiti in duplicato.

Al fine di valutare l'effetto del pH sulla stabilità del principio attivo, sono state preparate diverse formulazioni di interferone beta ricombinante, contenenti 0,6 e 1 MIU/ml con varie soluzioni tampone

quali tampone acetato, tampone citrato, tampone ascorbato, tampone succinato.

Le formulazioni contenenti interferone beta ricombinante con le soluzioni tampone sono state preparate e conservate alla temperatura di 50°C, 37°C e 25°C, saggiate quindi con test immunologico ad intervalli di tempo fissi. Le formulazioni sono state preparate in modo tale da avere un pH compreso tra 3.0 e 4.0 e tra 5.0 e 6.0, tutte aventi il tampone con una concentrazione 0.01 M.

Le tabelle 1, 2, 3, riportano i risultati delle prove effettuate ad intervalli di tempo determinati, da 1 fino a 42 giorni, alle varie temperature.

I dati contenuti nelle suddette tabelle dimostrano che le formulazioni con un pH compreso tra 5.0 e 6.0 evidenziano una immediata perdita del titolo. Le formulazioni con il pH compreso tra 3.0 e 4.0, mostrano invece, una elevata stabilità in particolare in presenza di tampone acetato.

Al fine di valutare l'effetto dell'eccipiente sulla stabilità del principio attivo, sono state preparate diverse formulazioni contenenti 1 MIU/ml di

interferone beta ricombinante, utilizzando vari eccipienti quali mannitolo, saccarosio o un amminoacido come la glicina, e albumina umana già in parte contenuta nel bulk di interferone.

Le quantità utilizzate di mannitolo, saccarosio o glicina sono sono state tali da ottenere soluzioni isotoniche di interferone beta.

Lo studio della stabilità di queste formulazioni è stato effettuato mantenendo i campioni a 50°C, 37°C, 25°C ed a 4°C, e misurando l'attività residua agli intervalli di tempo riportati nelle tabelle 4 e 5.

I dati riportati nelle tabelle 4 e 5 dimostrano che la degradazione delle formulazioni con un poliolo come il mannitolo è molto più bassa rispetto a quella delle formulazioni contenenti saccarosio o glicina.

La formulazione scelta per uno studio più approfondito è stata quella contenente mannitolo in tampone acetato 0.01 M a pH 3,5, la quale è stata sottoposta a ulteriori prove per valutare l'effetto della forza ionica e dell'albumina sulla stabilità.

Sono state preparate soluzioni di interferone beta in tampone acetato 0.01 M, a pH 3,5, a diversi valori di

ESEMPI DI FABBRICAZIONE FARMACEUTICA

Materiali: mannitolo (Merck); Albumina umana (Behring); tampone acetato 0,01 M (Merck); NaOH 1M (Merck);

Come contenitori sono stati usati dei flaconi di vetro DIN 2R (vetro borosilicato tipo I) con chiusura di gomma Pharmagummi, miscela butilica, e anello di alluminio.

Esempio di preparazione di soluzioni di rIFN-beta

A) SOLUZIONE A 1 MIU/ML

Per la preparazione di un lotto da 1 l di prodotto finito, vengono usate le seguenti quantità:

r-interferone beta	1000 MIU
Mannitolo	54,6 g
Albumina umana	0,5 g-P
Tampone acetato 0,01 M pH 3,5	q.b a 1l

P è la quantità di albumina umana presente nel bulk interferone

B) SOLUZIONE A 12 MIU/ML

Per la preparazione di un lotto da 1 l di

prodotto finito, vengono usate le seguenti quantità:

r-interferone beta	12000 MIU
Mannitolo	54,6 g
Albumina umana	4,0 g-P
Tampone acetato 0,01 M pH 3,5	q.b a 1l

P è la quantità di albumina umana presente nel bulk interferone

C) SOLUZIONE A 24 MIU/ML

Per la preparazione di un lotto da 1 l di prodotto finito, vengono usate le seguenti quantità:

r-interferone beta	24000 MIU
Mannitolo	54,6 g
Albumina umana	8,0 g-P
Tampone acetato 0,01 M pH 3,5	q.b a 1l

P è la quantità di albumina umana presente nel bulk interferone

Metodo di preparazione

La quantità richiesta di mannitolo e albumina umana (tenendo conto della quantità di albumina contenuta

nel bulk) viene disciolta in circa 500 g di tampone acetato 0,01 M pH 3,5. Viene controllato il pH e se necessario aggiustato al valore di 3,5 +/-0.2 con acido acetico diluito (1:2) o con NaOH 1 M.

