



NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Øversettelse publisert	2012.07.09
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.05.02
(86)	Europeisk søknadsnr	08863833.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.12.18
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.10.06
(30)	Prioritet	2007.12.20 EP 07150258 2008.01.07 US 10258
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(73)	Innehaver	Merck Serono S.A., Centre Industriel, 1267 Coinsins, Sveits
(72)	Oppfinner	DEL RIO, Alessandra, Via Ildebrando Vivanti 108, I-00144 Roma, Italia RICHARD, Joel, 5 Rue de Bretagne, F-78490 Montfort L' Amaury, Frankrike
(74)	Fullmektig	Ønsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Flytende farmasøytisk preparat omfattende PEG-IFN-β
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 1 666 496 B1, US-A1- 2006 051 320 B1, US-A1- 2007 025 965 B1, WO-A-00/23114 B1, WO-A-03/002152 B1, WO-A-2005/084303 B1, WO-A-95/31213 B1, D. BAKER ET AL.: "N-terminally PEGylated human interferon -beta-1a with improved pharmacokinetic properties and in vivo efficacy in a melanoma angiogenesis model" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 17, 2006, pages 179-188, XP002497163, D. MAGER ET AL.: "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of PEGylated IFN-beta 1a following subcutaneous administration in monkeys" PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 22, no. 1, 2005, pages 58-61, XP019370691, HONG ZHAO ET AL.: "Linear and branched bicine linkers for releasable PEGylation of macromolecules: controlled release in vivo and in vitro from mono- and multi-PEGylated proteins" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 17, 2006, pages 341-351, XP002497164, R. ARDUINI ET AL.: "Expression, purification and characterization of rat interferon-beta, and preparation of an N-terminally PEGylated form with improved pharmacokinetic parameters" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 34, 2004, pages 229-242, XP004493229, R. PEPINSKY ET AL.: "Improved pharmacokinetic properties of a polyethylene glycol-modified form of interferon-beta-1a with preserved in vitro bioactivity" THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 297, no. 3, 2001, pages 1059-1066, XP002982987

Oppfinnelsens område

5 Foreliggende oppfinnelse vedrører formuleringer av pegylert interferon-beta (PEG-IFN- β).

Bakgrunn for oppfinnelsen

Interferon- β er et protein og har blitt identifisert som et nyttig medikament som i dag for eksempel benyttes til behandlingen av multippel sklerose (MS).

10 Proteiner kan bli modifisert enten i deres sekvens eller ved andre modifikasjoner for eksempel for å endre eller forbedre deres aktivitet eller stabilitet. En slik modifisering er introduksjonen av en kobling til polymerer slik som polyetylenglykol (PEG).

15 Interferon- β koblet til polyetylenglykol beta (PEG-IFN- β) har blitt beskrevet i for eksempel WO 99/55377 og EP 0 593 868 A1.

På det medisinske feltet har ulike tilnærminger blitt forsøkt for å stabilisere proteiner ved frysetørring eller i formen av flytende, farmasøytiske preparater. Frysetørkede materialer må bli rekonstituert i en løsning før anvendelse. Enklere, og slik av spesiell interesse, er konsentrerte eller brukerklare, farmasøytiske preparater som ikke behøver noen ytterligere klargjøring før de benyttes på pasienten.

20 Farmasøytiske, flytende formuleringer av interferon- β er for eksempel beskrevet i WO 95/31213 og WO 2004/096263.

WO 2005/084303 beskriver interferon-beta-1b-polymerkonjugatsammensetninger.

25 US 6,531,122 vedrører pegylerte interferonvarianter i en formulering med ekspiensere, løseliggjørende midler og en buffer.

WO 2004/060299 tilveiebringer fremgangsmåter for syntesen av polymerkonjugater av cytokiner inkludert interferon-beta og reseptorbindende antagonist derav.

US 20060051320 A1 vedrører frysetørkede formuleringer av pegylert interferon fremstilt ved å benytte trehalose som frysebeskyttende middel.

30 WO 99/48535 tilveiebringer formuleringer som forhindrer tap og skade på PEG-interferon-alfa-konjugater under og etter frysetørring.

WO 03002152 vedrører spesielt stabiliserte preparater som omfatter et interferonpolypeptid og et sulfoalkyleter-syklodekstrinderivat.

35 Ingen av referansene som er gitt ovenfor tilkjenner eller antyder de flytende formuleringene ifølge oppfinnelsen.

Oppsummering av oppfinnelsen

Ifølge ett aspekt av oppfinnelsen blir det tilveiebrakt et flytende farmasøytisk preparat som omfatter et pegylert interferon-beta PEG-IFN- β ., en eksipiens, et
5 overflateaktivt middel og en buffer, der nevnte eksipiens er en polyol, der nevnte overflateaktive middel er en poloxamer 188, der nevnte buffer er en natriumacetatbuffer og der pH i det farmasøytiske preparatet er $4,2 \pm 0,2$.

Ifølge et annet aspekt av oppfinnelsen blir det tilveiebrakt en fremgangsmåte for fremstilling av et flytende farmasøytisk preparat, der nevnte fremgangsmåte
10 omfatter tilsetning av en beregnet mengde med eksipiens og overflateaktivt middel til den bufrede løsningen og deretter tilsetning av PEG-IFN- β ifølge foreliggende krav 18.

Ifølge et annet aspekt av oppfinnelsen blir det tilveiebrakt en beholder som er hermetisk forseglet ved sterile betingelser og som er hensiktsmessig for lagring før
15 anvendelse, som omfatter den flytende farmasøytiske formuleringen ifølge oppfinnelsen.

Ifølge et annet aspekt av oppfinnelsen blir det tilveiebrakt et sett med et farmasøytisk preparat, der settet omfatter en beholder fylt med et farmasøytisk preparat ifølge oppfinnelsen.

20

Kort beskrivelse av tabeller og figur

I. Formuleringer ifølge oppfinnelsen inneholdende 0,044 mg/ml PEG-IFN-beta:

Tabell 1 viser ulike formuleringer ifølge oppfinnelsen inneholdende 0,044 mg/ml
25 PEG-IFN-beta.

Tabell 2 beskriver en stabilitetstest (SE-HPLC) ved henholdsvis 40 °C, 25 °C og 2-8 °C, for formuleringer ifølge oppfinnelsen med en pH på 4,2 over tid.

