



## (12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 948 358 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 29 880.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/23817**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 95 2621.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/028007**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.12.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **02.07.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.10.1999**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **14.07.2004**

(97) Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents beim EPA: **23.11.2011**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.05.2012**

(51) Int Cl.:

**A61K 47/18 (2006.01)**

**A61K 38/21 (2006.01)**

**A61K 9/08 (2006.01)**

### Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

**34353 P 24.12.1996 US**

(84) Benannte Vertragsanstalten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

**BIOGEN IDEC MA INC., Cambridge, Mass., US**

(72) Erfinder:

**DIBIASI, Mary, D., Wellesley, US; STAPLES, Mark, Cambridge, US; CHUNG, Wen-Li, Arlington, US; SCHARIN, Eric, Cambridge, US**

(74) Vertreter:

**Vossius & Partner, 81675, München, DE**

(54) Bezeichnung: **STABILE FLÜSSIGE INTERFERON-ZUBEREITUNGEN**

**Beschreibung****SACHGEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Diese Erfindung betrifft Verfahren zur Stabilisierung von menschlichem Interferon-beta und stabile Interferon-beta Flüssigzubereitungen.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Interferone sind Proteine, die eine Vielfalt biologischer Aktivitäten aufweisen, von denen manche antiviral, immunmodulierend und antiproliferativ sind. Sie sind relativ kleine, speziespezifische, einzelkettige Polypeptide, die von Säugerzellen als Antwort auf die Einwirkung einer Reihe von Induktoren wie Viren, Polypeptide, Mitogene und ähnliches gebildet werden. Interferone schützen Tiergewebe und Zellen gegen Virusangriffe und sind ein wichtiger Verteidigungsmechanismus des Wirtes. In den meisten Fällen stellen Interferone einen besseren Schutz für solche Gewebe und Zellen dar, aus denen sie gewonnen wurden, als für andere Gewebe- und Zelltypen, was zeigt, dass Interferon vom Menschen wirksamer zur Behandlung von Erkrankungen des Menschen sein sollte als Interferon von anderen Spezies.

**[0003]** Es gibt mehrere unterschiedliche Typen menschlicher Interferone, allgemein klassifiziert als leukocytär (Interferon-alpha), fibroblastär (Interferon-beta) und immun (Interferon-gamma) und eine große Vielzahl von Varianten davon. Allgemeine Diskussionen über Interferone finden sich in verschiedenen Texten und Monographien, einschließlich: The Interferon System (W. E. Stewart, II, Springer-Verlag, N. Y. 1979) und Interferon Therapy (World Health Organization Technical Reports Serie 676, Weltgesundheitsorganisation, Genf 1982).

**[0004]** Das Verfahren der Verabreichung von Interferon ist ein wichtiger Faktor bei der klinischen Anwendung dieses wichtigen therapeutischen Mittels. Die systemische Verabreichung von Interferon durch entweder intravenöse, intramuskuläre oder subkutane Injektion wurde am häufigsten mit einem Erfolg bei der Behandlung von Erkrankungen wie Haarzellen-Leukämie, Erworbenes Immundefizienz-Syndrom (AIDS) und dem verwandten Kaposi-Sarkom angewendet. Es ist jedoch bekannt, dass Proteine in ihrer gereinigten Form besonders anfällig für Abbau sind. Für Interferon-beta ist der primäre Mechanismus bzw. sind die primären Mechanismen des Interferon-Abbaus in Lösung Aggregation und Desamidierung. Die mangelnde Stabilität von Interferon in Lösungen und anderen Produkten hat bislang seine Verwendbarkeit eingeschränkt.

**[0005]** Pharmazeutische Interferon-Zubereitungen zur klinischen Verwendung enthalten üblicherweise Interferon als eine lyophilisierte (d. h. gefriergetrocknete) Zubereitung in Kombination mit komplexen organischen Hilfsstoffen und Stabilisatoren wie nichtionische oberflächenaktive Agenzien (d. h. Tenside), verschiedenen Zuckern, organischen Polyolen und/oder menschlichem Serumalbumin. Lyophilisierte Zubereitungen haben den Nachteil des Erfordernisses einer komplexen Verpackung, da eine separate Bereitstellung sterilen Wassers für Injektionszwecke benötigt wird. Außerdem benötigen lyophilisierte Zubereitungen mehrere Handgriffe vor der Anwendung, wodurch die Möglichkeit von Nadelstichen und des Fallenlassens von Bestandteilen während der Vorbereitungen für die Injektion erhöht wird. Diese Handgriffe sind besonders für solche Patientengruppen problematisch, die eine Muskelschwäche und eine schwache Koordinationsfähigkeit aufweisen wie Menschen mit multipler Sklerose (MS). MS-Patienten können sich selbst Interferone verabreichen, so dass die Verfügbarkeit einer Dosierungsform, die wesentlich leichter zu verabreichen ist, als die gegenwärtigen lyophilisierten Produkte einen wichtigen Wertzuwachs für die Patienten-Zielgruppe darstellt. Einfache Flüssigformulierungen von Interferon sind hochgradig wünschenswert, um die notwendige Rekonstituierung bei der Verwendung von lyophilisierten Zubereitungen zu vermeiden.

**[0006]** Flüssige, nicht-lyophilisierte, Interferone enthaltende Zubereitungen können auch komplexe Trägerstoffe wie menschliches Serumalbumin, Polyole, Zucker und anionische, oberflächenaktive, stabilisierende Agenzien enthalten. Vgl. z. B. WO 89/10756 (Hara et al. – enthaltend Polyol und p-Hydroxybenzoat). WO 88/09674 beschreibt stabilisierte Zubereitungen von gamma-Interferon enthaltend Lactobionsäure und einen Acetat/Glycin-Puffer. Die Zugabe von Lactobionsäure verhindert die Bildung von Aggregaten höheren Ranges nach Rekonstituierung der lyophilisierten Zubereitung. EP0163111 zeigt auf, dass Aminosäuren wie Arginin oder Glutamat die Löslichkeit von Interferonzusammensetzungen in Wasser erhöhen kann. EP0284249 offenbart lyophilisierte Interferon-Zusammensetzungen, die Glycin oder menschliches Serumalbumin (HSA), einen Puffer (z. B. Acetat) und ein isotonisches Mittel (z. B. NaCl) umfassen. US4496537 beschreibt lyophilisierte Interferon-Zusammensetzungen enthaltend Phosphatpuffer, Glycin und HSA. Es wird gesagt, dass die Verwendung von Glycin zusammen mit HSA die Rekonstituierung der lyophilisierten Zubereitung verbessert.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0007]** Die vorliegende Offenbarung stellt für die vorstehend genannten Probleme eine Lösung bereit und zwar mit der Entdeckung, dass menschliches Interferon-beta stabilisiert werden kann, wenn es in gepufferte Lösungen gegeben wird, die einen pH-Wert zwischen etwa 4 und 7,2 haben, die Lösungen eine Aminosäure als stabilisierendes Mittel enthalten und in einigen Fällen ein Salz (wenn die Aminosäure keine geladene Seitenkette enthält). Das Interferon-beta ist nicht lyophilisiert, sondern wird, wenn es unter Verwendung von Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, aus Quellen gewonnen wurde, direkt in die Zubereitung der Offenbarung überführt.

**[0008]** Daher ist ein Aspekt der vorliegenden Offenbarung eine flüssige Zusammensetzung umfassend ein Interferon und ein stabilisierendes Mittel zwischen 0,3% und 5% Gewichtsanteilen, welches eine Aminosäure ist, die aus der Gruppe bestehend aus sauren Aminosäuren, Arginin und Glycin ausgewählt werden. Die flüssige Zusammensetzung wurde zuvor nicht lyophilisiert. Außerdem ist es vorzuziehen, dass die flüssige Zusammensetzung in einem Gefäß wie einer Spritze enthalten ist, wobei das Gefäß eine Oberfläche hat, die in Kontakt mit der Flüssigkeit ist, die mit einem Material beschichtet ist, das gegenüber Interferon inert ist wie Silikon oder Polytetrafluorethylen. Die bevorzugten Zusammensetzungen schließen Interferon-beta oder ein rekombinant hergestelltes Interferon in einem Puffer mit einem pH-Wert von zwischen etwa 4,0 und 7,2 ein. Andere Zubereitungen der vorliegenden Offenbarung schließen ein:

- (1) ein 20 mM Acetatpuffer bei pH 5,0, wobei der Puffer zuvor nicht lyophilisiert wurde, worin der Puffer Interferon-beta mit Bestandteilen einschließt, die ausgewählt werden aus (a) 150 mM Arginin-HCl, (b) 100 mM Natriumchlorid und 70 mM Glycin, (c) 150 mM Arginin-HCl und 15 mg/ml menschliches Serumalbumin, (d) 150 mM Arginin-HCl und 0,1% Pluronic F-68, (e) 140 mM Natriumchlorid, (f) 140 mM Natriumchlorid und 15 mg/ml menschliches Serumalbumin und (g) 140 mM Natriumchlorid und 0,1% Pluronic F-68;
- (2) eine Flüssigkeit mit pH 5,0, die Interferon-beta, 170 mM L-Glutaminsäure und 150 mM Natriumhydroxid einschließt, wobei die Flüssigkeit zuvor nicht lyophilisiert wurde;
- (3) ein 20 mM Phosphatpuffer bei pH 7,2, wobei der Puffer zuvor nicht lyophilisiert wurde, worin der Puffer Interferon-beta mit Bestandteilen einschließt, die ausgewählt werden aus (a) 140 mM Arginin-HCl und (b) 100 mM Natriumchlorid und 70 mM Glycin.

**[0009]** Hierin offenbart ist auch ein Kit für die parenterale Verabreichung einer flüssigen Interferon-Zubereitung. Das Kit umfasst ein Gefäß, das eine flüssige Zubereitung bei einem pH-Wert von zwischen 4 und 6 enthält, wobei die Flüssigkeit eine pharmazeutisch wirksame Menge von Interferon-beta beinhaltet, die zuvor nicht lyophilisiert wurde und ein Aminosäure-stabilisierendes Mittel mit etwa 5% Gewichtsanteilen oder weniger, sowie eine Gebrauchsanweisung.

**[0010]** Ebenso ist hierin eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung offenbart, welche für die parenterale Verabreichung bei Säugern geeignet ist, die im Wesentlichen aus einer wirksamen Menge an Interferon-beta besteht, die nicht zuvor lyophilisiert wurde, in einem Puffer, der den pH-Wert im Bereich von 4,0 bis 6,0 erhält, und einem Aminosäure-stabilisierenden Mittel in einer geeigneten Ionenstärke. Die Zusammensetzung ist in einem Vorratsgefäß, wie in einer Spritze, enthalten. Vorzugsweise hat das Vorratsgefäß keine Grenzfläche zwischen sauerstoffhaltiger und flüssiger Phase (d. h. die Interferonlösung ist während der Herstellung und der Lagerung nicht sauerstoffhaltigem Gas ausgesetzt). Das Interferon-beta behält im Wesentlichen seine antivirale Aktivität während der Lagerung bei einer Temperatur von zwischen etwa 2 Grad C und etwa 25 Grad C für eine Zeitspanne von mindestens 3 Monaten.

**[0011]** Ebenso ist hierin ein Verfahren zur Stabilisierung von Interferon-beta in flüssigen Arzneimitteln offenbart, so dass es im Wesentlichen seine physikalische Stabilität während der Lagerung bei einer Temperatur von zwischen etwa 2 und etwa 25 Grad C für eine Zeitspanne von mindestens 3 Monaten beibehält, umfassend das Vermischen von: a) einer wirksamen Menge von Interferon-beta, b) einem Puffer, der den pH-Wert innerhalb der Spanne von 4,0 und 7,2 in einer geeigneten Ionenstärke erhält und c) ein Aminosäure-stabilisierendes Mittel, wobei die Flüssigkeit zuvor nicht lyophilisiert wurde und während der Herstellung und der Lagerung nicht sauerstoffhaltigem Gas ausgesetzt wurde.

**[0012]** Die flüssigen Zubereitungen der vorliegenden Offenbarung haben gegenüber den lyophilisierten Zubereitungen viele Vorteile. Die Vorteile umfassen: (i) ein kleineres Injektionsvolumen, das für ein flüssige Zubereitung benötigt wird, wird weniger Unbehagen als ein größeres Volumen verursachen, (ii) Ersetzen komplexer Hilfsstoffe durch einfache Aminosäuren macht es möglich, die Qualität des fertigen Produkts genauer zu überwachen, (iii) die Verpackung ist durch die Eliminierung der Notwendigkeit eines separaten Vorrats von Wasser zu Injektionszwecken (WFI) und separater Spritze und Gefäß stark vereinfacht, (iv) die Dosierungsgenauigkeit

kann durch eine geringe Anzahl an Flüssigkeitsübertragungen verbessert werden und (v) die Produktsicherheit wird verbessert, da die einfachere Anwendung die Möglichkeit von Nadelstichen und des Fallenlassens von Bestandteilen während der Vorbereitung der Injektion verringert.

**[0013]** Daher ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung eine biologisch aktive, stabile flüssige Zubereitung von Interferon-beta zur Verwendung in injizierbaren Anwendungen bereitzustellen.

**[0014]** Ein anderes Ziel der Erfindung ist es eine Zubereitung bereitzustellen, die keine vorherige Lyophilisierung einer Interferon-beta-Zusammensetzung benötigt.

**[0015]** Es ist ein anderes Ziel dieser Erfindung den Stabilitätsverlust in einer flüssigen Zubereitung von Interferon-beta zu verhindern durch: a) Vermeidung von Hohlraumbildung und/oder Bildung eines darüber liegenden Gasraumes während der Herstellung der flüssigen Zusammensetzung oder b) Lagerung der flüssigen Zubereitung mit einem Gasraums, der aus einem inerten Gas wie Argon oder Stickstoff besteht.

**[0016]** Noch ein weiteres Ziel dieser Erfindung ist es, eine flüssige Zubereitung bereitzustellen, welche die Lagerung für eine lange Zeitspanne in einem flüssigen Zustand erlaubt, was Lagerung und Transport vor der Verabreichung erleichtert. Ein anderes Ziel dieser Erfindung ist es, eine flüssige Zubereitung bereitzustellen, die durch Elimination der Schritte der Lyophilisierung und Rekonstituierung leicht hergestellt und verabreicht werden kann.

**[0017]** Ein weiteres Ziel der Erfindung ist die Verwendung von einfachen Aminosäuren als alternative Stabilisatoren neben dem üblicherweise verwendeten Serumalbumin, was die Überwachung der Produktqualität erleichtert.

**[0018]** Ein wiederum anderes Ziel der Erfindung ist es, ein Arzneimittel bereitzustellen, das ein nicht-lyophilisiertes Interferon-beta enthält, das kostengünstiger hergestellt werden kann.