La soluzione è portata al peso finale di 1Kg - grammi di bulk da aggiungere con tampone acetato 0,01 M pH 3,5.

La quantità richiesta di r-interferone beta è pesata in un beaker e portata a peso finale di 500 g con la soluzione degli eccipienti.

In un altro beaker vengono pesati 500 g di soluzione degli eccipienti. I 500 g di soluzione contenente l'interferone vengono filtrati attraverso un filtro sterile su membrana da 0,22 um (DURAPORE) ad una pressione non superiore a 1,5 atm. La soluzione sterile viene raccolta in una beuta di vetro. Subito dopo vengono filtrati sulla stessa membrana i 500 g della soluzione degli eccipienti ad una pressione di 1,5 atm e raccolti nella stessa beuta. La soluzione ottenuta viene mescolata lentamente.

RM94 A 000300

Rivendicazioni

1. Una formulazione farmaceutica liquida comprendente interferone beta e un poliolo, uno zucchero non riducente o un amminoacido come agente stabilizzante.

2. Una formulazione farmaceutica liquida secondo la rivendicazione 1 in cui l'agente stabilizzante è scelto fra: mannitolo, saccarosio e glicina.

3. Una formulazione farmaceutica liquida secondo la rivendicazione 2 in cui l'agente stabilizzante è mannitolo.

4. Una formulazione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui l'interferone beta è ricombinante.

5. Una formulazione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui l'interferone beta è in quantità fra 0,6 e 1 MIU/ml.

6. Una formulazione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5 che include inoltre una soluzione tampone capace di mantenere il pH della formulazione liquida ad un valore compreso tra 3.0 e 4.0.

7. Una formulazione farmaceutica liquida secondo la rivendicazione 6 in cui la soluzione tampone è costituita da tampone acetato.

8. Una formulazione farmaceutica liquida secondo la rivendicazione 6 o secondo la rivendicazione 7 in cui la soluzione tampone ha una concentrazione di 0.01 M.

9. Una formulazione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8 che comprende anche albumina umana.

10. Una formulazione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9 comprendente 1 MIU/ml di interferone beta, 54,6 mg/ml di mannitolo, 0,5 mg/ml di albumina in una soluzione

di tampone acetato 0,01 M a pH 3,5.

11. Procedimento per la preparazione di una formulazione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10 comprendente la diluizione dell interferone beta con una soluzione degli eccipienti.

12. Forme di presentazione della formulazione farmaceutica liquida secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, chiusa ermeticamente in condizione sterile in un contenitore adatto per lo stoccaggio prima dell'uso.

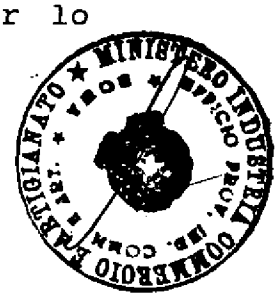


TABELLA I

r-β-INTERFERONE

FORMULAZIONE LIQUIDA : 1 MIU/FLACONE

RISULTATI DOSAGGIO IMMUNOLOGICO : CONC (%)

STABILITA' IN TAMPONE CITRATO 0.01 M A DIFFERENTI VALORI DI pH

		50° C		37° C		25° C	
	T=0	1 G	30 G	19 G	30 G	12 G	19 G
IFN/3.0	100 (890600 IU/ML)	73.0	8.6	88.5	60.9	100	97.5
IFN/4.0	100 (820900 IU/ML)	20.1	1.0	68.7	36.6	100	62.8
IFN/5.0	100 (532100 IU/ML)	N D					43.6
IFN/6.0	100 (179500 IU/ML)	N D					

G = giorni
N D = non determinabile
IFN/3.0 = formulazione in tampone citrato pH 3.0
IFN/4.0 = formulazione in tampone citrato pH 4.0
IFN/5.0 = formulazione in tampone citrato pH 5.0
IFN/6.0 = formulazione in tampone citrato pH 6.0

MINISTERO DELLA SANITÀ

00030 A 6/93

TABELLA 2

r-β-INTERFERONE

FORMULAZIONE LIQUIDA : 0,6 MIU/FLACONE

RISULTATI DOSAGGIO IMMUNOLOGICO : CONC (%)