Tabell 3 beskriver en stabilitetstest (RP-HPLC) ved henholdsvis 40 °C, 25 °C og 2-8 °C, for formuleringer ifølge oppfinnelsen med en pH på 4,2 over tid.

30 Tabell 4 viser titre (mcg/ml) for formuleringer ifølge oppfinnelsen med SE-HPLC.

Tabell 5 viser titre (mcg/ml) for formuleringer ifølge oppfinnelsen med SE-HPLC, før og etter filtrering med % gjenvinning og en representasjon som en graf (figur 1: % gjenvinning vist som AF og TO gjenvinning i %).

35 Tabell 6 viser pH-verdiene for formuleringer ifølge oppfinnelsen over 4 til 26 uker ved henholdsvis 25 °C og 2-8 °C.

Tabell 7 viser bioanalyseresultater for formuleringer ifølge oppfinnelsen over tid.

II. Formuleringer ifølge oppfinnelsen inneholdende henholdsvis 0,055 og 0,110 mg/ml PEG-IFN-beta.

I disse formuleringene har mengden av PEG-IFN-beta henholdsvis blitt økt til 0,055 og 0,110 mg/ml PEG-IFN-beta.

Tabell 8 viser en SE-HPLC-test som måler renhet ved henholdsvis 40 °C, 25 °C og 2-8 °C, for formuleringer ifølge oppfinnelsen med en pH på 4,2 over tid.

Tabell 9 viser en SE-HPLC-test som måler proteininnhold ved henholdsvis 40 °C, 25 °C og 2-8 °C, for formuleringer ifølge oppfinnelsen med en pH på 4,2 over tid.

Tabell 10 viser en RP-HPLC-test som måler renhet ved henholdsvis 40 °C, 25 °C og 2-8 °C, for formuleringer ifølge oppfinnelsen med en pH på 4,2 over tid.

Tabell 11 viser pH-verdiene for formuleringer ifølge oppfinnelsen over 4 til 13 uker ved henholdsvis 25 °C og 2-8 °C, over tid.

Tabell 12 bioanalyseresultater for formuleringer ifølge oppfinnelsen ved henholdsvis 25 °C og 2-8 °C over tid.

Tabell 13 viser data som gjelder oksiderte former ved peptidkartlegging av PEG-IFN-beta for formuleringer ifølge oppfinnelsen.

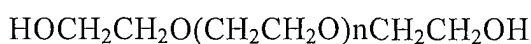
I ett aspekt vedrører oppfinnelsen et flytende farmasøytisk preparat som omfatter en PEG-IFN- β , en eksipiens, et overflateaktivt middel og en buffer der nevnte eksipiens er en polyol, der nevnte overflateaktive middel er en poloxamer 188, der nevnte buffer er natriumacetatbuffer, og der pH i det farmasøytiske preparatet er 4,2 \pm 0,2.

De påfølgende avsnittene tilveiebringer definisjoner av ulike forbindelser som utgjør formuleringen ifølge oppfinnelsen og er ment å skulle gjelde gjennom hele beskrivelsen og i kravene dersom ikke noen annen spesifikt fremlagt definisjon tilveiebringer en bredere definisjon.

Pegylert interferon-beta i formuleringen kan være ethvert interferon-beta som har en polyetylen glykol som kovalent modifisering eller en sammenlignbar modifisering. Ett eksempel på en PEG-interferon-beta er en PEG-interferon-beta der PEGylering kan bli utført ved hjelp av kjente fremgangsmåter, slik som den som er beskrevet i WO 99/55377.

Spesielt, ifølge oppfinnelsen, så har IFN-beta kovalent tilkoblet den hydrofile polymeren polyetylen glykol (PEG), også kjent som polyetylen oksid (PEO). PEG kan være en lineær polymer som har hydroksylgrupper på hver ende:

35



Den kan også bli benyttet som metoksy-PEG-OH (m-PEG) der én ende er den relativt inerte metoksygruppen mens den andre enden er en hydroksylgruppe som er gjenstand for den kjemiske modifisering:



Ovenfor kan n ha verdien 1 til flere hundre.

I en annen foretrukket utførelsesform kan PEG også være en forgrenet PEG representert ved $\text{R}(\text{PEG-OH})_m$ der R representerer en sentral kjerneenhet slik som pentaerytriol eller glyserol, og m representerer antallet forgrenede armer. Disse forgrenede armene (m) kan foreligge i et antall fra tre til hundre eller flere hundre. Hydroksylgruppene er utsatt for kjemiske modifiseringer.

10

En annen form for forgrening ifølge oppfinnelsen er for eksempel beskrevet i WO 96/21469 der PEG har en enkelt ende som blir utsatt for kjemisk modifisering. Denne PEG-typen kan bli representert som $(\text{CH}_3\text{OPEG})_p\text{RX}$ der q er lik 2 eller 3, R representerer en sentral kjerne slik som lysin eller glyserol, og X representerer en funksjonell gruppe slik som karboksyl som blir utsatt for kjemisk aktivering.

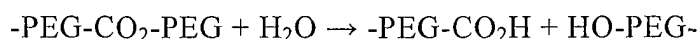
15

En annen form for forgrening ifølge oppfinnelsen blir betegnet "vedheng-PEG" og har reaktive grupper slik som karboksyl langs PEG-hovedkjeden heller enn på enden av PEG-kjedene.

20

Det er i tillegg mulig å fremstille PEG-IFN-beta ifølge oppfinnelsen med svake eller nedbrytbare koblinger i hovedkjeden slik som for eksempel beskrevet i US patentsøknad 06/026,716. Dermed kan PEG bli fremstilt med esterbindinger på polymerhovedkjeden som er utsatt for hydrolyse. Hydrolysen fører til kløyving av polymeren til fragmenter med lavere molekylvekt, ifølge reaksjonsskjemaet:

25



Kopolymerer av etylenoksid og propylenoksid er nært beslektet med PEG i deres kjemi og ifølge oppfinnelsen kan de bli benyttet i stedet for PEG.

30

En mengde fremgangsmåter har blitt utviklet for å PEGylere proteiner. PEG kan bli koblet til reaktive grupper funnet i proteinet ved å benytte vanligvis elektrofilt aktiverte PEG-derivater. Man kan benytte α - eller ϵ -aminogruppene på lysinrester og N-terminalen som fører til et konjugat som består av en blanding av produkter.