**[0019]** Auf der Grundlage der hierin enthaltenen Offenbarung stellt die vorliegende Erfindung eine flüssige Zusammensetzung bereit, die ein Interferon-beta und ein Aminosäure-stabilisierendes Mittel umfasst, das 0, 5% bis 5% (Gew./Vol.) Arginin-HCl ist, wobei die flüssige Zusammensetzung nicht aus lyophilisiertem Interferon rekonstituiert wurde; wobei die flüssige Zusammensetzung nicht weiter lyophilisiert wird, wobei die flüssige Zusammensetzung in einer Spritze enthalten ist, wobei die Spritze einen mit einem inertem Gas begasten Leerraum aufweist, und wobei die Spritze in einem abgepackten Kit enthalten ist.

**[0020]** Die vorliegende Erfindung stellt ferner ein Verfahren zur Herstellung eines flüssigen Arzneimittels bereit, umfassend ein Interferon-beta, einen Puffer, wobei der Puffer einen pH-Wert zwischen 4,0 und 7,2 hat, und ein Aminosäure-stabilisierendes Mittel, das 0,5% bis 5% (Gew./Vol.) Arginin-HCl ist; wobei das flüssige Arzneimittel nicht aus lyophilisiertem Interferon rekonstituiert wurde, wobei das flüssige Arzneimittel nicht weiter lyophilisiert wird, und wobei das Verfahren die Schritte umfasst: Mischen von mindestens dem Interferon-beta, Puffer und Aminosäure-stabilisierendem Mittel, um die flüssige Zusammensetzung zu ergeben, und Füllen der Spritze mit der Zusammensetzung auf solche Weise, dass die Spritze einen mit inertem Gas begasten Gasraum aufweist, wobei die Spritze in einem Kit abgepackt ist.

**[0021]** Die vorliegende Erfahrung stellt des Weiteren auch ein Verfahren zur Stabilisierung von Interferon in einem flüssigen Arzneimittel bereit, umfassend das Mischen von (a) Interferon-beta, (b) einem Acetatpuffer und (c) Arginin; wobei das Mittel einen pH-Wert zwischen 4,0 und 6,0 hat; wobei das flüssige Arzneimittel nicht aus lyophilisiertem Interferon rekonstituiert wurde; und wobei das flüssige Arzneimittel nicht weiter lyophilisiert wird.

**[0022]** Weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind in den angefügten Ansprüchen dargestellt.

**[0023]** Andere Vorteile der Erfindung werden teilweise in der nachfolgenden Beschreibung dargelegt und werden zum Teil durch diese Beschreibung offensichtlich oder werden aus der Anwendung dieser Erfindung ersichtlich. Die begleitenden Zeichnungen, die in dieser Beschreibung eingebunden sind und einen Teil davon darstellen, verdeutlichen sie und dienen zusammen mit dieser Beschreibung dazu, das Prinzip der Erfindung zu erklären.

## KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

**[0024]** [Fig. 1](#) ist eine Graphik, die den Prozentsatz von Interferon-beta-Monomeren zeigt, die in der Flüssigkeit des Großverfahrens verbleiben, als Funktion des Prozentsatzes gelösten Sauerstoffs in der Flüssigkeit.

**[0025]** [Fig. 2](#) ist eine Graphik, die den Prozentsatz der Proteinkonzentration für die Flüssigzubereitung BG 9589-1 zeigt, die gegen die des Ausgangsmaterials normiert wurde, gegen die Zeit. Mit „4°C“ (gefüllte Quadrate) bezeichnete Proben werden zwischen 2 und 8°C inkubiert. Andere Proben werden bei 25°C (gefüllte Kreise), 33°C (gefüllte Dreiecke) und 40°C (gefüllte Rauten) inkubiert.

**[0026]** [Fig. 3](#) ist eine Graphik, die den Prozentsatz der Proteinkonzentration für die Flüssigzubereitung BG 9589-3 zeigt, die gegen die des Ausgangsmaterials normiert wurde, gegen die Zeit. Mit „4°C“ bezeichnete Proben werden zwischen 2 und 8°C inkubiert. Andere Proben werden bei 25°C (gefüllte Kreise), 33°C (gefüllte Dreiecke) und 40°C (gefüllte Rauten) inkubiert.

## GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0027]** Die vorliegende Erfindung löst die Probleme und Nachteile, die mit derzeitigen Strategien und Konzepten assoziiert sind und stellt ein einfaches Verfahren zur Stabilisierung von Interferon-beta und eine einfache Interferon-beta-Zubereitung mit erhöhter Lagerstabilität bereit. Die Erfindung basiert zum Teil auf unseren Entdeckungen, dass:

- a) Interferon-beta besonders unstabil ist und aggregiert, wenn es mit Sauerstoff in Kontakt tritt, der entweder aktiv durch die Flüssigkeit geperlt wird oder statisch in Kontakt gebracht wird wie in einem Gasraum;
- b) flüssige Zubereitungen von Interferon-beta ohne einen Trägerstoff wie menschliches Serumalbumin sind besonders empfänglich für Adsorption (d. h. entweder chemische Reaktion oder physikalische Verbindung) an die Glasoberflächen; und
- c) Interferon-beta aggregiert bei einer niedrigen Ionenstärke, wodurch ein ionisches Milieu für die Stabilität im wässrigen Zustand benötigt wird.

**[0028]** Die Erfindung ist daher auf Verfahren zur Stabilisierung von menschlichem Interferon-beta gerichtet, die diese Fallstricke vermeiden, und auf die daraus entstehenden flüssigen Zubereitungen von stabilisiertem Interferon-beta.

## A. DEFINITIONEN

**[0029]** Der Begriff „Puffer“ bezieht sich auf Lösungen einer schwachen Säure und eines Salzes, welches das Anion der Säure enthält oder Lösungen einer schwachen Base und ihres Salzes. Insbesondere wenn der Begriff „Acetat“ in dieser Spezifizierung gebraucht wird (vgl. auch Tabelle I, nachstehend), bezieht er sich auf ein Puffersystem, das vorzugsweise Natriumacetat und Essigsäure enthält und der Begriff „Phosphat“ bezieht sich auf ein Puffersystem, das vorzugsweise dibasische und monobasische Natriumphosphat-Hepta- bzw. Mono-Hydrate enthält. Außerdem werden jene Lösungen in Tabelle II (nachstehend), die eine saure Aminosäure in Kombination mit Natriumhydroxid enthalten, die jedoch nicht konventionell als Puffer angesehen werden, wie dieser Begriff in der Fachwelt bekannt ist, trotzdem in die Definition hier eingeschlossen.

**[0030]** Der Begriff „Hilfsstoff“ bezieht sich auf jede Verbindung, die während der Verarbeitung und/oder Lagerung zu der flüssigen Zubereitung zum Zweck der Änderung von Eigenschaften des Massenproduktes zur Verbesserung der Stabilität und/oder Einstellung der Osmolalität zugegeben wird.

**[0031]** Der Begriff „stabilisierendes Mittel“ bezieht sich auf einen Hilfsstoff, der die Stabilität verbessert und/oder anderweitig verstärkt.

**[0032]** Der Begriff „Stabilität“ hat notwendigerweise eine funktionelle Definition und bedeutet die relative zeitweise Konstanz der Interferon-Aktivität wie der antiviralen Aktivität und/oder der Struktur von Interferon.

**[0033]** Der Begriff „mit Hohlraumbildung“ bezieht sich auf jede flüssige Zubereitung von Interferon, die wegen Druckveränderungen oder physikalischer Beanspruchung zumindest während seiner Herstellung und Lagerung mit sauerstoffhaltigen Blasen (z. B. Luft) Kontakt hatte. Der Begriff „Hohlraum“ bedeutet auch, dass eine sauerstoffhaltige flüssige Grenzfläche zu einem Zeitpunkt während der Herstellung, Lagerung und Verwendung der flüssigen Zubereitung von Interferon gebildet wurde. Der Begriff „mit Hohlraumbildung“ bedeutet auch, dass der Gehalt an gelöstem Sauerstoff in den flüssigen Zubereitungen von Interferon bei Temperaturen,

die typischerweise zumindest bei Herstellung und Lagerung herrschen, höher als bei etwa 10% des Gleichgewichtsgehalts der Atmosphäre liegen.

**[0034]** Der Begriff „parenteral“ wie er hier verwendet wird schließt subcutane, intravenöse, intramuskuläre, intrasternale, intraperitoneale, ophthalmische oder intraspinale Injektions- oder Infusionsverfahren ein.

**[0035]** Der Ausdruck „pharmazeutisch verträgliches Salz“ bedeutet jedes organische oder anorganische Additionsalz, das bei Konzentrationen, die konsistent mit der wirksamen Aktivität sind, relativ untoxisch und harmlos für einen Patienten sind, so dass Nebenwirkungen aufgrund des Salzes die nutzbringenden Wirkungen des Interferons nicht zunichte machen.

**[0036]** Eine „wirksame Menge“ einer Verbindung ist die Menge, die ein Ergebnis liefert oder einen Einfluss auf die jeweilige zu behandelnde Krankheit ausübt. Eine „wirksame Menge“ bedeutet auch diejenige Menge, die im CPE-Test auf antivirale Aktivität ein positives Ergebnis liefert (d. h. eine antivirale Wirkung ausübt).

**[0037]** Wie es hier verwendet wird bedeutet eine „pharmazeutisch wirksame Menge“ eines Interferons einen Prozentsatz der Konzentration des Mittels, das in der medizinischen und pharmazeutischen Fachwelt als sicher und wirksam bei der Behandlung einer bestimmten Erkrankung bekannt ist.

**[0038]** „Isotonisch mit Blut“ (austauschbar mit „Isotonizität“ verwendet) bezieht sich auf eine flüssige Zusammensetzung von Interferon, die eine ausreichende Konzentration von Komponenten hat, so dass ihr osmotisches Verhalten im Wesentlichen identisch mit Blut ist; d. h. Zellen, die in Kontakt mit der Formulierung sind, werden im Wesentlichen ihre Form behalten und im Wesentlichen keinem Netto-Transfer von Wasser durch osmotische Drücke unterliegen.

**[0039]** „Polyionische Spezies“ (austauschbar mit „polyelektrolytische Spezies“ verwendet) bezieht sich auf eine Substanz mit hohem Molekulargewicht, die ein Elektrolyt ist, und wenn sie in den erfundungsgemäßen Zubereitungen verwendet wird, die Ionenstärke für eine bestimmte Osmolalität maximiert. Diese Definition basiert auf unserem Befund, dass Interferon-beta durch eine hohe Ionenstärke stabilisiert wird, dass jedoch die Gesamt-Ionenstärke durch die Notwendigkeit, dass die Lösung zu Blut isotonisch sein muss, begrenzt wird (vgl. Beispiel 7). Ein bevorzugter Weg, um die Ionenstärke für eine bestimmte Osmolalität zu maximieren ist es, einen Hilfsstoff zu verwenden, der eine polyionische Spezies ist.

**[0040]** Ein Material, das „inert gegenüber Interferon“ ist, bedeutet ein Material, das zumindest die Eigenschaft hat, physikalisch und/oder chemisch nicht mit Interferon zu reagieren.

## B HERSTELLUNG VON INTERFERONEN

**[0041]** Die vorliegende Offenbarung ist im Allgemeinen auf alle Arten von Interferon anwendbar, einschließlich natürliches Interferon, durch rekombinante DNA-Technologie hergestelltes Interferon und Interferon, das durch chemische Synthese oder Modifizierung hergestellt wurde. Ebenso kann die vorliegende Offenbarung unter Verwendung von unbearbeitetem, halbgereinigtem und gereinigtem Interferon aus Fibroblasten, Leukocyten, Lymphocyten oder jeglichen anderen Interferon enthaltenden oder herstellenden Geweben vom Menschen oder jeder anderen geeigneten Spezies ausgeführt werden. Am stärksten bevorzugt wird die Offenbarung auf Interferon von menschlichen Fibroblasten (Interferon-beta) angewendet und die vorliegende Erfindung betrifft Interferon-beta.

**[0042]** Das am stärksten bevorzugte Interferon-beta ist eine rekombinante Form und rekombinante DNA-Verfahren zur Herstellung von Proteinen einschließlich der verschiedenen Interferone sind bekannt und es wird nicht beabsichtigt, die Erfindung damit in irgendeiner Weise einzuschränken. Vgl. zum Beispiel U.S.-Patente 4,399,216, 5,149,636, 5,179,017 (Axel et al.); 4,470,461 (Kaufmann). Rekombinante Formen von Interferon-beta wurden hergestellt. Vgl. zum Beispiel Europäisches Patent 0 41313 (Fiers – Expression von Interferon-beta), U.S.-Patent 4,966,843 (McMormick et al. – Expression von Interferon in CHO-Zellen); U.S.-Patent 5,326,859 (Sugano et al. – für Interferon-beta codierende DNA), Interferonbeta kann auch entweder rekombinant oder chemisch modifiziert werden und es kann in serumhaltigem oder serumfreiem Medium hergestellt werden. Formen von Interferon-beta können Varianten wie Cystein-depletierte Mutanten (U.S.-Patente 4,588,585 und 4,737,462: Mark et al.) und Methionin-depletierte Mutanten (EP 260 350 – Wang et al.) einschließen. Die primäre Aminosäuresequenz des Proteins kann durch Derivatisierung unter Verwendung von Zuckereinheiten (Glycosylierung) oder durch andere Zusatzmoleküle erhöht werden. Andere Modifikationen können durch die posttranslationalen Prozessierungssysteme der Wirtszelle stattfinden. Individuelle Aminosäurereste in der Ket-

te können durch Oxidation, Reduktion oder andere Derivatisierung weiter modifiziert werden und das Protein kann gespalten werden, um aktive Fragmente zu erhalten. Die genaue chemische Struktur eines bestimmten rekombinanten Interferon-beta wird daher von mehreren Faktoren abhängen und es wird nicht beabsichtigt, damit den Umfang der Erfindung einzuschränken. Alle solche in den Zubereitungen enthaltenen Interferon-beta-Proteine, die hier beschrieben werden, behalten ihre Bioaktivität, wenn sie in geeignete Umgebungsbedingungen gegeben werden.

**[0043]** Ein Verfahren zur Herstellung von rekombinantem Interferon-beta besteht darin, Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO), die mit dem menschlichen Interferon-beta-Gen transfiziert sind, zu züchten. Rekombinantes Interferon-beta wird von CHO-Zellen, die in einer Batch-Suspensionskultur enthaltend fötales Rinderserum gezüchtet werden, ausgeschieden. Die Zellen können in Spinner-Flaschen, die in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>) bei etwa 35 Grad Celsius (im Folgenden „C“) untergebracht sind, herangezogen werden. Mehrere Spinner-Flaschen können vereinigt und in Fermenter steigender Größe geimpft werden, wenn eine Vergrößerung des Maßstabs gewünscht wird. Das Wachstum in einem bestimmten Fermenter wird für etwa sechs Tage ausgeführt und zu diesem Zeitpunkt akkumuliert das aktive Produkt Interferon-beta im Kulturmedium. Die Kultur kann dann geerntet und die Zellen aus dem das Produkt enthaltenden Kulturmedium zum Beispiel durch tangentiale Durchflussfiltration entfernt werden.