STABILITA' IN TAMPONE ACETATO 0.01 M A DIFFERENTI VALORI DI pH

		50° C		37° C		25° C	
	T=0	1 G	30 G	19 G	30 G	7 G	19 G
IFN/3.0	100 (549425 IU/ML)	72.6	48.3	97.5	100	100	100
IFN/4.0	100 (459600 IU/ML)	77.6	30.3	91.9	92.2		100
IFN/5.0	100 (52275 IU/ML)	45.0					
IFN/6.0	100 (25425 IU/ML)	57.2					

G = giorni
IFN/3.0 = formulazione in tampone acetato pH 3.0
IFN/4.0 = formulazione in tampone acetato pH 4.0
IFN/5.0 = formulazione in tampone acetato pH 5.0
IFN/6.0 = formulazione in tampone acetato pH 6.0

00300 ROMA

TABELLA 3

r-β-INTERFERONE

FORMULAZIONE LIQUIDA : 1 MIU/FLACONE

RISULTATI DOSAGGIO IMMUNOLOGICO : CONC (%)

STABILITA' IN TAMPONE ASCORBATO E SUCCINATO 0.01 M pH 3.00 e 4.00

		50° C			37° C		25° C		
	T=0	7 G	14 G	21 G	7 G	42 G	7 G	14 G	42 G
INF/ 3.0/ASC	100 (1068400 IU/ML)	N. D.			32.4		76.9	10.5	
INF/4.0/ASC	100 (1025000 IU/ML)	N D.			15.6		80.6		
INF/3.0/SUC	100 (980200 IU/ML)	62.9	54.8	22.1	92.7	87.8	96.0	62.5	97.2
INF/4.0/SUC	100 (957600 IU/ML)	62.8	43.8	22.7	88.5	14.3		78.7	84.7

G = giorni
N D. = non determinabile
IFN/3 0/ASC = formulazione in tampone ascorbato pH 3.0
IFN/4.0/ASC = formulazione in tampone ascorbato pH 4.0
IFN/3.0/SUC = formulazione in tampone succinato pH 3 0
IFN/4 0/SUC = formulazione in tampone succinato pH 4.0

00 6003 A 0MN

TABELLA 4

r-β-INTERFERONE

FORMULAZIONE LIQUIDA : 1 MIU/FLACONE

RISULTATI DOSAGGIO BIOLOGICO : CONC (%)

STABILITA' CON DIVERSI ECCIPIENTI IN TAMPONE ACETATO 0.01 M pH 3.5

		50° C	37° C		25° C		
	T=0	49 G	49 G	3 M	3 M	6 M	9 M
ACE/SAC/3.5	100 (970000 IU/ML)	25.8	100	89.6	100	100	
ACE/MAN/3.5	100 (1150000 IU/ML)	67.8	100	90.4	91.3	100	85.2
ACE/GLI/3.5	100 (1200000 IU/ML)	49.2	100	75.8	90	98.3	

G = giorno
M = mese
ACE/SAC/3.5 = formulazione in tampone acetato pH 3.5 + saccarosio
ACE/MAN/3.5 = formulazione in tampone acetato pH 3.5 + mannitolo
ACE/GLI/3.5 = formulazione in tampone acetato pH 3.5 + glicina

RM/94/0030

TABELLA 5

r-β-INTERFERONE

FORMULAZIONE LIQUIDA : 1 MIU/FLACONE

RISULTATI DOSAGGIO IMMUNOLOGICO : CONC (%)

STABILITA' CON DIVERSI ECCIPIENTI IN TAMPONE ACETATO 0.01 M pH 3.5

		50° C			37° C			25° C			4° C	
	T=0	7 G	14 G	49 G	14 G	49 G	3 M	6 M	9M	3 M	6 M	9 M
ACE/SAC/3.5	100 (1120000 IU/ML)	78.6	62.5	10.3	99.1	96.4	67.1	97.2		100	100	
ACE/MAN/3.5	100 (1070000 IU/ML)	90.6	74.8	60.3	-	100	100	100	100	100	100	100
ACE/GLI/3.5	100 (1220000 IU/ML)	77.0	47.5	19.4	100	91.0	93.9	96.9		87.7	100	

G = giorni
M= mese
ACE/SAC/3.5 = formulazione in tampone acetato pH 3.5 + saccarosio
ACE/MAN/3.5 = formulazione in tampone acetato pH 3.5 + mannitolo
ACE/GLI/3.5 = formulazione in tampone acetato pH 3.5 + glicina

RIPRODUZIONE VIETATA