Konjugatene består fortrinnsvis av en populasjon av ett til flere PEG-molekyler koblet til per proteinmolekyl som strekker seg fra én til antallet aminosyrer i proteinet.

35

Det er foretrukket å introdusere seterettet PEGylering i IFN-beta slik som for eksempel beskrevet i Woghiren et al., i *Bioconjugate Chem.*, 4(5): 314-318, 1993, for å syntetisere et tiol-selektivt PEG-derivat.

5 IFN er i én utførelsesform spesifikt PEGylert. En spesifikk PEGylering kan bli utført ifølge EP 675 201 på den N-terminale resten med for eksempel mPEG-propionaldehyd. Spesielt foretrukket er setespesifikk mono-PEGylering som beskrevet av Woghiren et al., *Bioconjugate Chem.*, 4(5):314-318, 1993.

10 En utførelsesform ifølge oppfinnelsen er en IFN-beta som bærer en mono-PEGyleringkovalent bundet til Cys¹⁷ som beskrevet i WO 99/55377. PEG-enheten kan være lineær eller forgrenet, metoksy-PEG, hydrolytisk eller enzymatisk nedbrytbar PEG og én eller flere polyoler og kopolymerer av PEG og PLGA (poly(melkesyre/glykolsyre)).

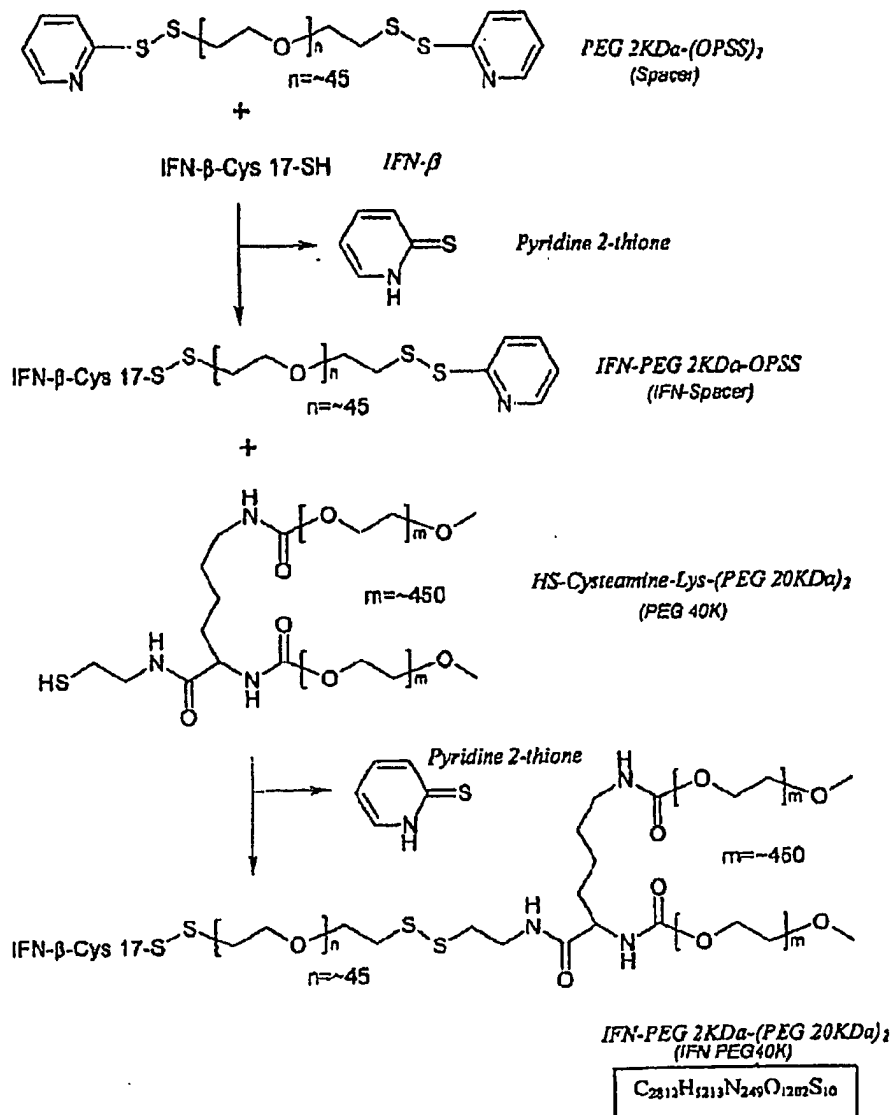
15 Cystein-tiolgruppen ifølge en utførelsesform av oppfinnelsen kan bli reagert med et tiolreagerende, PEGylerende middel. Det kan være en PEG som inneholder en funksjonell gruppe slik som ortopyridyldisulfid, vinylsulfon, maleimid, jodacetimid. Fortrinnsvis er det tiol-reaktive PEGyleringsmiddelet ortopyridyldisulfid (OPSS) -derivatet av PEG. Det PEGylerende middelet blir benyttet i sin mono-metylerte form der kun én ende er tilgjengelig for konjugering, eller i bifunksjonell form der begge ender er tilgjengelige for konjugering.

20 I en foretrukket utførelsesform blir en IFN-β-Cys¹⁷ benyttet og reagerer ifølge reaksjonsskjemaet som beskrevet i denne søknaden. Denne reaksjonen er setespesifikk til Cys¹⁷ fordi de andre to cysteinrestene i IFN-β (posisjonene 31 og 141) danner en disulfidbro og er slik ikke tilgjengelige for PEGylering. PEG-IFN-β har en effektiv størrelse som er ekvivalent med den for et protein med en
25 molekylvekt på 50 til 110 kDa, fortrinnsvis omtrent 70 kDa. I den setespesifikke IFN-β-modifiseringen har PEG-molekylet som er festet fortrinnsvis en molekylvekt som er større enn 20 kDa. I én utførelsesform har PEG-molekylet som er festet på Cys¹⁷ 2x20 kDa festet via et spacermolekyl.

30 Spacermolekylet og IFN danner an IFN-PEG 2 kDa – OPSS ifølge synteseskjemaet nedenfor.

Etter PEGylering blir løsningen renset for å separere PEG-IFN-β fra fritt spacermolekyl og/eller PEG. Dette rensetrinnet blir fortrinnsvis utført ved ultrafiltrering. Ultrafiltreringen blir utført ved en temperatur på mindre enn 10 °C, fortrinnsvis 5 ± 3 °C, mer foretrukket ved 4 °C ved basiske betingelser. I
35 rensetrinnet blir fortrinnsvis 0,1 M NaOH benyttet. Den resulterende PEG-IFN-β-løsningen inneholder mindre enn 0,5 EU/ml med endotoksiner, fortrinnsvis mindre enn 0,25 EU/ml endotoksiner.