#### C. REINIGUNG VON INTERFERONEN

**[0044]** Reinigungsschemata für Interferone sind gut charakterisiert und dem Fachmann zugänglich. Solche Verfahren schließen Ein-Schritt- oder Mehrstufen-Verfahren ein, die verschiedene chromatographische Trennschritte beinhalten. Vgl. zum Beispiel U.S.-Patente 5,015,730 (Friesen et al. – Affinitätschromatographie und HPLC), 4,541,952 (Hosoi et al.-Chelat-Chromatographie).

**[0045]** Ein beispielhaftes Verfahren beinhaltet das Ausnutzen der ungewöhnlich hydrophoben und relativ basischen Natur des Interferon-beta-Moleküls sowie seine starke Affinität für die Bindung von Metallionen. Vgl. zum Beispiel Knight und Fahey, „Human Fibroblast Interferon, an Improved Purification“, J. Biol. Chem., 256: 3609–3611 (1981) und Edy et al., „Purification of Human Fibroblast Interferon by Zinc Chelate Chromatography“, J. Biol. Chem., 232: 5934–5935 (1981), die beide hierin durch Bezugnahme eingebunden sind.

**[0046]** Kurz gesagt beinhalten die Einfang- und Reinigungsschritte die Bindung von Interferon-beta an eine Serie von Sepharose®-Säulen (hergestellt durch Pharmacia Biotech) und Elution mit Salzen und einem Polylol. Wenn das endgültige Sepharose-Eluat verdünnt und durch Erniedrigung des pH-Wertes eingestellt wurde, wird das darin enthaltene Interferon-beta an die SP-Sepharose® (Pharmacia Biotech) binden. Die meisten der verbliebenen Proteine, die im Säulenauftrag vorhanden sind, sind mehr basischer Natur als das monomere Interferon-beta und binden fester an die Säule als das Interferon. DNA und Viren trennen sich auf dieser Säule von Interferon-beta. Die Säule wird dann mit einer Serie von Puffern gewaschen, die Natriumchlorid enthalten.

**[0047]** Das Interferon-Produkt wird nun an eine chelatisierende Sepharose®-Säule (Pharmacia Biotech) binden, die zuvor mit Zink geladen wurde. Vgl. Edy et al., vorstehend. Diese Säule wird wie alle nachfolgenden Schritte in einer sauerstofffreien Atmosphäre betrieben, um die freien Sulfhydrylgruppen im Molekül zu schützen. Das gereinigte Interferon wird angesäuert und bei niedrigem pH-Wert gehalten, um jegliche verbliebene Viren zu inaktivieren. Nach Neutralisierung wird das Interferon unter Verwendung von Kreuzflussfiltration konzentriert und dann der Puffer durch eine neutrale Pufferlösung ausgetauscht. Der Prozess des Pufferaustauschs reduziert die Konzentrationen von Zink und organischen Verbindungen. Darauf folgend kann das großtechnische Interferon bei –70 C vor den Zubereitungsschritten gelagert werden.

#### D. ZUBEREITUNG VON INTERFERONEN

**[0048]** Im vorstehend beschriebenen beispielhaften Reinigungserfahren und nach dem ersten Pufferaustauschverfahren, wird ein zweites Pufferaustauschverfahren eingeleitet, wobei jedoch die neutrale Pufferlösung durch eine Pufferlösung zwischen pH 4 und 7,2 ersetzt wird, die ein stabilisierendes Mittel enthält, das nachfolgend genauer beschrieben wird. Die entstehende Interferon enthaltende Zubereitung wird als „Prozess-Zwischenprodukt“ bezeichnet und kann zur Lagerung gefroren werden. Vgl. auch Beispiel 7.

**[0049]** Wenn es in einem gefrorenen Zustand ist (unter einer Atmosphäre von einem inertem Gas wie Argon oder Stickstoff), kann es dann aufgetaut und durch einen 0,22 Mikronfilter in ein tariertes Gefäß, vorzugsweise aus Edelstahl, gepumpt werden, wo das Prozess-Zwischenprodukt mit einem zuvor sterilfiltriertem Verdünnungsmittel versetzt wird bis das gewünschte Gewicht des Endproduktes erreicht wird. Das Verdünnungsmittel

tel besteht aus demselben Puffer, der im zweiten Pufferaustauschverfahren verwendet wurde. Das flüssige Endprodukt wird dann mit aseptischen Verfahren sterilfiltriert unter Verwendung von zum Beispiel zwei 0,22 Mikronfiltern in Serie und in ein versiegeltes Gefäß, vorzugsweise Edelstahl, gefüllt, das einen Einlass für Inertgas, eine entgasende Ventil-/Filterkombination und ein Einlass-/Auslass-Senkröhrchen enthält. Das Endprodukt wird durch das Senkröhrchen und in das versiegelte Gefäß gepumpt. Unter Verwendung eines Inertgases wie Stickstoff wird das Endprodukt durch Drucktransfer in den Pumpenkopf eines Gerätes überführt, das sterile Spritzen aseptisch befüllen kann.

**[0050]** Es sind verschiedene Verfahren zur aseptischen Befüllung von Spritzen verfügbar und mit dem jeweiligen verwendeten Verfahren wird nicht beabsichtigt, den Umfang der Erfindung einzuschränken. Ein beispielhaftes Verfahren beinhaltet die Verwendung eines HYPAK® autoklavierbaren Spritzenbefüllers (Becton Dickinson Pharmaceutical Systems, Franklin Lakes, NJ). Die Spritzen werden mit den aufgesetzten Schutzkappen an der Spitze autoklaviert. Im Allgemeinen umfassen Geräte dieses Typs eine Vakuumkammer, welche die mit der Interferonzubereitung zu befüllenden Spritzen enthält. Die Kammer wird in ebne aseptische Umgebung gebracht. Jede Spritze liegt vertikal in der Kammer mit ihrem offenen Ende mit einem Kolbenstift verbunden, der so angepasst ist, dass er in das offene Ende des Spritzenzyinders passt. Der Stift ist dazu vorgesehen, um einen Stopper in den Zylinder einzuführen, um die Flüssigkeit darin einzuschließen. Nach der Einführung verbleibt ein kleiner Gasraum in der Spritze. Die Kammer wird evakuiert und mit einem inertem, sauerstofffreiem Gas (z. B. Argon, Stickstoff) mehrere Male wiederbefüllt und wenn das endgültige Vakuum erreicht ist, werden die Kolben mechanisch in die offenen Spritzenzyinder ein kleines Stück weit eingeführt und die Stopper werden automatisch in die jeweiligen Spritzen eingeführt. Die Kammer wird dann mit gefilterter Luft belüftet, um den Druck in der Kammer auf atmosphärisches Niveau zurückzuführen. Die Höhe des Vakuums bestimmt die Größe des Gasraums, der Inertgas enthält.

**[0051]** Im speziellen von uns verwendeten System sind die Spritzen vertikal orientiert und werden durch ein Sprossenrad auf einer rotierenden Scheibe festgehalten. Die Spritzen werden zuerst unter einer Nadel positioniert, die in die Spritze eingeführt wird. Die Nadel spült das Innere der Spritze mit einem Inertgas aus (z. B. Stickstoff, Argon). Die Nadel fährt dann aus der Spritze zurück. Die Spritze wird dann unter einer zweiten Nadel positioniert, die in die Spritze eingeführt wird. Diese Nadel ist an eine Pumpe angeschlossen, die das Produkt in die Spritze abfüllt. Die zweite Nadel fährt dann aus der Spritze zurück. Die Spritze wird dann unter einer dritten Nadel positioniert, die in die Spritze eingeführt wird. Ein Kolben (zuvor autoklaviert) wird mit einem inertem, sauerstofffreien Gas (z. B. Stickstoff, Argon) in die Spritze geblasen, dann fährt die Nadel aus der Spritze zurück. Der Kolben wird so positioniert, dass ein Gasraum mit Inertgas zwischen der Oberfläche der Flüssigkeit und dem Boden des Kolbens freigelassen wird.

#### 1. Der Hilfsstoff:

**[0052]** Der Hilfsstoff ist vorzugsweise eine polyionischen Spezies, die die Ionenstärke für eine bestimmte Osmolalität maximiert wie zum Beispiel ein Polyelektrolyt, das Heparin oder andere polymere Spezies umfasst. Wie in Beispiel 4 diskutiert, wird Interferon-beta durch eine hohe Ionenstärke stabilisiert, aber die gesamte Ionenstärke wird durch die Notwendigkeit eingeschränkt, dass die Lösung isoton mit Blut sein muss. Ein bevorzugter Weg, um daher die Ionenstärke für eine bestimmte Osmolalität zu maximieren, ist es, eine polyionische Spezies zu verwenden. Erfindungsgemäße Lösungen von Interferon-beta sind isotonisch mit Blut (etwa 290 Milliosmol/Kilogramm).

**[0053]** Das am stärksten bevorzugte stabilisierende Mittel ist eine Aminosäure, die eine der folgenden einschließen kann: jede saure Aminosäure (z. B. Glutaminsäure, Asparaginsäure) oder eine Aminosäure ausgewählt aus Arginin und Glycin. Am stärksten bevorzugt ist das Aminosäure-stabilisierende Mittel Arginin, das in seiner Säureform (Arginin-HCl) in Lösungen mit einem pH-Wert von 5,0 eingebaut wird. Eine bevorzugte saure Aminosäure ist L-Glutaminsäure. Ohne an irgendeine Theorie gebunden werden zu wollen, ist die Tatsache, dass polyionische Hilfsstoffe bevorzugt werden wahrscheinlich der Grund, warum Arginin und Lysin (mit 3 geladenen Gruppen) Interferon besser stabilisieren als Glycin (mit 2 geladenen Gruppen), das wiederum besser stabilisiert als jede der ungeladenen Arten, die geprüft wurden.

**[0054]** Wenn der Hilfsstoff Arginin-HCl ist, wird seine Konzentration zwischen 0,5% (Gew./Vol.) und 5% liegen und ist am stärksten bevorzugt 3,13% (äquivalent zu 150 mM Arginin-HCl). Wenn der Hilfsstoff Glycin ist, wird seine Konzentration zwischen 0,50% (Gew./Vol.) bis 2% liegen und am stärksten bevorzugt 0,52% (äquivalent zu 66,7 mM bis 266,4 mM und am stärksten bevorzugt 70 mM). Wenn der Hilfsstoff Glutaminsäure ist, wird seine eine Konzentration zwischen 100 mM bis 200 mM liegen und ist am stärksten bevorzugt 170 mM (äquivalent zu einem Gew./Vol.-Prozentsatz im Bereich von 1,47% bis 2,94% und am stärksten bevorzugt 2,5%).

Die Hilfsstoffe, die gemäß der vorliegenden Erfindung erforderlich sind, sind in den angefügten Ansprüchen dargelegt.

**[0055]** Wir haben verschiedene Hilfsstoffe als stabilisierendes Mittel für flüssige Zubereitungen von Interferon-beta unter Verwendung des pH-Puffersystems von 50 mM Natriumacetat und Eisessig in Kombination mit 100 mM Natriumchlorid, pH 5,0, analysiert. Flüssige Proben von Interferon werden entweder thermisch durch Inkubation bei 37 Grad C für etwa 1 bis 3 Wochen beansprucht oder durch Rotation für 1 bis 3 Tage einer mechanischen Beanspruchung ausgesetzt. Behandelte Proben werden durch die in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren auf Stabilität von Interferon-beta untersucht. Wie genauer in Beispiel 7 beschrieben wird, zeigen die bei pH 5,0 mit Natriumacetat gepufferten Zubereitungen enthaltend einen Aminosäure-Hilfsstoff (und optional Natriumchlorid enthaltend) die beste Stabilität.

## 2. Das Interferon

**[0056]** Das bevorzugte Interferon ist das Interferon-beta aus Fibroblasten, am stärksten bevorzugt als rekombinantes menschliches in Säugerzellen produziertes Interferon-beta. Das rekombinante menschliche Interferon-beta kann eine freie Sulfhydrylgruppe enthalten und mindestens eine Disulfidverknüpfung. Ein besonders bevorzugtes Molekül enthält eine freie Sulfhydrylgruppe an Position 17 und eine Disulfidverknüpfung zwischen den Positionen 31 und 141 pro Molekül. Eine N-Glycosylierung wird bei Asn-80 erwartet, wie das bekanntermaßen bei natürlichem menschlichen IFN-beta der Fall ist. Der Konzentrationsbereich in den flüssigen erfundungsgemäßen Zubereitungen liegt von etwa 30 µg/ml bis etwa 250 µg/ml. Ein bevorzugter Konzentrationsbereich ist 48 bis 78 µg/ml und die am stärksten bevorzugte Konzentration ist etwa 60 µg/ml. Bezuglich der internationalen Standardwerte wurde der Biogen-interne Standard anhand des WHO Internationalen Standards für Interferon, Natural #Gb-23-902-531 standardisiert, so dass der Konzentrationsbereich in IU (für ein 0,5 ml Injektionsvolumen) von etwa 6 MIU bis 50 MIU und die bevorzugte Konzentration 12 MIU ist.

## 3. Der Puffer:

**[0057]** Die in der vorliegenden Erfindung zu verwendende organische Säure und die Phosphatpuffer, um den pH-Wert im Bereich von etwa 4,0 bis 7,2 und vorzugsweise von etwa 4,5 bis etwa 5,5 und am stärksten bevorzugt 5,0 zu erhalten, können konventionelle Puffer von organischen Säuren und Salzen davon sein wie Citratpuffer (z. B. ein Gemisch aus Mononatriumcitrat und Dinatriumcitrat, ein Gemisch aus Citronensäure und Trinatriumcitrat, ein Gemisch aus Citronensäure und Mononatriumcitrat etc.), Succinatpuffer (z. B. ein Gemisch aus Bernsteinsäure und Mononatriumsuccinat, ein Gemisch aus Bernsteinsäure und Natriumhydroxid, ein Gemisch aus Bernsteinsäure und Dinatriumsuccinat etc.), Tartratpuffer (z. B. ein Gemisch aus Weinsäure und Natriumtartrat, ein Gemisch aus Weinsäure und Kaliumtartrat, ein Gemisch aus Weinsäure und Natriumhydroxid etc.), Fumaratpuffer (z. B. ein Gemisch aus Fumarsäure und Mononatriumfumarat, ein Gemisch aus Fumarsäure und Dinatriumfumarat, ein Gemisch aus Mononatriumfumarat und Dinatriumfumarat etc.), Gluconatpuffer (z. B. ein Gemisch aus Gluconsäure und Natriumgluconat, ein Gemisch aus Gluconsäure und Natriumhydroxid, ein Gemisch aus Gluconsäure und Kaliumgluconat etc.), Oxalatpuffer (z. B. ein Gemisch aus Oxalsäure und Natriumoxalat, ein Gemisch aus Oxalsäure und Natriumhydroxid, ein Gemisch aus Oxalsäure und Kaliumoxalat etc.), Lactatpuffer (z. B. ein Gemisch aus Milchsäure und Natriumlactat, ein Gemisch aus Milchsäure und Natriumhydroxid, ein Gemisch aus Milchsäure und Kaliumlactat etc.), Phosphatpuffer (z. B. monobasisches Natriumphosphat/dibasisches Natriumphosphat) und Acetatpuffer (z. B. ein Gemisch aus Essigsäure und Natriumacetat, ein Gemisch aus Essigsäure und Natriumhydroxid etc.).