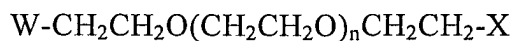
I én utførelsesform blir PEGyleringen innført i IFN-β i overensstemmelse med det følgende skjemaet:



I én utførelsesform kan en PEG-enhet med lav molekylvekt bli koblet til IFN- β .

En PEG-enhet med lav molekylvekt har formelen:

5



der W og X er grupper som uavhengig av hverandre reagerer med en amin-, sulfhydryl-, karboksyl- eller hydroksylfunksjonell gruppe for å feste PEG-enheten med lav molekylvekt til IFN- β . W og X er fortrinnsvis uavhengig valgt fra ortopyridyldisulfid, maleimider, vinylsulfoner, jodacetamider, aminer, tioler,

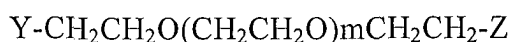
10

karboksyler, aktive estere, benzotriazolkarbonater, p-nitrofenolkarbonater, isocyanater og biotin.

5 PEG-enheten med lav molekylvekt har fortrinnsvis en molekylvekt på 100 til 5000 dalton. I en foretrukket utførelsesform er vekten 1000 til 3000 dalton, fortrinnsvis 1500 til 2000 dalton og mer foretrukket 2000 dalton.

10 Den monofunksjonelle eller bifunksjonelle PEG-enheten for koblingen av den frie enden til en PEG-enhet med lav molekylvekt som er festet til IFN- β har fortrinnsvis en molekylvekt i området fra omtrent 100 til 200 dalton. Det er fortrinnsvis en metoksy-PEG, forgrenet PEG, hydrolytisk eller enzymatisk nedbrytbar PEG, vedheng-PEG eller dendrimer-PEG.

Den monofunksjonelle og bifunksjonelle PEG har videre formelen:



15 der Y er reaktiv mot en endegruppe på den frie enden av PEG-enheten med lav molekylvekt som er koblet til IFN- β og Z er $-OCH_3$ eller en gruppe som er reaktiv til å danne et bifunksjonelt konjugat.

20 På en trinnvis måte kan slik to eller flere PEG-enheter bli benyttet for å fremstille PEG-IFN- β som er nyttig i preparatet ifølge oppfinnelsen og til anvendelse som et medikament.

Fordelaktig er disulfidbindingen mellom PEG og IFN- β stabil i sirkulasjonen og kan bli kløyd ved opptak inn i en celle.

PEG-IFN- β som blir benyttet i formuleringen ifølge oppfinnelsen har omtrent den samme eller høyere interferon- β -aktiviteten sammenlignet med nativ interferon- β .

25 Eksipiensen kan være enhver polyol som sammen med de andre komponentene i formuleringen fører til stabil PEG-interferon-beta-formulering. Eksempler på polyoler er mannitol (PEARLITOL), sorbitol (NEOSORB), maltitol (MALTISORB), xylitol (XYLISORB) og maltitol (LYCASIN). En foretrukket polyoleksipiens er mannitol.

30 Ifølge oppfinnelsen blir et ikke-ionisk, overflateaktivt middel benyttet, en poloxamer 188.

Bufferen er en natriumacetatbuffer.

35 Interferon-beta kan være naturlig forekommende, humant interferon-beta eller ett som er rekombinant fremstilt som bærer en pegylering ifølge oppfinnelsen. Videre refererer interferon-beta (IFN- β) ifølge oppfinnelsen til glykoproteiner som er produsert i kroppen som respons på virusinfeksjon.

- Interferonenheten eller internasjonal enhet for interferon (U eller IU for internasjonal enhet) har blitt rapportert som et mål på IFN-aktivitet definert som mengden som er nødvendig for å beskytte 50 % av cellene mot virussskade. Analysen som kan bli benyttet for å måle bioaktivitet er den cytopatiske
- 5 effektinhiberingsanalysen som beskrevet i Rubinstein et al., 1981, Familletti, P.C., et al., 1981. I denne antivirusanalysen for interferon er omtrent 1 enhet/ml med interferon den nødvendige mengden for å frembringe en cytopatisk effekt på 50 %. Enhetene er bestemt med hensyn på den internasjonale referansestandard for Hu-IFN-beta tilveiebrakt av the National Institutes of Health (Pestka, S. 1986).
- 10 Interferoner blir også kalt biologiske responsmodifiserende midler (BRM) fordi de har en effekt på responsen til organismen på tumoren, ved å påvirke gjenkjenning via immunmodulering.
- Humant fibroblastinterferon (IFN- β) har antivirussyaktivitet og kan også stimulere naturlige dreperceller mot neoplastiske celler. Det er et polypeptid på omtrent
- 15 20 000 Da som er induisert av virus og dobbeltrådede RNA. Fra nukleotidsekvensen til genet for fibroblastinterferon, klonet ved hjelp av rekombinant DNA-teknologi (Derynk et al., 1980), ble hele aminosyresekvensen til proteinet utledet. Det har en lengde på 166 aminosyrer.
- Rebif (Merck Serono – rekombinant humant interferon- β), som er en
- 20 interferonterapi for multippel sklerose (MS), er interferon (IFN)-beta-1a som er produsert fra pattedyrcellerlinjer. Dets anbefalte internasjonale ikke-kommersielle navn (NN) er ”interferon beta-1a”.
- Et ”interferon beta” eller ”IFN- β ”, slik det benyttes her, er ment å skulle inkludere ethvert molekyl som er definert som et slikt i litteraturen, som for eksempel
- 25 omfatter enhver type av IFN- β som er nevnt ovenfor. IFN- β som er passende i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse er kommersielt tilgjengelig som for eksempel Rebif (Merck Serono), Avonex (Biogen Idec) så lenge det oppviser koblingssetene for spesifikk PEGylering. Anvendelsen av interferon-beta av humant opphav er også foretrukket i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse.
- 30 Uttrykket interferon-beta, slik det benyttes her, er ment å skulle omfatte salter.
- Uttrykket ”interferon-beta (IFN- β)”, slik det benyttes her, er ment å skulle inkludere fibroblastinterferon spesielt av humant opphav, slik dette kan fremskaffes fra biologiske fluider eller som fremskaffet ved hjelp av rekombinante DNA-teknikker fra eukaryote vertsceller, i tillegg til salter. IFN-beta er fortrinnsvis ment å skulle
- 35 bety interferon-beta-1a.
- Bioanalyser for bestemmelsen av IFN- β -/PEG- IFN- β -aktivitet har blitt beskrevet. En IFN-analyse kan for eksempel bli utført som beskrevet av Rubinstein et al., 1981. Slik kan det bli bestemt hvorvidt ethvert gitt mutein i det vesentlige har en

liknende, eller en bedre aktivitet enn IFN- β ved hjelp av rutinemessig eksperimentering.

Uttrykket "salter" refererer her til både salter av karboksylgrupper og til syreaddisjonssalter av aminogruupper av proteinene beskrevet ovenfor eller analoger derav. Salter av en karboksylgruppe kan bli dannet ved hjelp av midler kjent på fagområdet og inkluderer uorganiske salter, for eksempel natrium-, kalsium-, ammonium-, jern- eller sink-salter og liknende, og salter med organiske baser slik som de som for eksempel dannes med aminer, slik som trietanolamin, arginin eller lysin, piperidin, procain og liknende. Syreaddisjonssalter inkluderer for eksempel salter med mineralsyrer, slik som for eksempel saltsyre eller svovelsyre, og salter med organiske syrer, slik som for eksempel eddiksyre eller oksalsyre. Selvfølgelig må ethvert slikt salt opprettholde den biologiske aktiviteten til proteinene (IFN) som er relevant for den foreliggende oppfinnelsen, d.v.s. evnen til å binde til den tilsvarende reseptoren og sette i gang reseptorsignalisering.

Fortrinnsvis er PEG-IFN-beta til stede i preparatet ved en konsentrasjon på 0,1 mg/ml til 0,01 mg/ml, fortrinnsvis 0,06 mg/ml til 0,03 mg/ml og enda mer foretrukket ved en konsentrasjon på 0,044 mg/ml.

I en annen utførelsesform er PEG-IFN-beta til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen i en konsentrasjon på 0,05 til 0,150 mg/ml, fortrinnsvis 0,055 eller 0,110 mg/ml.

Doseringen benyttet i preparatet og som kan bli benyttet på et individ vil variere avhengig av en mengde faktorer, inkludert farmakokinetiske egenskaper, administreringsmåten, pasienttilstand og pasientkarakteristikk (kjønn, alder, kroppsvekt, helsetilstand, størrelse), omfang av symptomer, samtidige behandlinger, hyppighet av behandling og den ønskede effekten.

Standard doseringer av humant IFN-beta/PEG-IFN-beta strekker seg fra 80 000 IU/kg til 200 000 IU/kg per dag, eller 6 MIU (millioner internasjonale enheter) til 12 MIU per person per dag, eller 22 til 44 μ g (mikrogram) IFN-beta ekvivalent per person. I overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse kan PEG-IFN- β i preparatet ifølge oppfinnelsen fortrinnsvis bli benyttet ved en dosering på omtrent 1 til 50 μ g, mer foretrukket omtrent 10 til 30 μ g eller omtrent 10 til 20 μ g per person per dag ekvivalent til IFN-beta.

Administreringen av aktive ingredienser i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse kan være ved intravenøs, intramuskulær eller subkutan administrering. Foretrukne administreringsmåter for preparatet ifølge oppfinnelsen er subkutan eller intramuskulært.

PEG-IFN- β -preparatet ifølge oppfinnelsen kan også bli administrert daglig eller hver annen dag, eller mindre hyppig. Fortrinnsvis blir PEG-IFN- β -preparatet

administrert en gang, to ganger eller tre ganger i uka. Fortrinnsvis blir det administrert en gang på to uker.

Den foretrukne administreringsmåten er subkutan administrering, administrert for eksempel tre ganger per uke. En ytterligere foretrukket administreringsmåte er den
5 intramuskulære administreringen som for eksempel kan bli utført en gang i uken.

Fortrinnsvis blir 22 til 44 µg eller 6 MIU til 12 MIU ekvivalent til IFN-beta av PEG-IFN-beta i preparatet ifølge oppfinnelsen administrert tre ganger i en uke ved subkutan injeksjon.

PEG-IFN-beta-preparatet kan bli administrert subkuttant, ved en dosering på 25 til
10 30 µg eller 8 MIU til 9,6 MIU hver annen dag. 30 µg eller 6 MIU ekvivalent til IFN-beta av PEG-IFN-beta kan ytterligere bli administrert intramuskulært én gang i uken.

Uttrykket ”stabilitet” refererer til den fysiske, kjemiske og konformasjonsmessige stabiliteten til formuleringer av interferon ifølge foreliggende oppfinnelse (inkludert
15 opprettholdelse av biologisk effekt). Ustabilitet for en proteinformulering kan bli forårsaket av kjemisk degradering eller aggregering av proteinmolekylene for å danne polymerer av høyere orden, deglykosylering, modifisering av glykosylering, oksidering eller enhver annen strukturell modifisering som reduserer minst én biologisk aktivitet for et interferon-polypeptid som er inkludert i foreliggende
20 oppfinnelse.

Et ”stabilt” preparat, løsning eller formulering er en der graden av degradering, modifisering, aggregering, tap av biologisk aktivitet og liknende, av proteiner i disse er hensiktsmessig kontrollert, og som ikke øker uakseptabelt over tid. Fortrinnsvis opprettholder formuleringen minst omtrent 60 %, mer foretrukket minst
25 omtrent 70 %, mest foretrukket minst omtrent 80 % av den merkede interferonaktiviteten over en periode på fra 12 til 24 måneder. De foretrukne PEG-IFN-β-preparatene ifølge oppfinnelsen har fortrinnsvis en varighet på omtrent 6 måneder, 12 måneder, 18 måneder, mer foretrukket minst 20 måneder, enda mer foretrukket minst omtrent 22 måneder, og mest foretrukket minst omtrent 24
30 måneder nå de lagres ved 2-8 °C.

Fremgangsmåter for overvåkning av stabilitet for de flytende, farmasøytiske PEG-IFN-β-preparatene ifølge oppfinnelsen er tilgjengelige på fagområdet, inkludert de fremgangsmåtene som er beskrevet her. Slik kan PEG-IFN-β-aggregatdannelse under lagring av et flytende, farmasøytisk preparat ifølge oppfinnelsen enkelt bli
35 bestemt ved å måle endringen i den løselige PEG-IFN-β-løsningen over tid.