**[0058]** In den nachstehend beschriebenen Beispielen verwenden wir verschiedene Pufferkonzentrationen und verschiedene pH-Werte von Natriumphosphat, Natriumcitrat, Natriumsuccinat, Natriumcarbonat und Natriumacetat zur Evaluierung der am besten geeigneten Puffer. Proben Von Interferon-beta werden entweder bei 37 Grad C für 6 Tage bis 2 Wochen inkubiert oder für 7 bis 9 Stunden auf einem Rotationsgerät gehalten, um den Abbauprozess zu beschleunigen. Dann werden chemische Eigenschaften der Proben bestimmt. Die Proben werden mittels optischer Dichte, Peptidkartierung, Größenausschluss-HPLC, reduzierende und nicht-reduzierende SDS-PAGE/Western-Blots und isoelektrische Fokussierung/Western-Blots (IEF) analysiert, die alle untenstehend in Beispiel 1 beschrieben werden. Alle experimentellen Proben von Interferon-beta werden mit dem Interferon-beta-Ausgangsmaterial oder mit Proben von Interferon-beta, die bei zwischen 2 und 8 Grad C inkubiert wurden, verglichen. Unsere Daten zeigen, dass der pH-Wert der Hauptfaktor ist, der die Stabilität unserer Proben von Interferon-beta bestimmt, und dass die Proben zwischen pH-Werten von 4,0 und 5,0 stabiler sind als jene mit pH 7,0 oder größer. Vgl. Beispiel 2. Trotzdem waren wir in der Lage, einige Zubereitungen von Interferon-beta bei physiologischem pH-Wert (pH 7,2) zu entwickeln. Vgl. Beispiel 6.

## 4. Hohlraumbildung

**[0059]** Die meisten freien Sulfhydrylreste unterliegen bei hohem pH-Wert (pH > 8,0), dem pH-Wert, bei dem Disulfidverknüpfungen dem Umbau unterliegen, der Oxidation. Wir haben Aggregation von Interferon-beta in unserem Zwischenprodukt des großtechnischen Verfahrens durch Größenausschlusschromatographie, nicht reduzierender SDS-PAGE und Laserlichtstreuung festgestellt. Wir haben daraufhin entdeckt, dass die Bildung von aggregiertem Interferon-beta vom Spiegel des gelösten Sauerstoffs abhängig sein kann. Die Verfahrenskriterien, die wir entwickelt haben, um sicherzustellen, dass die flüssigen Zubereitungen von Interferon-beta nicht der Hohlraumbildung unterliegen, umfassen: (a) wenn möglich, sollte keine Grenzfläche zwischen sauerstoffhaltigem Gas und der Flüssigkeit während Herstellung und Lagerung vorhanden sein, und/oder (b) es sollten sich keine Blasen während der Herstellung und Lagerung bilden, und/oder (c) der Gehalt an gelöstem Sauerstoff in der Zubereitung sollte bei der Temperatur der Herstellung und Lagerung unter 10% der Gleichgewichtswerte der Atmosphäre gehalten werden. Vgl. Beispiel 3.

## 5. Adsorption von Interferon an Oberflächen

**[0060]** Wie haben auch bestimmt, dass Interferon an bestimmte Oberflächen adsorbiert und seine Lagerung in einem Glasgefäß erfordert, dass mindestens eine Oberfläche des Gefäßes, die in Kontakt mit dem Interferon ist, beschichtet ist oder anderweitig mit einem Material überzogen ist, das die Adsorption verhindert oder im Wesentlichen eliminiert. Diese Oberfläche kann chemisch oder physikalisch inert für Adsorption sein. Beispielhafte Materialien zu diesem Zweck sind dem Fachmann bekannt und können zum Beispiel aufgesprühtes oder gebackenes Silikon, Polypropylen oder Polytetrafluorethylen (PTFE) umfassen. Wir nahmen unsere bevorzugten flüssigen Zubereitungen mit 60 µg/ml (BG9589-1, 2, 3 und 4: zusammengefasst in Tabelle 1, untenstehend) und füllten sie in 1 ml lange, mit Silikon (Becton Dickinson) besprühte Spritzen aus Typ-I-Glas und in 0,75 ml Fläschchen aus Typ-I-Glas. Die Proben werden dann durch Phasenumkehr-HPLC (rpHPLC) zur Bestimmung der Proteinkonzentration analysiert. Die Daten zeigen, dass weniger Protein in Lösung in solchen Proben war, die in die Glasfläschchen gefüllt wurden, im Vergleich zu den Silikon-beschichteten vorgefüllten Spritzen. Siehe Beispiel 5.

## 6. Bevorzugte Zubereitungen

**[0061]** Wir führten kinetische Analysen der Proteinstabilität unter Verwendung der vier flüssigen Formulierungen durch, deren Endkonzentrationen in der untenstehenden Tabelle 1 gezeigt werden und die jeweils 60 µg/ml Interferon-beta enthielten. Alternative Zubereitungen, von denen manche oberflächenaktive Substanzen wie Pluronic F68 (hergestellt durch BASF) enthalten, werden in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 1: Bevorzugte Zubereitungen

pH-SYSTEM	HILFSSTOFF EN	DGÜLTIGER pH-WERT
20 mM Acetat	150 mM Arginin-HCl	5,0 ("BG9589-1")
20 mM Acetat	70 mM Glycin 100 mM Natriumchlorid	5,0 ("BG9589-2")
20 mM Phosphat	140 mM Arginin-HCl	7,2 ("BG9589-3")
20 mM Phosphat	70 mM Glycin 100 mM Natriumchlorid	7,2 ("BG9589-4")

**[0062]** Alle Bestandteile der Zubereitungen sind Materialien der USP-Qualität. Die genauen Zusammensetzungen sind:

BG9589-1

Inhaltsstoff (als Rohmaterialien)	Menge
Arginin-HCl, USP	15,8 mg
Eisessig, USP	0,167 mg

Natriumacetat-Trihydrat, USP	0,972 mg
Interferon-beta	30 µg
Wasser zu Injektionszwecken, USP	0,5 ml

BG9589-2

Inhaltsstoff (als Rohmaterialien)	Menge
Glycin, USP	2,628 mg
Eisessig, USP	0,185 mg
Natriumacetat-Trihydrat, USP	0,932 mg
Interferon-beta-1a	30 µg
Wasser zu Injektionszwecken, USP	0,5 ml
Natriumchlorid	2,922 mg

BG9589-3

Inhaltsstoff (als Rohmaterialien)	Menge
Arginin-HCl, USP	14,725 mg
Dibasisches Natriumphosphat-7H <sub>2</sub> O	2,332 mg
Monobasisches Natriumphosphat-1 H <sub>2</sub> O	0,359 mg
Interferon-beta-1a	30 µg
Wasser zu Injektionszwecken, USP	0,5 ml

BG9589-4

Inhaltsstoff (als Rohmaterialien)	Menge
Dibasisches Natriumphosphat-7H <sub>2</sub> O	1,984 mg
Monobasisches Natriumphosphat-1 H <sub>2</sub> O	0,359 mg
Interferon-beta-1a	30 µg
Glycin	2,628 mg
Natriumchlorid	2,922 mg
Wasser zu Injektionszwecken, USP	0,5 ml

[0063]

Tabelle 2: Alternative Zubereitungen

pH-SYSTEM	HILFSSTOFF EN	DGÜLTIGER pH-WERT
20 mM Acetat	150 mM Arginin-HCl und 15 mg/ml menschliches Serumalbumin	5,0
20 mM Acetat	150 mM Arginin-HCl und 0,1% Pluronic F-68	5,0
20 mM Acetat	140 mM Natriumchlorid	5,0
20 mM Acetat	15 mg/ml menschliches Serumalbumin und 140 mM Natriumchlorid	5,0
20 mM Acetat	0,1% Pluronic F-68 und 140 mM Natriumchlorid	5,0

170 mM L-Glutaminsäure, 150 mM Natriumhydroxid	15 mg/ml menschliches Serumalbumin	5,0
170 mM L-Glutaminsäure, 150 mM Natriumhydroxid	0,1% Pluronic F-68	5,0

**[0064]** Andere Materialien können in die Zubereitungen dieser Erfindung eingebunden werden. Diese können die folgenden Konservierungsstoffe einschließen, wobei alle bevorzugten Prozentsätze Gew./Vol. sind: Phenol (etwa 0,2%), Methylparaben (0,08%), Propylparaben (0,008%), m-Cresol (0,1%), Chlorbutanol (0,25%), Benzylalkohol (0,1%) und Thimerosal (0,1%). Basierend auf Analysen zur Bestimmung der Proteinaggregation und Desamidierung (Daten nicht gezeigt), sind die am stärksten bevorzugten Konservierungsmittel Chlorbutanol und Benzylalkohol.

#### 7. Kits für die parenterale Verabreichung

**[0065]** Bevorzugte Beispiele der vorliegenden Offenbarung umfassen ein abgepacktes Kit zur parenteralen Verabreichung der vorliegenden flüssigen Zubereitungen. Die Packung kann mit den flüssigen Zubereitungen der Erfindung vorgefüllte Spritzen, mehrere mit Alkohol getränkte Tupfer, mindestens eine Nadel, eine oder mehrere selbstklebende Bandagen und Gebrauchsanweisungen enthalten. Es wird auch verstanden werden, dass die vorliegenden erfindungsgemäßen flüssigen Zubereitungen mit konventionellen nadellosen Injektionsystemen verwendet werden können.

#### E. VERWENDUNG VON INTERFERONEN

**[0066]** Die erfindungsgemäßen Zubereitungen von Interferon haben antivirale Aktivität. Vgl. Beispiel 7. Für die klinische Anwendung hängt die Menge an Interferon, das in jedem speziellen Fall verabreicht wird, sowie die Häufigkeit mit der Interferon verabreicht wird, von solchen Faktoren ab wie der verwendete Interferon-Typ, die zu behandelnde Erkrankung und das Ansprechen des Patienten auf die Behandlung mit Interferon.

**[0067]** Eine bevorzugte Verwendung der flüssigen erfindungsgemäßen Zusammensetzungen ist für die Behandlung der wiederkehrenden multiplen Sklerose. Lyophilisierte (d. h. rekonstituierte) flüssige Zubereitungen von natürlichem Interferon-beta und rekombinantem Interferon-beta wurden Patienten verabreicht, die an wiederkehrender multipler Sklerose leiden. Vgl. Jacobs et al., Annals of Neurology 39: 285–294 (März 1996) und darin zitierte Literaturstellen und Jacobs und Munschauer, „Treatment of multiple sclerosis with interferons“ (Seiten 223–250) in Treatment of multiple sclerosis: trial design, results and future perspectives, (R. A. Rudnick et al., Hrsg.), London: Springer, 1992. Die hier beschriebene Verwendung von flüssigen Zubereitungen zur Behandlung von multipler Sklerose folgt denselben Protokollen und misst dieselben primären Ergebnisvariablen wie in der Veröffentlichung von Jacobs et al., vorstehend, beschrieben.

**[0068]** Ein Weg, um die Nützlichkeit der vorliegenden flüssigen Zubereitungen zu untersuchen, ist es, eine toxikologische Studie durchzuführen und die Gewebeirritation, die mit der Verabreichung der flüssigen Zubereitung einhergeht, zu untersuchen. Wir haben eine toxikologische Studie der vorliegenden flüssigen Zubereitungen in Kaninchen durchgeführt. Vgl. Beispiel 8.

**[0069]** Die folgenden Beispiele werden angeboten, um die Ausführungsformen der Erfindung zu verdeutlichen; sie sollten jedoch nicht als Einschränkung des Umfangs der Erfindung angesehen werden.

#### BEISPIEL 1 Testverfahren

**[0070]** Mehrere gut charakterisierte Verfahren werden verwendet, um die physikalischchemischen Eigenschaften von Interferon-beta in unseren flüssigen Zubereitungen zu bestimmen und diese Verfahren können verwendet werden, um die Eigenschaften von anderen Interferonen ebenfalls zu überprüfen.

**[0071]** Die Anwesenheit/Abwesenheit von unlöslichen Aggregaten wird durch Messung der Absorption bei 320 nm und der Transmission bei 580 nm überprüft. Die Konzentration von löslichem Protein wird entweder durch Messung der Absorption bei 278–280 nm (mit einem Extinktionskoeffizient von 1,5) oder durch hochauflösende Phasenumkehr-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Verwendung von bekannten Konzentrationen von Interferon-beta als Standards, die dem Puffer der Zubereitung zugegeben werden, bestimmt. Die Proben der flüssigen Zubereitung werden vor dem Test zentrifugiert. Der Prozentsatz der löslichen Aggregate wird durch Trennung der Aggregate vom Interferon-beta-Monomer durch Größenausschlusschromatographie auf

einer TSK-Gel® G2000SWXL-Säule (Toso Haas, Montgomeryville, PA) bestimmt. Die Flächen der bei 280 nm aufgezeichneten Peaks werden verwendet, um den Prozentsatz der löslichen Aggregate zu berechnen.

**[0072]** Die Stabilität des Peptidrückgrats wird durch Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE) bestätigt. Interferon-beta wird mit Mercaptoethanol in Gegenwart von Natrium-Dodecylsulfat reduziert, bevor es der Elektrophorese auf einem 10–20%-igen Gradientengel (MiniPlus Sepragel®, Integrated Separation Systems, Natick, MA) unterworfen wird. Die Proteine werden dann elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mittels Immunodetektion unter Verwendung eines anti-Interferon-beta-Antikörpers und eines mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörpers entwickelt. Vgl. zum Beispiel Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach, 2te Ausgabe, B. D. Hames und D. Rickwood, IRL Press.

**[0073]** Die Veränderung der Netto-Oberflächenladung, die durch Desamidierung oder andere chemische Veränderungen hervorgerufen wird, wird durch isoelektrische Fokussierung auf einem Polyacrylamidgel (IEF 3–10 MiniPlus Sepragel®, Integrated Separation Systems) überprüft. Vgl. Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach, ebenda.

**[0074]** Die Oxidation von Methionin, die Desamidierung von Asparagin und andere mögliche chemische Veränderungen werden auch durch Peptidkartierung überprüft. Interferon-beta wird mit Endoproteinase Lys-C (Wako Pure Chemicals) in Gegenwart von Dithiothreitol verdaut und die entstandenen Peptidfragmente werden durch Phasenumkehr-HPLC getrennt. Vgl. allgemein, Kalgahtgi, K. & Horvath, C. „Rapid Peptide Mapping by High Performance Liquid Chromatography”, J. Chromatography 443, 343–354 (1988).

**[0075]** Das N-verknüpfte Oligosaccharidprofil wird unter Verwendung eines Fluorophorunterstützten Kohlenhydratelektrophorese-Systems (FACE®) von Glyko, Inc. (Novato, CA) bestimmt. Die Asparagin-verknüpften (N-verknüpften) Oligosaccharide werden unter Verwendung des Enzyms Peptid-N-Glycosidase F aus dem Glycoprotein freigesetzt, dann mit einem Fluorophor an den reduzierenden Enden durch reduktive Aminierung markiert, getrennt und darin auf einem Polyacrylamidgel quantifiziert.

**[0076]** Die antivirale Aktivität von Interferonen wird durch eine Vielzahl von Verfahren bestimmt, so wie diejenigen, die ausführlicher beschrieben sind bei: W. E. Stewart II, The Interferon System, Springer-Verlag (2te Ausg. 1981). Der Test auf Hemmung der cytopathischen Wirkung (Cytopathic Effect Inhibition Assay (CPE)) ist insbesondere nützlich zur Bestimmung der antiviralen Aktivität von Interferon. Unser bevorzugtes Verfahren wird im WHO Technical Report Serie Nr. 725, Annex 1 (1985) beschrieben, der hierin durch Inbezugnahme eingebunden wird. In Kurzform wird dieses CPE-Verfahren eingeleitet, indem eine Arbeitsstammlösung eines Interferon-beta-Standards hergestellt wird, die zuvor gegen einen WHO-Referenzstandard kalibriert wurde. Diese Stammlösung wird in D-MEM+-Medium enthaltend 10% fötales Kälberserum und 4 mM L-Glutamin bei einer Konzentration von 10.000 Einheiten (U) pro ml hergestellt. Am Testtag werden Standard, Kontrollen und Proben in D-MEM+-Medium in drei getrennten Verdünnungsserien verdünnt: a) ausgehend von 32 U/ml gefolgt von 2-fachen Verdünnungen, b) ausgehend von 12 U/ml gefolgt von 1,5-fachen Verdünnungen und c) ausgehend von 6 U/ml gefolgt von 1,2-fachen Verdünnungen. Fünfzig Mikroliter der Verdünnungen werden in Spalten in die Vertiefungen von 96-Loch-Mikrotiterplatten gegeben, eine Platte pro Verdünnungsserie. Als nächstes werden A549-Zellen (ATCC-Katalognummer CCL-185, Rockville, MD) in D-MEM+ mit  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in jede Vertiefung gegeben, 50 Mikroliter pro Vertiefung, was eine zweifache Verdünnung sowohl der Zellen als auch des Interferon-beta bewirkt. Die Zellen und das Interferon werden bei 37 Grad C in 5% Kohlendioxid für 15–20 Stunden inkubiert. Der Inhalt der Platte wird in einen Behälter mit Bleiche geschüttelt und 100 Mikroliter EMC(Encephalomyocarditis)-Virus werden in einer geeigneten Verdünnung in Medium zu jeder Vertiefung gegeben. Das Virus und die Zellen werden bei 37 Grad C und 5% Kohlendioxid für 30 Stunden inkubiert. Der Inhalt der Platte wird in einen Behälter mit Bleiche geschüttelt und 0,75% Kristallviolett-Farbstoff wird zu den Platten gegeben. Nach 5 bis 10 Minuten werden die Platten mit destilliertem Wasser gewaschen und trocknen gelassen. Jede Testplatte beinhaltet Vertiefungen zur Kontrolle des Zellwachstums, die weder Interferon noch EMC enthalten, Vertiefungen zur Viruskontrolle, die EMC und Zellen enthalten jedoch kein Interferon, und eine Verdünnungsreihe mit Interferon-Standard. Die Platten werden visuell überprüft, um die letzte Vertiefung jeder Spalte mit lebenden Zellen zu bestimmen (> 25% konfluente Violettfärbung). Die Nachweisgrenze wird als niedrigste Konzentration des Standards, die vor der Cytotoxizität des Virus schützt, bestimmt. Die Probenverdünnung in der letzten positiven Vertiefung wird mit der für den Standard bestimmten Nachweisgrenze und dem Probenverdünnungsfaktor multipliziert, um die Aktivität des Interferon (MU/ml) in der Probe zu erhalten. Die Ergebnisse jeder Platte werden in log-Einheiten umgewandelt, um ein geometrisches Mittel zu bestimmen und um die 95% Konfidenzintervalle zu berechnen.

## BEISPIEL 2: Die Wahl des Puffersystems

**[0077]** Wir haben drei Gruppen von Puffern enthaltend zwischen neun und 10 verschiedene Komponenten für jede Gruppe angesetzt. Gruppe I enthält eine Serie von Natriumphosphat- und/oder 100 mM Natriumchlorid-Lösungen zwischen pH 4,0 und 7,2. Gruppe II enthält eine zusätzliche Serie von Natriumcitratpuffern zwischen pH 4,0 und 7,0. Gruppe III enthält eine Serie von Natriumsuccinat-, Natriumacetat- und Natriumcarbonat-Pufferlösungen, alle kombiniert mit 100 mM Natriumchlorid, mit pH-Werten im Bereich von 4,0 bis 7,2. Zwei andere Lösungen ersetzten das Natriumchlorid mit 50 mM Natriumsulfat bei einem pH-Wert von 4,0 und 7,2.

**[0078]** Aufgetautes Interferon-beta aus dem großtechnischen Verfahren wird über Nacht in verschiedene Puffer bei 2–8 Grad C mit mindestens zwei Pufferwechseln dialysiert und dann vor der Verwendung sterilfiltriert. Proteinkonzentrationen werden durch die Absorption bei 278 nm (mit einem Extinktionskoeffizienten von 1,5  $\text{mg}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bestimmt und alle Proben enthielten 140  $\mu\text{g}/\text{ml}$  oder 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Interferon-beta. Die Proben werden filtriert und durch partielle Füllung von 2,2 ml Eppendorfgefäß in vier Sätze aufgeteilt. Ein Satz wird bei 2–8 Grad aufbewahrt, ein Satz wurde für 6 Tage bis zwei Wochen bei 37 Grad C aufbewahrt, ein anderer Satz wird für 7 bis 9 Stunden auf einem Rotationsgerät gehalten und der letzte Satz wird als Kontrolle für den Zeitpunkt null verwendet. Der Prozentsatz des Proteinverlustes durch unlösliche Aggregate wird durch den Verlust der Proteinkonzentration während verschiedener Behandlungen, dividiert durch die Ausgangskonzentration, berechnet.

## Ergebnisse:

**[0079]** Der Prozentsatz des Proteinverlustes durch unlösliche Aggregate wird als Verlust der Proteinkonzentration, dividiert durch die Ausgangskonzentration, berechnet. Eine statistische Analyse aller Daten zeigt an, dass die Interferonproben in Puffern mit pH 4,0 und 5,0 einen niedrigeren Prozentsatz an Proteinverlust durch Aggregation hatten, als solche mit höherem pH-Wert. Interferonproben, die bei 37 Grad C und pH 4,0 und 5,0 inkubiert wurden, verloren zwischen 10% und 15% durch Aggregation. Bei größeren pH-Werten als 6,0 erhöhten sich die Verluste bis auf 40–50%. Wir bestimmten auch, dass die Interferonproben bei höheren pH-Werten als 6,0 mehr lösliche Aggregate aufweisen. Außerdem haben wir durch Peptidkartierung bestimmt, dass, wenn sich der pH-Wert von 4,0 auf 7,2 erhöht, es einen deutlichen linearen Anstieg bei der Menge von Interferon gibt, das desamidiert ist. Bei pH-Werten von 7,0 und höher wird während der Untersuchung mehr als 85% des Interferons desamidiert. Wir haben den isoelektrischen Punkt (pI) der Proteinspezies in der Probe (d. h. der pH-Wert, bei dem das Protein nicht in einem elektrischen Feld migriert und die mittlere Ladung null ist) mit IEF/Western-Blots gemessen und die Blots zeigen zusätzliche pI-Banden der Proben in Natriumcitrat und eine Verschiebung der Bandenintensität für Proben in Natriumsuccinat. Phosphat weist keine Pufferkapazität bei pH 5,0 auf. Natriumacetat mit Natriumchlorid bei pH 5,0 zeigte keine Veränderung beim Bandenmuster oder der Intensität der Banden.

## Beispiel 3: Die Wirkung von Hohlraumbildung

**[0080]** Während unserer in Beispiel 2 beschriebenen pH-Screening-Experimente entdeckten wir, dass der Gasraum der Lagerungsröhrchen für den Proteinverlust einiger Proben kritisch zu sein scheint. Mit 1,5 ml der Proben in Röhrchen mit 2,2 ml Volumen wurde kein Proteinverlust beobachtet. Im Gegensatz dazu produzierten 1,2 ml der Probe eine deutliche Erhöhung von Aggregaten. Dies ist konsistent mit unseren Beobachtungen, dass die Bildung von aggregiertem Interferon-beta während des Schrittes der viralen Inaktivierung beim Reinigungsverfahren vom Gehalt des gelösten Sauerstoffs während dieses Schrittes abhängig ist.

**[0081]** In Kurzform beinhaltet der Schritt der viralen Inaktivierung die Anpassung des pH-Wertes der Eluate der Chelat-Sepharose (vgl. Sektion C) von 7,85  $\pm$  0,25 auf zwischen 2,5 und 3,5 mit 15% Phosphorsäure, das Halten der angesäuerten Eluate für 120–135 Minuten und dann die Wiederanpassung des pH-Wertes auf 6,7  $\pm$  0,7 mit 0,5 N Natriumhydroxid. Alle Schritte werden bei 2–8 Grad C durchgeführt. Wir konzipierten eine Untersuchung, um zu bestimmen, ob eine Beziehung zwischen der Bildung von Aggregaten von Interferon-beta bei diesem Schritt und der Menge des gelösten Sauerstoffs besteht.

## Materialien und Verfahren

**[0082]** Das Eluat aus der Chelat-Sepharose-Säule wird in Aliquots zu 50 ml oder 100 ml geteilt und in 100 ml Spinnerflaschen überführt. Zu jeder Flasche wird 1 ml mit Argon begaste 15%ige Phosphorsäure gegeben. Die Flasche wird dann für etwa 2 Minuten vorsichtig gerührt und ohne Rühren für etwa 2 Stunden bei 2–8 Grad C ohne Rühren gehalten. Nach dieser Wartezeit werden 6,5 ml mit Argon begastes Natriumhydroxid zugege-

ben und die Probe durch Größenausschlußchromatographie zu verschiedenen Zeitpunkten getestet. Gelöster Sauerstoff innerhalb in der Flüssigkeit wird kontinuierlich mit einer Sauerstoffsonde gemessen (Orion, Modell 860) und zum Zeitpunkt der Basenzugabe aufgezeichnet. Für Proben mit Gehalten an gelöstem Sauerstoff, die gleich oder weniger als 10% sind, wird Argongas durch den Gasraum der Reaktionsgefäße geblasen.

**[0083]** Ergebnisse: Die Daten werden in [Fig. 1](#) dargestellt, die eine klare Beziehung zwischen der Menge gelösten Sauerstoffs, die zum Zeitpunkt der Zugabe von Natriumhydroxid vorhanden ist, und der Ausbeute an Monomeren von Interferonbeta durch den Virus-Inaktivierungsschritt erkennen lässt. Die Ausbeutewerte, die bei Konzentrationen von gelöstem Sauerstoff, die geringer oder gleich 10% sind, sind signifikant unterschiedlich von allen anderen Ausbeuten bei anderen Sauerstoffkonzentrationen. Wir haben auch das Aggregat charakterisiert (Daten hier nicht gezeigt) und bestimmt, dass seine spezifische Aktivität etwa 30–40-fach reduziert ist, ausgehend vom Zwischenprodukt des großtechnischen Verfahrens. Wir haben auch bestimmt, dass mehr als etwa 90% des Aggregats gegen Denaturierung durch SDS unter nicht-reduzierenden Bedingungen resistent ist, was eine kovalente Kreuzvernetzung nahe legt. Unter reduzierenden Bedingungen (2% Beta-Mercaptoethanol) kollabiert das Aggregat in das Monomer, was auf eine Vernetzung hinweist, die Disulfidbindungen beinhaltet.

#### Beispiel 4: Wahl des Hilfsstoffs

**[0084]** Eine Serie von Zubereitungen von Interferon-beta (60 µg/ml), die verschiedene Hilfsstoffe enthalten, werden in einem bevorzugten Puffer mit einem pH-Wert von 5,0, der 50 mM Natriumcitrat und 100 mM Natriumchlorid enthält, hergestellt. Die Hilfsstoffe umfassen Glycerin, Arginin-HCl, Lysin-HCl, Saccharose, Glycerin, PEG3350, Glutathion und Pluronic F-68. Das Zwischenprodukt des großtechnischen Verfahrens zu Herstellung von Interferon-beta wird in 50 mM Natriumacetat und 100 mM Natriumchlorid, pH 5,0, über Nacht bei 2–8 Grad C mit mindestens zweimaligem Pufferwechsel dialysiert und dann vor der Verwendung filtriert. Die Konzentrationen an Interferon-beta werden durch Absorption bei 278 nm mit Subtraktion des Hintergrunds bestimmt. Alle Proben werden auf Endkonzentrationen von etwa 60 µg/ml verdünnt. Alle hergestellten Proben werden filtriert, zwei Milliliter werden in 4 ml Glasfläschchen (nicht silikonisiert) überführt, der Gasraum mit Argon begast und die Fläschchen versiegelt. Probensätze werden bei 2–8 Grad C und bei 37 Grad C für Zeiträume bis zu zwei Wochen inkubiert. Andere Proben werden durch Rotation bei Raumtemperatur für 3 Tage mechanisch belastet.

**[0085]** Die Proben werden gemäß den Verfahren von Beispiel 1 analysiert. Zusätzlich wird der Prozentsatz gelösten Sauerstoffs in der Zubereitung mit einem Blutgasanalysator von Ciba-Corning Modell 248 gemessen. Der „experimentelle“ Wert ist der Sauerstoffpartialdruck (mm Hg) der Proben abzüglich des Blindwertes des mit Stickstoff begasten Puffers und der „Kontroll“-Wert ist der Sauerstoffpartialdruck des Blindwertes des bei Raumtemperatur gelagerten Puffers abzüglich des Sauerstoffpartialdrucks des Blindwertes des mit Stickstoff begasten Puffers. Der Prozentsatz des gelösten Sauerstoffs („experimentell“/„Kontrolle“) ist immer geringer als 30%.

#### Ergebnisse:

**[0086]** IEF/Western-Blots und SDS-PAGE/Western-Blots von für zwei Wochen bei 37 Grad C inkubierten Proben zeigen eine Bandenverschiebung und einen Verlust der Intensität an, sowie die Anwesenheit von Interferon-Multimeren in Proben, die PEG3350 und Glutathion enthalten. Nach einer zusätzlichen Woche bei 37 Grad C zeigt der Glycerin-Hilfsstoff eine zusätzliche Bande in unseren Blots. Der Saccharose-Hilfsstoff zeigt einen Verlust der Bandenintensität. Dieses anfängliche Screeningverfahren erlaubte es uns, für weitere Untersuchungen Arginin-HCl, Glycerin, Natriumchlorid und Mannit genauer in Betracht zu ziehen.