Mengden av løselig polypeptid i løsningen kan bli kvantifisert ved hjelp av et antall analytiske analyser tilpasset påvisning av den spesifikke PEG-IFN-β. Slike analyser inkluderer for eksempel reversfase (RP)-HPLC og UV-absorpsjonsspektroskopi, som beskrevet i eksemplene nedenfor.

Bestemmelse av både løselige og uløselige aggregater under lagring i flytende preparater kan for eksempel bli oppnådd ved å benytte analytisk ultrasentrifugering som bemerket i eksemplene nedenfor for å skille mellom den delen av det løselige polypeptidet som er til stede som løselige aggregater og den delen som foreligger i den ikke-aggregerte, biologisk aktive, molekylære formen.

Uttrykket ”buffer” eller ”fysiologisk akseptabel buffer” refererer til løsninger av forbindelser som er kjent for å være trygge til farmasøytisk eller veterinærmessig anvendelse i formuleringer og som har effekten av å opprettholde eller kontrollere pH-verdien i formuleringen i det pH-området som er ønskelig for formuleringen. De foreliggende bufferne er natriumacetatbufferne.

Eksiapiensen er fortrinnsvis til stede ved en konsentrasjon på 30 mg/ml til 50 mg/ml, mer foretrukket i en konsentrasjon på 40 mg/ml til 50 mg/ml, og enda mer foretrukket i en konsentrasjon på 45 mg/ml.

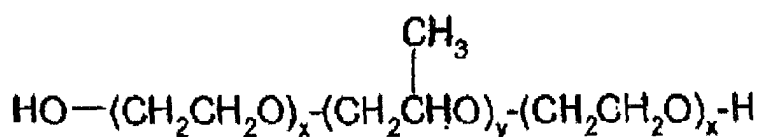
Det overflateaktive middelet har fortrinnsvis en konsentrasjon på 0,1 mg/ml til 1 mg/ml, fortrinnsvis en konsentrasjon på 0,4 mg/ml til 0,7 mg/ml, og enda mer foretrukket en konsentrasjon på 0,5 mg/ml.

Uttrykket ”overflateaktivt middel” refererer til en løselig forbindelse som reduserer overflatespenningen for væsker, eller reduserer grenseflatespenning mellom to væsker eller en væske og et fast stoff, der overflatespenningen er kraften som virker på overflaten av en væske, og som har en tendens til å minimalisere arealet av overflaten.

Overflateaktive midler har noen ganger blitt benyttet i farmasøytiske formuleringer, inkludert levering av legemidler og polypeptider med lav molekylvekt, for å modifisere absorpsjonen av legemidlet eller dets levering til målvevene. Velkjente, overflateaktive midler inkluderer polysorbater (polyoksyetylenderivater av sorbitolfettsyrer, Tween), i tillegg til poloxamerer slik som Pluronic eller Lutrol som blir markedsført av BASF i Tyskland.

Ifølge oppfinnelsen har det blitt funnet at ved å formulere et PEG-IFN- β med Pluronic F68 (BASF, Pluronic F68 er også kjent som Poloxamer 188) så oppnår de stabile formuleringer som minimaliserer tapet av aktivt prinsipp forårsaket av adsorpsjon på overflatene av oppbevaringsbeholderen og/eller leveringsinnretningen (for eksempel sprøyte, pumpe, kateter o.s.v.). Det har også blitt funnet at ved å formulere et PEG-IFN- β med Pluronic F68 (BASF, Pluronic F68 er også kjent som Poloxamer 188) så oppnås et stabilt preparat som er mer resistent overfor oksidasjon og for dannelse av proteinaggregater.

De overflateaktive midlene av Pluronic-type er blokk-kopolymerer av etylenoksid (EO) og propylenoksid (PO). Propylenoksidblokken (PO) er satt inn mellom to etylenoksid (EO) -blokker.



- I Pluronic F77 er prosentandelen av polyoksyetylen (hydrofil) 70 %, og molekylvekten av det hydrofobe (polyoksypropylen) er omtrent 2,306 Da.
- 5 I Pluronic F87 er prosentandelen av polyoksyetylen (hydrofil) 70 %, og molekylvekten av det hydrofobe (polyoksypropylen) er omtrent 2,644 Da.
- I Pluronic F88 er prosentandelen av polyoksyetylen (hydrofil) 80 %, og molekylvekten av det hydrofobe (polyoksypropylen) er omtrent 2,306 Da.
- 10 I Pluronic F68 er prosentandelen av polyoksyetylen (hydrofil) 80 %, og molekylvekten av det hydrofobe (polyoksypropylen) er omtrent 1,967 Da.

Det foretrukne, overflateaktive middelet er Pluronic F68.

- Pluronic, spesielt Pluronic F68, er fortrinnsvis til stede ved en konsentrasjon som er tilstrekkelig til å opprettholde stabiliteten til PEG-IFN- β i hele lagringsperioden (for eksempel 12 til 24 måneder), og også ved en konsentrasjon som er tilstrekkelig til å
- 15 forhindre proteintap som skyldes adsorpsjon på overflater, slik som røret, ampullen eller sprøyten.

- I en annen foretrukket utførelsesform blir metionin benyttet, spesielt L-metionin. Spesielt nyttig er en konsentrasjon på 0,1 mg/ml til 0,5 mg/ml, fortrinnsvis en konsentrasjon på omtrent 0,1 mg/ml til 0,3 mg/ml, mer foretrukket 0,25 mg/ml til
- 20 omtrent 0,12 mg/ml.

Det ble funnet at ved tilsetning av metionin så ble fordelaktig formuleringen ytterligere stabilisert og oksidasjon av proteinet ble redusert.

- De ulike forbindelsene inneholdt i eller omfattet i formuleringen ifølge oppfinnelsen kan bli variert som beskrevet ovenfor og den positive effekten av metionin kan bli
- 25 oppnådd. I én utførelsesform omfatter formuleringen eller inneholder formuleringen 0,055 mg/ml PEG-IFN- β , 10 mM natriumacetatbuffer ved omtrent pH 3,5 til 4,5, fortrinnsvis pH 4,2, 45 mg/ml mannitol og 0,5 mg/ml poloxamer 188, alternativt 0,110 mg/ml PEG-IFN-beta.