#### Beispiel 5: Adsorption von Interferon

**[0087]** Aufgetautes Interferon-beta aus großtechnischer Herstellung wird zu BG9589-1, 2, 3 und 4 (vgl. Tabelle 1) über Nacht bei 2–8°C mit mindestens zwei Pufferwechseln dialysiert und dann vor der Verwendung filtriert. Die Proteinkonzentrationen werden durch Absorption bei 280 nm bestimmt (mit einem Extinktionskoeffizient von 1,5 mg–1 ml × cm–1). Alle Proben werden auf Endkonzentrationen von etwa 60 µg/ml verdünnt. Die verdünnten Proben werden filtriert und entweder 0,5 ml dreifach in 1,0 ml lange, mit Silikon ausgesprühte BD-Spritzen (Typ-I-Glas) mit Stickstoff-begasten Gasräumen oder 0,75 ml dreifach in 0,75 ml Typ-I-Glasfläschchen mit Argon-begasten Gasräumen gefüllt. Die Proteinkonzentrationen werden durch Phasenumkehr-HPLC bestimmt (Beispiel 1).

## Ergebnisse:

**[0088]** Die untenstehende Tabelle 3 führt die Proteinkonzentrationen auf, die durch Phasenumkehr-HPLC bestimmt wurden. Die Daten zeigen, dass in den Proben, die in Glasfläschchen gefüllt wurden, im Vergleich zu den Silikon-beschichteten vorgefüllten Spritzen weniger Protein vorhanden ist. Daher werden die silikonisierten Spritzen für die flüssigen Zubereitungen von Interferon-beta verwendet.

Tabelle 3:

	Glasfläschchen (µg/ml) (SD)	Silikonisierte Spritzen (µg/ml) (SD)
BG9589-1	59,3 (2,6)	63,3 (2,5)
BG9589-2	58,3 (0,7)	61,7 (0,1)
BG9589-3	56,4 (0,4)	58,8 (1,1)
BG9589-4	55,5 (0,7)	59,3 (0,5)

## Beispiel 6. Zubereitungen bei physiologischem pH-Wert

**[0089]** Ionenstärke/Phosphat. Wir führten anfängliche Untersuchungen in Phosphat/Natriumchlorid-Puffersystemen bei pH 7,2 mit varierenden Konzentrationen der Pufferkomponenten durch, in denen die Phosphatkonzentration zwischen 10, 50 und 75 mM variierte mit einer Ionenstärke (definiert durch  $I = \sum c_i z_i^2$  wobei  $c_i$  und  $z_i$  die molare Konzentration beziehungsweise die Valenzladung der Ionenart  $I$  ist) von 0,2, 0,4 und 0,6, eingestellt durch die Zugabe von Natriumchlorid.

**[0090]** Wir wendeten ein vollständiges Konzept der experimentellen Faktorenanalyse auf die Variablen der Phosphatkonzentration (10, 50 und 75 mM) und der Ionenstärke ( $I = 0,2, 0,4$  und  $0,6$ ) an. Zusammensetzungen von monobasischem Natriumphosphat, dibasischem Natriumphosphat und Natriumchlorid (um die gewünschte Ionenstärke zu erreichen) in den Puffern werden unter Verwendung einer Tabellenkalkulation berechnet, die übernommen wurde von Ellis und Morrison „Buffers of Constant Ionic Strength for Studying pH-dependent Processes”, Methods Enzymol. 87: 405–426 (1982). Die Gleichungen erlaubten die Bestimmung der erforderlichen Mengen von jeder Pufferkomponente für den angegebenem pH-Wert, die Phosphatkonzentration und die Ionenstärke. Jede der neun in der experimentellen Faktorenanalyse verwendeten Lösungen wird durch Pufferaustausch des Zwischenproduktes der großtechnischen Herstellung von Interferon-beta durch Pharmacia PD-10 Entsalzungssäulen erhalten. Die pH-Werte aller entstehenden Lösungen liegen bei 7,20  $\pm$  0,15. Die Konzentrationen werden durch Absorption bei 280 nm gemessen und dann mit dem geeigneten Puffer auf 150 µg/ml Interferon-beta verdünnt. Die entstehenden Lösungen werden unter Argon durch 0,22 Micronfilter sterilfiltriert und 1,3 ml werden in 5 ml Glasfläschchen mit einem Argon-gefüllten Gasraum aliquotiert. Die Proben werden bei 37 Grad C für 6 Tage inkubiert in dreifacher Ausfertigung laufen gelassen. Die Proben werden durch Prozent Transmission bei 580 nm, Prozent Proteinrückgewinnung und IEF-PAGE/Western-Blots analysiert.

## Ergebnisse:

**[0091]** Die Analyse des Prozentsatzes der Transmission hinsichtlich der variierten Ionenstärke zeigt einen Trend zur ansteigenden Transmission (d. h. sinkende Mengen unlöslicher Proteinaggregate) mit steigender Ionenstärke. Die Daten der prozentualen Proteinrückgewinnung zeigen einen ähnlichen Trend obwohl IEF-PAGE und Western-Blots keinen Trend zur Desamidierung mit variiender Ionenstärke zeigen, so dass alle Proben gleich desamidiert sind. Daher tendierten die Proben nach Lagerung für sechs Tage bei 37 Grad C dazu, weniger Aggregation mit sinkender Phosphatkonzentration und steigender Ionenstärke zu zeigen. Die Ergebnisse der Experimente zur prozentualen Transmission und prozentualen Rückgewinnung als Funktion der variierten Phosphatkonzentration (hier nicht gezeigt) zeigen einen schwachen Trend zu sinkender %-Transmission mit steigender Phosphatkonzentration, aber eine Analyse der Varianz zeigt keinen signifikanten Unterschied in den Mittelwerten der Proben mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen. Die Daten der prozentualen Rückgewinnung zeigen eine verbesserte Proteinrückgewinnung für die niedrigeren Phosphatkonzentrationen (einen signifikanten Unterschied bei 94% Konfidenzbereich). IEF-PAGE und Western-Blots zeigen keinen unterscheidbaren Trend bei der Desamidierung mit variiender Phosphatkonzentration.

**[0092]** Verhältnis Hilfsstoff/Salz. Vorläufige Untersuchungen (nicht gezeigt) zeigten an, dass einige Hilfsstoffe Salz benötigen könnten (z. B. Natriumchlorid), um eine hohe Ionenstärke beizubehalten und um eine stabilisie-

rende Wirkung bei pH 7,2 auszuüben. Wir konzipierten eine experimentellen Faktorenanalyse unter Verwendung von Hilfsstoffen (Glycin, Lysin, Arginin, Saccharose und Mannit) und Anteile von Natriumchlorid, die zur Isotonizität beitragen ( $f_{\text{Salz}} = 0, 0,25, 0,75$  und 1,0). Der Anteil wird berechnet mit:  $f_{\text{Salz}} = O_{\text{Salz}}/(O_{\text{Salz}} + O_{\text{Hilfsstoff}})$ , wobei  $O_{\text{Salz}}$  und  $O_{\text{Hilfsstoff}}$  die Osmolalitäten in mOsm/kg des Natriumchlorids beziehungsweise des Hilfsstoffes in der Lösung sind. Der Salzanteil stellt ein Mittel bereit zum Vergleich von Salzeffekten bei verschiedenen Hilfsstoffen. Alle Proben enthielten Zusätze zur Isotonizität mit variierenden Verhältnissen von Hilfsstoff:Salz (definiert durch  $f_{\text{Salz}}$ ).

**[0093]** Zehnprozentige Stammlösungen (Gew./Vol.) jedes Hilfsstoffes in 20 mM Phosphat, pH 7,2, werden hergestellt, entgast und mit Argon begast. Eine Stammlösung von 250 mM Natriumchlorid, 20 mM Phosphat, pH 7,2 wird hergestellt, entgast und mit Argon begast. Das Zwischenprodukt der großtechnischen Herstellung von Interferon-beta wird extensiv gegen mit Argon begasten 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, dialysiert. Die entstehende Lösung wird auf die Konzentration von Interferon-beta durch Absorption bei 280 nm untersucht und mit Phosphatpuffer und entsprechenden Stammlösungen von Hilfsstoff und Salz verdünnt um 60 µg/ml Interferon-beta und die gewünschten Endbedingungen von Salz und Hilfsstoff zu erreichen. Die entstehenden Proben werden sterilfiltriert (0,22 Micron) und in 1,0 ml Silikon-besprühte Typ-1 Glasspritzen (0,5 ml Füllvolumen) von Becton Dickinson mit einem Stickstoff-Gasraum gefüllt. Die Proben werden bei 40 Grad C gelagert.

**[0094]** Nach 6 Tagen werden die Arginin-, Glycin- und Saccharose-Proben durch Absorption bei 320 und 280 nm analysiert, sowohl vor und nach der Filtration durch 0,22 Micronfilter. Nach 2 Wochen wurden Arginin, Lysin und Mannit in ähnlicher Weise analysiert, zusammen mit IEF-PAGE, reduzierender SDS-PAGE und nicht-reduzierender SDS-PAGE. Kontrollproben wurden zwischen 2 und 8 Grad C aufbewahrt und ähnlich analysiert.

#### Ergebnisse:

**[0095]** Die Rückgewinnung von Interferon-beta-1a (als Prozent der Kontrolle) steigt mit der Erhöhung von  $f_{\text{Salz}}$  für Saccharose und Mannitol bis ein Maximum der Rückgewinnung bei  $f_{\text{Salz}} = 1$  (130 mM Natriumchlorid) erreicht wird. Für Arginin und Lysin sinkt die Rückgewinnung mit steigendem  $f_{\text{Salz}}$ . Die maximale Rückgewinnung für Zubereitungen mit Glycin bei einem pH-Wert von 7,2 wird bei etwa  $f_{\text{Salz}} = 0,75$  erreicht.

**[0096]** Diese Hilfsstoff-Screeninguntersuchung unter Verwendung eines Phosphatpuffers mit einem pH-Wert von 7,2 mit verschiedenen zur Isotonizität beitragenden Hilfsstoffen wie Glycin, Lysin, Arginin, Mannit und Saccharose, zeigte eine schwache Rückgewinnung für alle nicht geladenen Hilfsstoffe. Das Ausmaß der Desamidierung wurde durch diese Zusätze nicht beeinflusst. Zum Beispiel zeigen reduzierende und nicht-reduzierende SDS/PAGE einen Verlust von nicht-glycosylierten Interferon-beta-Arten bei allen Zubereitungen an und schwerere Multimerbanden für isotonisches Natriumchlorid allein und Mannit. In der Summe gibt es daher eine starke Korrelation zwischen dem ionischen Charakter des Hilfsstoffs und seiner Fähigkeit, Interferon-beta gegen Aggregation in diesen Puffersystemen bei physiologischem pH-Wert zu stabilisieren. Nicht-ionische Zusätze wie Saccharose und Mannit scheinen keinen Schutz zu bieten oder können sogar einen Proteinverlust bei physiologischem pH-Wert fördern. Natriumchlorid mit einer einfachen Ladung pro löslicher Spezies schneidet besser ab als entweder Mannit oder Saccharose. Aminosäuren enthalten zwei Ladungen pro Molekül bei physiologischem pH-Wert. Im Falle von Glycin scheint die zwitterionische Natur des Moleküls selbst nicht ausreichend genug zu sein, um Interferon-beta zu stabilisieren. Arginin und Lysin, die je drei Ladungen pro Molekül enthalten, stabilisieren Interferon-beta besser als Zubereitungen mit entweder Natriumchlorid allein oder Glycin/Natriumchlorid.

#### Beispiel 7: Stabilität und kinetische Untersuchungen

**[0097]** Die Zubereitungen werden aseptisch unter einer inerten Atmosphäre abgefüllt, die Spritzen bei einer Reihe von Temperaturen für verschiedene Zeitspannen inkubiert und der Inhalt der Spritzen wird analysiert. In Kurzform wird aufgetautes Interferon-beta aus großtechnischer Herstellung zu BG9589-1, -2, -3 und -4 über Nacht bei 2–8 Grad C mit mindestens zwei Pufferwechseln dialysiert. Die Proteinkonzentrationen werden durch Absorption bei 280 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von 1,5 ml/mg/cm bestimmt. Alle Proben werden auf eine Endkonzentration von Interferon-beta-1a von etwa 60 µg/ml verdünnt. Die vier Zubereitungen von Interferon-beta-1a der Tabelle 1 werden filtriert und 0,5 ml werden in 1,0 ml lange Becton Dickinson (BD) Spritzen, deren innere Oberflächen mit gebackenem oder aufgesprühtem Silikon beschichtet wurden, abgefüllt. Die Proben wurden durch OD, Größenausschluss-HPLC (SEC), isoelektrische Focussierungsgelektrophorese (IEF)/Western-Blot, reduzierte Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE)/Western-Blot, Peptidkartierung, Fluorophor-vermittelte Kohlenhydratelektrophorese (FACE) und den CPE-Bioassay analysiert. Der Gasraum in der Spritze ist Stickstoffgas. Die Spritzen werden bei 2–8 Grad C, 25 Grad

C, 33 Grad C und 40 Grad C für bis zu neunzig Tage inkubiert. Die Proben werden gemäß den Verfahren in Beispiel 1 analysiert.

Ergebnisse:

**[0098]** Wir analysierten die Proteinkonzentrationen von unseren Proben, normalisiert gegen die des Ausgangsmaterials für Zeiträume bis zu neunzig Tagen bei verschiedenen Temperaturen. [Fig. 2](#) verdeutlicht, dass BG9589-1 vollständige Proteinstabilität (kein Proteinverlust) nach 3 Monaten Inkubation bei Temperaturen im Bereich von 2–8 Grad C (durchschnittlich 4 Grad C) bis zu 25 Grad C zeigt. Bei einer Lagerungstemperatur (33 Grad C) von näherungsweise Körpertemperatur waren etwa 18% des Proteins abgebaut. Bei einer Lagerungstemperatur (40 Grad C) oberhalb der Körpertemperatur waren etwa dreißig Prozent des Proteins nach 3 Monaten abgebaut. Im Wesentlichen identische Ergebnisse wurden mit BG9589-2 erhalten (nicht gezeigt). [Fig. 3](#) verdeutlicht die Ergebnisse der Lagerungstests für 2 Monate mit BG9589-3. Proteinabbau war minimal bei 4 bis 25 Grad C, aber war schnell bei höheren Temperaturen. Die Ergebnisse für BG9589-4 sind im Wesentlichen identisch mit denen in den [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#). Dies Daten wurden unter Verwendung von reduzierender SDS-PAGE/Western-Blots bestätigt.