- 30 Preparatet ifølge oppfinnelsen inneholder en buffer i en mengde som er tilstrekkelig til å opprettholde pH-verdien i nevnte preparat på $4,2 \pm 0,2$.

Bufferen er til stede i preparatet ifølge oppfinnelsen ved en konsentrasjon på omtrent 5 mM til 500 mM, fortrinnsvis i en konsentrasjon på omtrent 10 mM.

Preparatet er fortrinnsvis en vandig løsning.

5 Oppfinnelsen inkluderer flytende preparater. Det foretrukne løsningsmiddelet er vann for injeksjon.

Det kan bli vist at ved å justere pH til $4,2 \pm 0,2$ for PEG-IFN- β -preparater så kan stabile formuleringer bli tilveiebrakt.

10 Preparatene ifølge oppfinnelsen oppnådde å positivt påvirke degraderingsprosessen for PEG-IFN- β der denne degraderingsprosessen negativt kan bli påvirket i flytende preparater. Denne påvirkningen kan bli målt med SE-HPLC ved for eksempel henholdsvis 40 °C og 25 °C. Preparatet ifølge oppfinnelsen oppnådde at ingen signifikant minskning i PEG-IFN- β -innhold ble påvist opp til 2 uker ved 40 °C og opp til 6 uker ved 25 °C. Preparatene ifølge oppfinnelsen oppviser god stabilitetskarakteristika og spesielt kan en reduksjon i proteinaggregering ved
15 lagring bli oppnådd.

De positive resultatene kan spesielt bli oppnådd for et preparat inneholdende 0,044 mg/ml PEG-IFN- β , 10 mM natriumacetatbuffer med pH 4,2, mannitol 45 mg/ml og 0,5 mg/ml Poloxamer 188 klargjort i glassbeholdere, fortrinnsvis 3 ml, eller glassprøyter, fortrinnsvis 1 ml.

20 Preparatene ifølge oppfinnelsen viser god stabilitet som målt ved renhet ved anvendelse av SE-HPLC, RP-HPLC, proteininnhold som målt ved SE-HPLC og biologisk aktivitet.

I et annet aspekt vedrører oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av et flytende, farmasøytisk preparat som beskrevet ovenfor, der nevnte fremgangsmåte
25 omfatter tilsetning av en beregnet mengde med eksipiens og overflateaktivt middel til den bufrede løsningen og deretter tilsetning av PEG-IFN- β .

I nok et annet aspekt vedrører oppfinnelsen en beholder som er hermetisk forseglet ved sterile betingelser som er passende for lagring før anvendelse, som omfatter den flytende, farmasøytiske formuleringen ifølge oppfinnelsen.

30 Enhver beholder som er passende til medisinsk benyttelse kan bli benyttet. Beholderen er fortrinnsvis en forhåndsfylt sprøyte, et rør eller en hylse for en autoinjektor.

35 Formuleringene ifølge oppfinnelsen kan bli administrert ved å benytte anerkjente innretninger. Eksempler omfatter disse enkeltrørsystemene inkluderer autoinjektor- eller penninjektorinnretninger for levering av en løsning slik som Rebiject.

Produktene som her er krevd inkluderer forpakkingsmateriale.

Forpakkingsmaterialet tilveiebringer i tillegg til informasjonen som er påkrevd fra regulatoriske myndigheter også betingelsene ved hvilke produktet kan bli benyttet.

Forpakkingsmaterialet ifølge foreliggende oppfinnelse tilveiebringer instruksjoner til pasienten, dersom det er nødvendig, for å klargjøre den endelige løsningen og for å benytte en slik endelig løsning over en periode på tjuetimer eller mer for våt/tørr-produktet med to rør. For det enkeltrør-løsningsproduktet indikerer 5 merkingen at en slik løsning kan bli benyttet over en periode på tjuetimer eller mer. De herværende, krevde produktene er nyttige til human farmasøytisk produktanvendelse. Preparatene kan bli tilveiebrakt til pasienter som klare løsninger.

PEG-IFN- β kan bli administrert til en pasient i overensstemmelse med foreliggende 10 oppfinnelse via en mengde leveringsfremgangsmåter inkludert SC- eller IM-injeksjon, transdermalt, pulmonalt, transmukosalt, ved implantat, osmotisk pumpe, hylser, mikropumpe, oralt, eller på andre måter som er anerkjent av fagfolk, slik det er velkjent på fagområdet.

I et annet aspekt vedrører oppfinnelsen et sett med et farmasøytisk preparat, der 15 settet omfatter en beholder fylt med et farmasøytisk preparat ifølge oppfinnelsen.

Beholderen er fortrinnsvis en sprøyte til anvendelse i en leveringsinnretning.

I det følgende blir foreliggende oppfinnelse illustrert ved hjelp av eksempler.