**[0099]** In den „gebackenen Spritzen“ sind während der Dauer dieser Untersuchung keine nachweisbaren löslichen Aggregate vorhanden. Keine signifikanten Veränderungen werden bei Proteinkonzentration, CPE-Test, Prozent oxidiertes AP6 und den Kohlenhydratprofilen beobachtet. Es gibt laut reduzierender SDS-PAGE/Western-Blot und IEF/Western-Blot keine beobachtbaren Veränderungen in den Proben. Es gibt einen leichten Anstieg bei der prozentualen Desamidierung im Vergleich zum Ausgangspunkt. Das Zwischenprodukt der großtechnischen Herstellung, das verwendet wurde, um diese Spritzen zu füllen, hatte 37% Desamidierung, was höher ist als der Wert von 33,8% des Materials, nachdem es in die Spritzen gefüllt wurde. Dieser letztere niedrige Wert kann durch die Variabilität des Tests bedingt sein. In den „gesprühten“ Spritzen gibt es während der Dauer der Untersuchung ebenfalls keine nachweisbaren löslichen Aggregate. Es werden keine signifikanten Veränderungen bei der Proteinkonzentration, CPE-Test, Prozent Desamidierung, Prozent oxidiertes AP6 und den Kohlenhydratprofilen beobachtet. Es gibt laut reduzierender SDS-PAGE/Western-Blot und IEF/Western-Blot keine beobachtbaren Veränderungen in den Proben. Kurz haben die Ergebnisse soweit gezeigt, dass das Endprodukt BG9589-1 bis zu 3 Monate bei 2–8 Grad C in den Spritzen mit „gebackenem Silikon“ und 6 Monate bei 2–8 Grad C in den Spritzen mit „gesprühtem Silikon“ stabil ist.

**[0100]** Wir führten den antiviralen CPE-Test mit den Zubereitungen BG9589-1 und BG9589-2 (vgl. Tabelle 1) durch, nachdem die Spritzen aseptisch gefüllt wurden. Die berichteten Aktivitätswerte sowohl für BG9589-1 und BG9589-2 sind 12,0 MU/ml. Der antivirale CPE-Test wurde nach Lagerung der Proben für bis zu 3 Monate bei zwischen 2 und 8 Grad C wiederholt. Die berichteten Aktivitätswerte für BG9589-1 sind 11,6 MU/ml (n = 8) mit einem Konfidenzintervall von 10,2–13,3 MU/ml.

**[0101]** Wir haben auch die Stabilität des Zwischenproduktmaterials der großtechnischen Herstellung von BG 9589-1 bei 2–8 Grad C für 5 Monate und bei –70 Grad C für 6 Monate gemessen. Proben von BG9589-1 aus Pilotdialfiltrationsuntersuchungen wurden mit den Verfahren aus Beispiel 1 analysiert. Die Ergebnisse haben bislang gezeigt, dass Material aus dem Herstellungsverfahren von BG9589-1 bei 2–8 Grad C für 5 Monate stabil ist und bei –70 Grad C für 6 Monate.

**[0102]** Während der Dauer der dieser speziellen Untersuchung gibt es keine nachweisbaren löslichen Aggregate. Keine signifikanten Veränderungen werden bezüglich der prozentualen Desamidierung und der Kohlenhydratprofile beobachtet (Die Unterschiede in der prozentualen Desamidierung liegen in der Variabilität des Tests.). Es gibt laut SDS-PAGE/Western-Blot und IEF/Western-Blot keine beobachtbaren Veränderungen in den Proben. Es gibt eine leichte Abnahme der Proteinkonzentration. Die Abnahme der Proteinkonzentration bei –70 Grad C kann dadurch bedingt sein, dass die Probe einen Zyklus des Einfrierens/Auftauens durchlaufen. Die Abnahme der Proteinkonzentration liegt immer noch innerhalb von 15% der anfänglichen Konzentration.

Beispiel 8: Prähinische Studien

**[0103]** Eine Studie zur lokalen Verträglichkeit einer einzelnen intramuskulären (IM) Dosis in Kaninchen wird durchgeführt, welche die lokale Toxizität von Interferon bewertet, wenn es in mehreren neuen Zubereitungen verabreicht wird. Die Reaktionen an der Injektionsstelle durch die Verabreichung der vorliegenden flüssigen Formulierung oder mit lyophilisierten und rekonstituierten Zubereitungen von Interferon sind vergleichbar zu denen, die nach Verabreichung von normaler physiologischer Salzlösung auftreten.

1. Kaninchen Irritations-/Bioverfügbarkeitsstudie nach Verabreichung  
einer IM-Einzeldosis von vier Zubereitungen von Interferon-beta

**[0104]** Zwanzig männliche weiße Neuseeland-Kaninchen erhielten je eine einzelne intramuskuläre (IM) Injektion von 30 µg Interferon-beta-1a als eine von fünf Zubereitungen: BG9589-1 (pH 5,0, Acetatpuffer, Arginin-Stabilisator, 0,5 ml/Dosis), BG9589-2 (pH 5,0, Acetatpuffer, Glycin/NaCl-Stabilisator, 0,5 ml/Dosis), BG9589-3 (pH 7,2, Phosphatpuffer, Arginin-Stabilisator 0,5 ml/Dosis), BG9589-4 (pH 7,2, Phosphatpuffer, Glycin/NaCl-Stabilisator, 0,5 ml/Dosis) und eine lyophilisierte Zubereitung von Interferon-beta bei pH 7,2 enthaltend 1,5% HSA, 1,0 ml/Dosis (Vgl. Jacobs et al., vorstehend).

**[0105]** Je vier Tiere erhielten jede Behandlung. Tiere, die BG9589-1 oder die lyophilisierte Zubereitung erhielten, bekamen eine Injektion eines äquivalenten Volumens normaler physiologischer Salzlösung an einer contralateralen Stelle als Negativkontrolle. Blutproben werden während der 72 Stunden nach der Dosierung für Analysen der Aktivität von Interferon-beta im Serum genommen. Makroskopische Beurteilungen der Haut nach Erythemen, Narbenbildung und Ödemen werden 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach der Dosierung durchgeführt. Nach den 72 Stunden der Blutentnahme nach der Dosierung werden die Tiere getötet, die Injektionsstellen werden makroskopisch nach Zeichen von Gewebeschädigungen inspiziert und dann in 10%-igem neutral gepuffertem Formalin fixiert. Die Muskelproben (drei pro Injektionsstelle) werden mikroskopisch auf Entzündung, Nekrose, Blutung und Läsionen untersucht.

Ergebnisse:

**[0106]** Eingestuft nach den Werten gemäß des Primary Irritation Index (EPA Hautklassifizierungssystem) wurde keine der vorstehenden flüssigen Zubereitungen als mehr als ein leichtes Hautirritans bestimmt. Die makroskopische Inspektion einer Injektionsstelle von BG9589-4 in einem Tier zeigte eine leichte Irritation (Blutung) an. Jedoch die mikroskopische Untersuchung deckte keine Zeichen von Blutung auf und die makroskopische Beobachtung wurde als Artefakt bestimmt. Kurz zeigten die mikroskopischen Untersuchungen, dass die Reaktionen der flüssigen Zubereitungen der Prüfsubstanz an der Injektionsstelle durchgängig minimal bis mild waren, und dass keine Reaktion stärker war als jene, die durch Verabreichung der lyophilisierten Zubereitung oder normaler physiologischer Salzlösung hervorgerufen wurden.

**[0107]** Zusätzlich kann die Hautirritation bei Kaninchen nach wiederholten IM-Verabreichungen der flüssigen Zubereitungen einfach unter Verwendung mehrerer Gruppen von Kaninchen, die jeden zweiten Tag für acht Tage (fünf Dosen insgesamt) intramuskuläre Injektionen der flüssigen Zubereitungen oder normaler physiologischer Salzlösung erhalten, leicht geprüft werden. Die Dosen werden in einem vordefinierten Bereich auf dem Rücken jedes Tieres verabreicht, um das lokale Einwirken des Prüfgegenstandes zu maximieren. Makroskopische Beurteilungen der Haut werden 4–6 Stunden nach jeder Verabreichung und 24 Stunden nach der letzten Verabreichung für jede Behandlungsgruppe durchgeführt. Tägliche grobe Beobachtungen werden zum Zeitpunkt jeder Hautbeurteilung gemacht. Nach der makroskopischen Untersuchung 24 Stunden nach der Dosierung werden die Tiere getötet, die Injektionsstellen werden nach Zeichen von Gewebeschädigungen inspiziert und das Gewebe in 10%-igem neutral gepufferten Formalin fixiert. Die konservierten Gewebe werden mikroskopisch auf Entzündung, Nekrose, Blutung und Läsionen untersucht. Blutproben werden ebenfalls unmittelbar vor der anfänglichen Verabreichung des Prüfgegenstandes und zum Zeitpunkt der Tötung für Bestimmung der Hämatologie und Serumchemie gesammelt.

Beispiel 9: Klinische Studien

**[0108]** Die vorliegenden flüssigen Zubereitungen unterscheiden sich signifikant von den vorherigen Zubereitungen von Interferon. Für jede klinische Indikation gibt es Potenzial für eine Änderung im pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Verhalten des Interferon, wenn es Menschen verabreicht wird. Unglücklicherweise sind die Aktivitäten von Interferon-beta hochgradig speziespezifisch und die einschlägigste pharmakologische Information stammt aus Untersuchungen mit menschlichen Zellen in Kultur, in Menschen und zu einem geringeren Umfang in Rhesusaffen. Ein bevorzugter Weg, um auf eine eventuell vorhandene pharmakologische Veränderung zu prüfen, ist die Durchführung einer Bioäquivalenzstudie im Menschen.

**[0109]** Antivirale Spiegel von Interferon-beta im Serum können unter Verwendung eines Bioassays für cytopathische Wirkung (CPE), wie zum Beispiel in Beispiel 1 beschrieben quantifiziert werden. Eine Bioäquivalenzstudie im Menschen kann mit einer beliebigen Zahl von flüssigen und lyophilisierten Zubereitungen von Interferon durchgeführt werden. Durch die Analyse von Serum, der Fläche unter Kurve (AUC) und  $C_{MAX}$ -Aktivitätsparameter kann ein Fachmann bestimmen, ob lyophilisierte und flüssige Zubereitungen bioäquivalent

sind. Als nur ein Beispiel eines Protokolls einer Bioäquivalenzstudie beschreiben wir kurz eine doppelblinde Einzeldosis-Überkreuzstudie, um die Bioäquivalenz einer flüssigen Zubereitung und eines lyophilisierten Interferon-beta-Produkts in gesunden Probanden zu demonstrieren. Konzept. Jede Testperson erhält dieselbe Dosierung (z. B. 60 µg/12 MU) von Zubereitungen von Interferon-beta im Modus doppelblind, zwei Zeiträume, überkreuz (Tabelle 4). Die Testpersonen sind zwischen 18 und 45 Jahren einschließlich alt und innerhalb 15% des normalen Körpergewichtsbereichs für Größe und Körpermaße. Blutproben für Hämatologie, Chemie, Serumaktivität von Interferon-beta und pharmakodynamische Profile werden unmittelbar vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach jeder Dosierung während 144 Stunden nach der Dosierung genommen. Die Beurteilung der Injektionsschmerzen und der Reaktionen an der Injektionsstelle wird auch verfolgt. Studiendurchführung. Als Prophylaxe gegen das mit Interferon assoziierte Erkältungssyndrom erhalten alle Individuen Acetaminophen unmittelbar vor und während der Dosierungszeiträume.

#### Pharmakokinetik.

**[0110]** Bestimmung von Interferon-beta im Serum. Serumspiegel werden als Einheiten antiviraler Aktivität mit einem (CPE)-Assay gemessen. Antivirale Serumspiegel werden auf AUC,  $C_{max}$  und  $T_{max}$  analysiert. Die AUC-Werte werden von der Zeit der Dosierung bis zum letzten messbaren Spiegel ( $AUC_{0-T}$ ) und während der 144 Stunden nach der Dosierung ( $AUC_{0-144}$ ) berechnet. Eine beschreibende Standardanalyse der Behandlungsdaten wird unter Verwendung von SAS (Version 6.08, SAS-Institut, Cary, North Carolina) durchgeführt.

Tabelle 5

#### Dosierungsschema für Beispielstudie

Dosisgruppe	Verabreichungsweg	Dosis (MU)	Behandlungszeitraum: 1	Behandlungszeitraum: 2
1	IM	12	lyophilisiert (60 mcg)	flüssig (60 mcg)
2	IM	12	flüssig (60 mcg)	lyophilisiert (60 mcg)

**[0111]** Pharmakodynamik. Der biologische Marker Neopterin, ein Produkt des durch Interferon induzierten Enzyms GTP-Cyclohydrolase, das die Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen widerspiegelt (C. Huber et al., J Exp. Med 1984, 160, 310–314, 20. September 1996; D. Fuchs et al., Immunol. Today 9: 150–155, 1988) wurde charakterisiert. In sowohl nicht-klinischen als auch klinischen Studien mit rekombinantem menschlichen Interferon-beta korreliert die Induktion von Neopterin mit den Aktivitätsspiegeln im Serum nach Verabreichung von verschiedenen Behandlungen mit rekombinantem menschlichen Interferon-beta.

**[0112]** Neopterin wird mit Standard-Laborverfahren gemessen. Das pharmakodynamische Profil von Interferon-beta wird in einer quantitativen Art und Weise durch Berechnung von drei Neopterin-Serumparametern beschrieben. Der erste Parameter,  $E_{AUC}$ , ist die Fläche unter der Kurve Neopterin versus Zeit, die auf den Basislinienspiegel normiert ist. Der zweite Parameter ist  $E_{MAX}$ ; dieser Parameter ist der Unterschied zwischen der beobachteten Spitze des Neopterin-Spiegels und der Basislinie des Neopterin-Spiegels. Der dritte Parameter ist das Induktionsverhältnis, IR; dieser Parameter wird berechnet aus der Spitze des Neopterin-Spiegels geteilt durch die Basislinie des Neopterin-Spiegels.

**[0113]** Statistik. Das Wilcoxon-Mann-Whitney-Testverfahren zwei, einseitig, wird für die AUC verwendet, um die Äquivalenz zu bestimmen. Um die relative Bioverfügbarkeit von Interferon aus der flüssigen Zubereitung im Verhältnis zur lyophilisierten Zubereitung und ihrer 90%-Konfidenzintervalle abzuschätzen, wird die AUC nach logarithmischer Umwandlung einer Varianzanalyse (ANOVA) unterworfen. Aus den Variationen „zwischen den Testpersonen“ werden die Sequenzen und Geschlechter isoliert. Aus den Variationen „innerhalb der Testpersonen“ werden Komponenten aufgrund von Zeiträumen und Behandlungen isoliert.

#### Patentansprüche

1. Flüssige Zusammensetzung, umfassend ein Interferon-beta und ein Aminosäure-stabilisierendes Mittel, das 0,5% bis 5% (Gew./Vol.) Arginin-HCl ist, wobei die flüssige Zusammensetzung nicht aus lyophilisiertem Interferon rekonstituiert wurde; wobei die flüssige Zusammensetzung nicht weiter lyophilisiert wird, wobei die flüssige Zusammensetzung in einer Spritze enthalten ist, wobei die Spritze einen mit einem inertem Gas begasten Gasraum aufweist, und wobei die Spritze in einem abgepackten Kit enthalten ist.

2. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei mindestens eine Oberfläche der Spritze, die in Kontakt mit der flüssigen Zusammensetzung ist, mit einem für Interferon inerten Material beschichtet ist.
3. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Interferon-beta eine rekombinant hergestelltes Interferon ist.
4. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die flüssige Zusammensetzung einen pH-Wert zwischen 4,0 und 7,2 hat.
5. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei die flüssige Zusammensetzung einen pH-Wert von 4,8 bis 5,2 hat.
6. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei die flüssige Zusammensetzung einen pH-Wert von 5,0 hat.
7. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die flüssige Zusammensetzung eine Interferonkonzentration zwischen 6 MIU/ml und 50 MIU/ml hat.
8. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei die mindestens eine Oberfläche der Spritze mit einem Material ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Silikon und Polytetrafluorethylen beschichtet ist.
9. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 1 wobei die flüssige Zusammensetzung des Weiteren einen 20 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,2 umfasst; und wobei das Aminosäure-stabilisierende Mittel 140 mM Arginin-HCl ist.
10. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 9, wobei mindestens eine Oberfläche der Spritze, die in Kontakt mit der flüssigen Zusammensetzung ist, mit einem Material ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Silikon und Polyletrafluorethylen beschichtet ist.
11. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die flüssige Zusammensetzung des Weiteren einen Puffer umfasst, der den pH-Wert im Bereich von 4,0 bis 6,0 hält.
12. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei mindestens eine Oberfläche der Spritze, die mit der flüssigen Zusammensetzung in Kontakt ist, mit einem für Interferon inerten Material beschichtet ist.
13. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 12, wobei die Spritze keine sauerstoffhaltige/flüssige Grenzfläche hat.
14. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 12, wobei die flüssige Zusammensetzung keiner Hohlraumbildung unterworfen wurde.
15. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei der Puffer ein Puffer aus einer organischen Säure ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Citrat-, Succinat-, Tartrat-, Fumarat-, Gluconat-, Oxalat-, Lactat- und Acetatpuffer.
16. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei der pH-Wert der flüssigen Zusammensetzung im Bereich von 4,5 bis 5,5 ist.
17. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei der pH-Wert der flüssigen Zusammensetzung 5,0 ist.
18. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei die flüssige Zusammensetzung steril ist.
19. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei die flüssige Zusammensetzung mit Blut isotonisch ist.
20. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei das Interferon-beta menschliches rekombinantes Interferon-beta ist.

21. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 20, wobei die Aktivität des menschlichen rekombinanten Interferon-beta im Bereich von 6 MIU/ml bis 50 MIU/ml ist.
22. Flüssige Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Aminosäure-stabilisierende Mittel mit 3,13% (Gew./Vol.) vorliegt; und wobei die flüssige Zusammensetzung gefroren ist.
23. Verfahren zur Herstellung eines flüssigen Arzneimittels, umfassend ein Interferon-beta, einen Puffer, wobei der Puffer einen pH-Wert zwischen 4,0 und 7,2 hat, und ein Aminosäure-stabilisierendes Mittel, das 0,5% bis 5% (Gew./Vol.) Arginin-HCl ist; wobei das flüssige Arzneimittel nicht aus lyophilisiertem Interferon rekonstituiert wurde, wobei das flüssige Arzneimittel nicht weiter lyophilisiert wird, und wobei das Verfahren die Schritte umfasst: Mischen von mindestens dem Interferon-beta, Puffer und Aminosäure-stabilisierenden Mittel, um die flüssige Zusammensetzung zu ergeben, und Füllen einer Spritze mit der Zusammensetzung auf solche Weise, dass die Spritze einen mit inertem Gas begasten Gasraum aufweist, wobei die Spritze in einem Kit abgepackt ist.
24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei mindestens eine Oberfläche, die in Kontakt mit dem flüssigen Arzneimittel ist, mit einem für Interferon inertem Material beschichtet ist.
25. Verfahren nach Anspruch 23, wobei das flüssige Arzneimittel keiner Hohlraumbildung unterworfen wurde.
26. Verfahren nach Anspruch 23, wobei das Interferon-beta rekombinant hergestelltes Interferon ist.
27. Verfahren nach Anspruch 23, wobei der Puffer einen pH-Wert zwischen 4,8 und 5,2 hat.
28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei der Puffer einen pH-Wert von 5,0 hat.
29. Verfahren nach Anspruch 23, wobei das Interferon in einer Konzentration zwischen 6 MIU/ml und 50 MIU/ml vorliegt.
30. Verfahren nach Anspruch 24, wobei die mindestens eine Oberfläche der Spritze mit einem Material ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Silikon und Polytetrafluorethylen beschichtet ist.
31. Verfahren nach Anspruch 23, wobei die flüssige Zusammensetzung des Weiteren einen 20 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,2 umfasst; wobei das Aminosäure-stabilisierende Mittel 140 mM Arginin-HCl ist.
32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei mindestens eine Oberfläche der Spritze, die in Kontakt mit dem flüssigen Arzneimittel ist, mit einem Material ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Silikon und Polytetrafluorethylen beschichtet ist.
33. Verfahren zur Stabilisierung von Interferon in einem flüssigen Arzneimittel, umfassend das Mischen von (a) Interferon-beta, (b) einem Acetatpuffer und (c) Arginin; wobei das Mittel einen pH-Wert zwischen 4,0 und 6,0 hat; wobei das flüssige Arzneimittel nicht aus lyophilisiertem Interferon rekonstituiert wurde; und wobei das flüssige Arzneimittel nicht weiter lyophilisiert wird.
34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei das Arginin Arginin-HCl ist.
35. Verfahren nach Anspruch 33, wobei das Interferon zwischen 6 MIU/ml und 50 MIU/ml vorliegt.
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei der Acetatpuffer mit 20 mM vorliegt.
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 36, wobei das Arginin Arginin-HCl ist und zwischen 0,5% und 5% (Gew./Vol.) vorliegt.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 37, des Weiteren umfassend das Beimischen einer grenzflächenaktiven Substanz.
39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei die grenzflächenaktive Substanz 0,1% (Gew./Vol.) Pluronic F-68 ist.

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 39, wobei die flüssige Zusammensetzung keiner Hohlraumbildung unterworfen wurde.

41. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 39, wobei zwischen dem flüssigen Arzneimittel und der Spritze keine sauerstoffhaltige flüssige Grenzfläche ist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

**% gelöster Sauerstoff vs. Ausbeute  
während des Schrittes der viralen Inaktivierung**

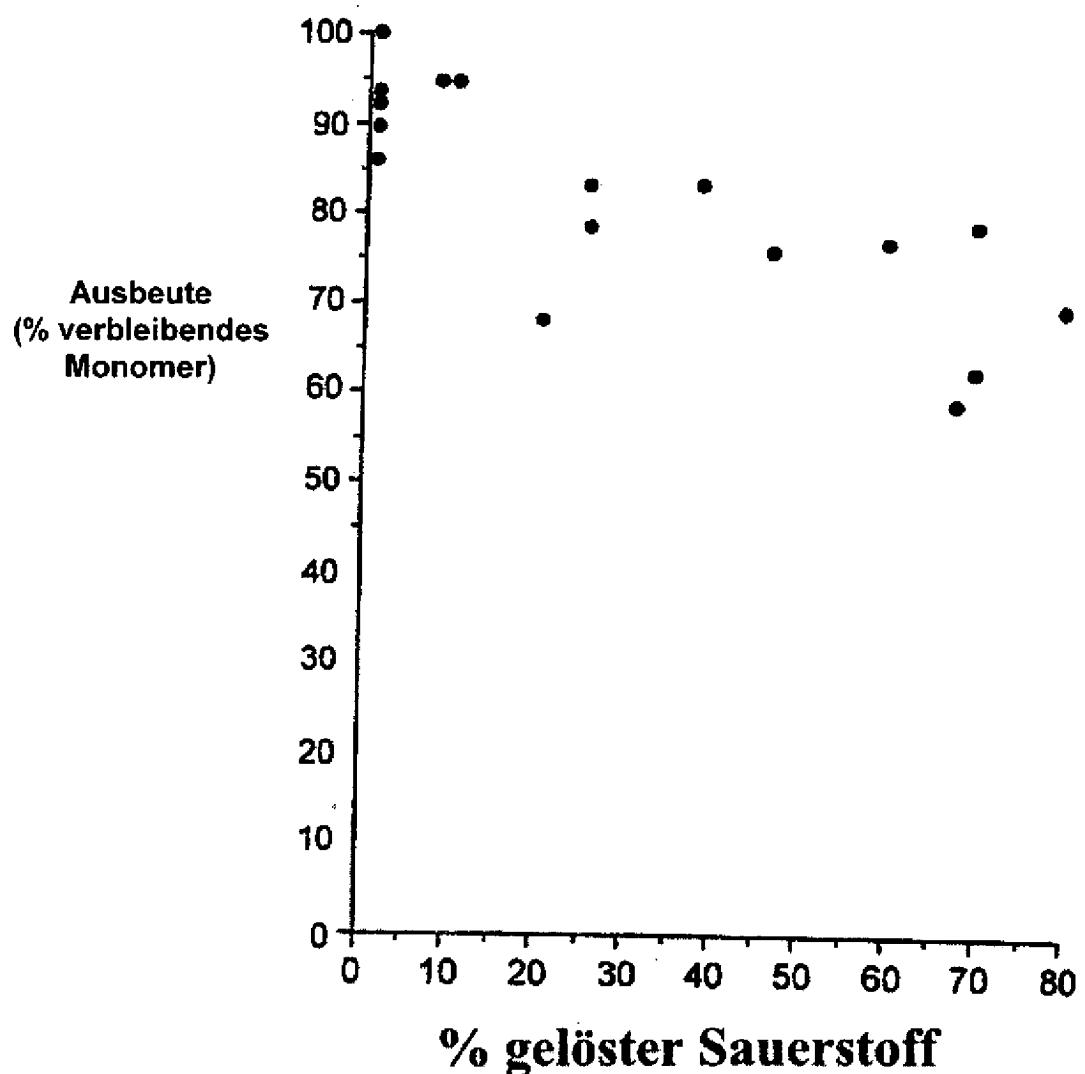


FIG. 1

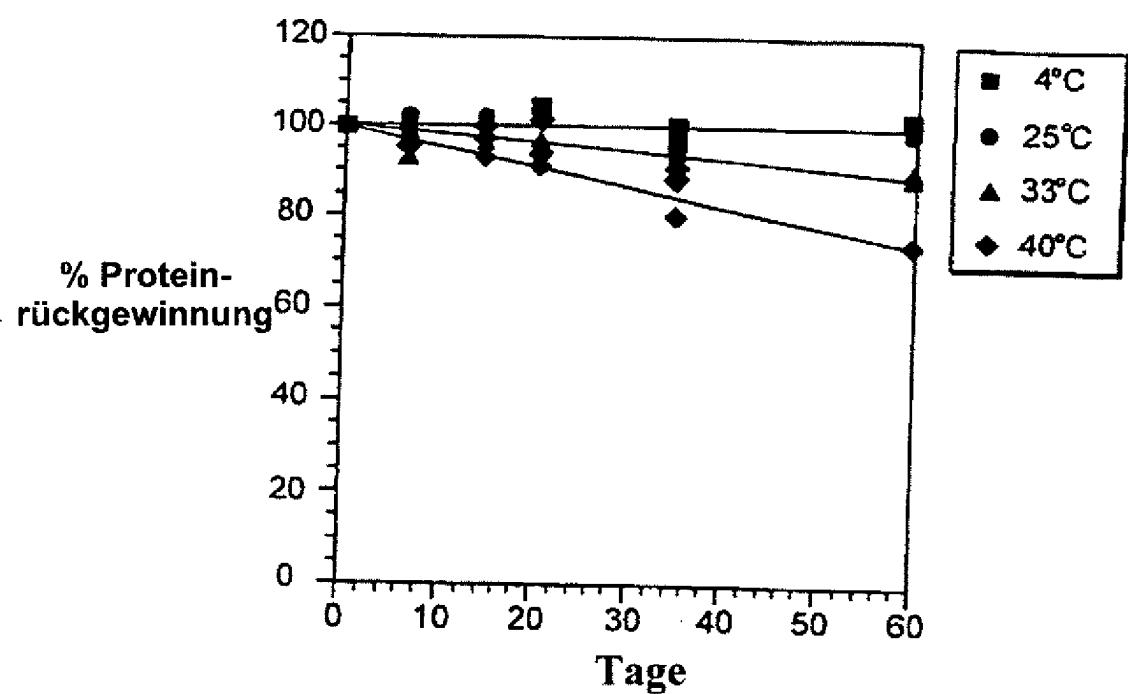


FIG. 2

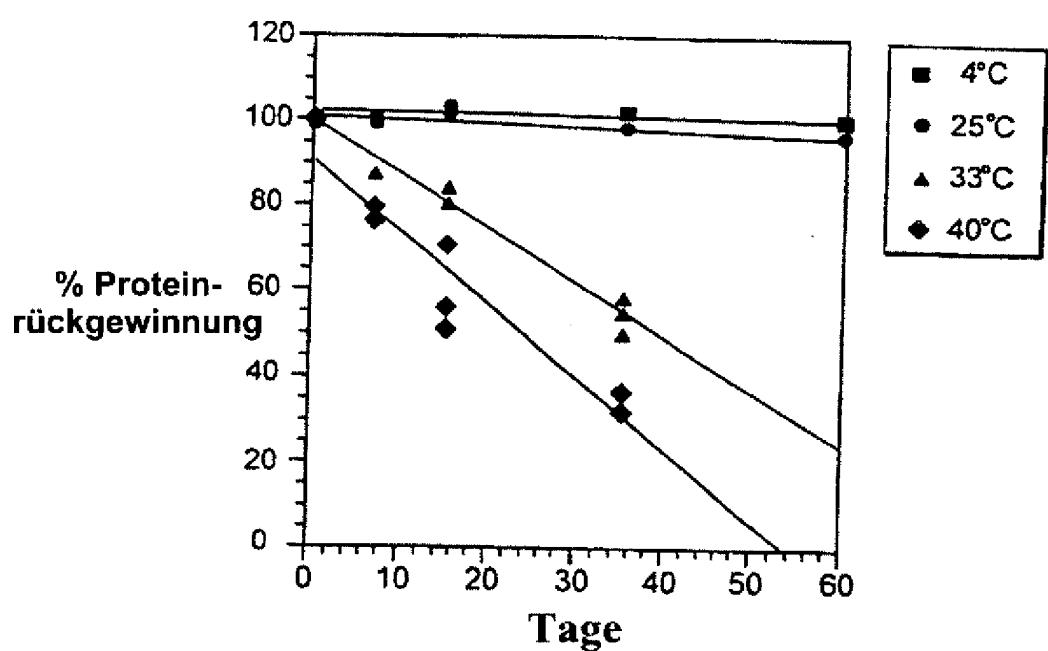


FIG. 3