20

25

30

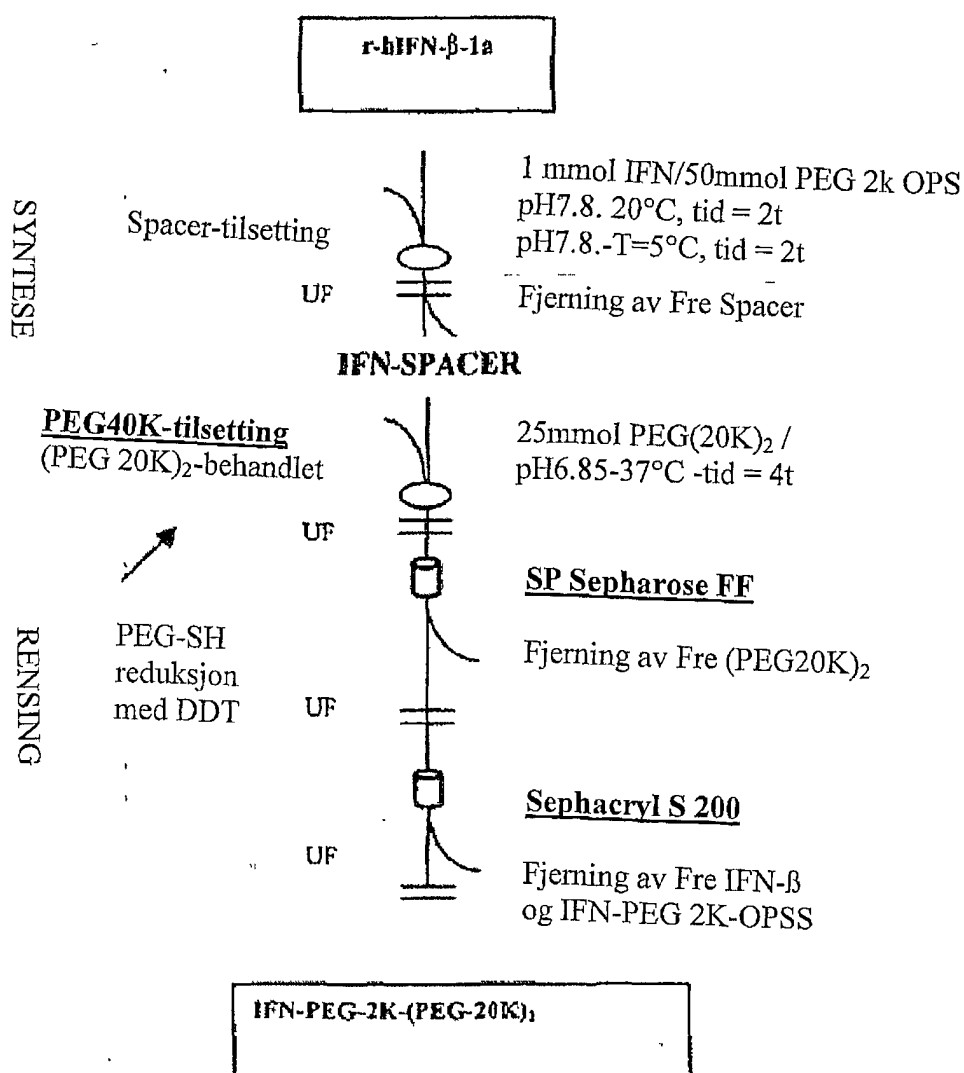
Eksempler

Foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen vil bli beskrevet med de følgende eksemplene.

5 1. Fremstilling av PEG-IFN- β -konjugat

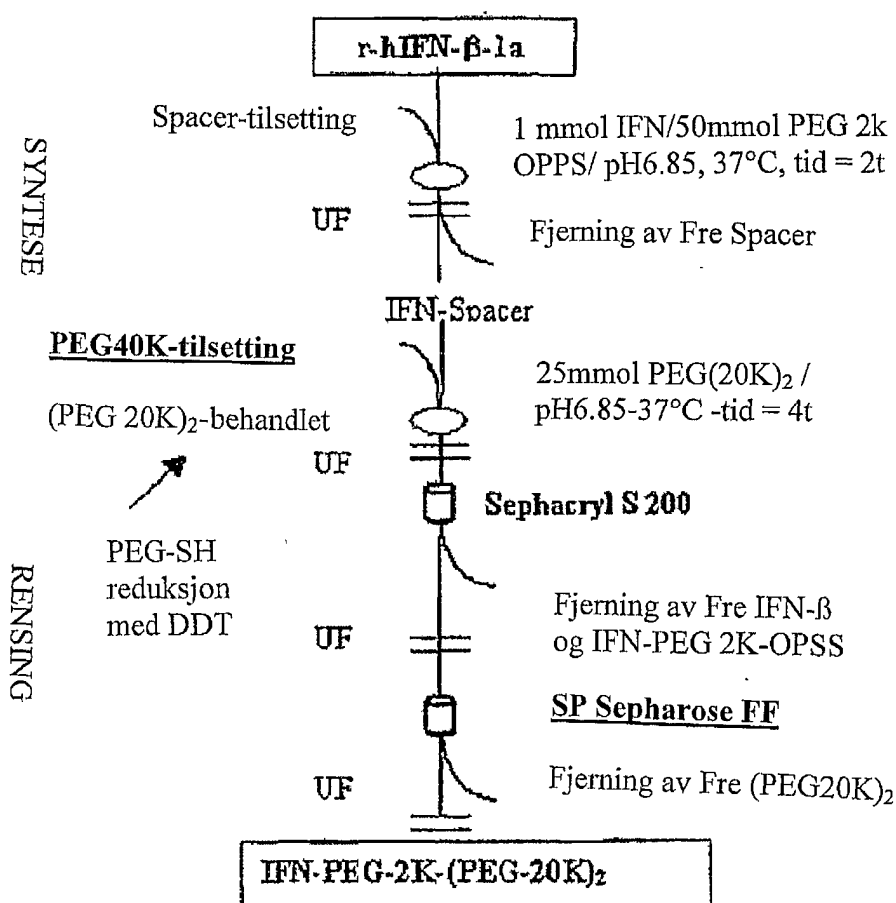
Eksempler på fremstillingen av PEG-IFN- β er vist i de følgende skjemaene:

PEG-IFN-flytdiagram for syntese og rensing:



PEG 2k OPSS = (2-Pyridyldithiol)₂-PEG-2K
PEG (20K)₂ = HS-Cysteamine-Lys-(PEG-20K)₂

PEG-IFN-flytdiagram for syntese og rensing:



2. Formulering

PEG-IFN-β-preparater ble formulert ved å benytte PEG-IFN-beta-1a. Løsningen ble filtrert gjennom en membran på 0,22 μm (Durapore) og fylt inn i den endelige beholderen (1 ml i rør eller sprøyte).

Testpreparatet inneholdt 0,044 mg/ml PEG-IFN-beta-1a, 10 med mer natriumacetatbuffer pH 4,2, 45 mg/ml mannitol og 0,5 mg/ml Poloxamer 188. Alternativt inneholdt det 0,055 eller 0,110 mg/ml PEG-IFN-beta-1a og eventuelt sammen med metionin.

Prøver av testpreparatet ble lagret ved henholdsvis 40 °C, 25 °C og 2-8 °C, og tester ble utført for bestemmelse av renhet ved SE-HPLC eller RP-HPLC av proteininnhold ved SE-HPLC, av biologisk aktivitet med en antivirusanalyse basert på IFN-beta-indusert beskyttelse av celler og pH over tid i tillegg til å måle oksiderte former ved hjelp av peptidkartlegging/UPLC-analyse.

3. Stabilitetsanalyser og annen eksperimentering

3.1. Renhet og analyse med SE-HPLC

Renheten ved SE-HPLC ble undersøkt på en Shodex-kolonne (Aqueous SE, code KW-803), og elueringen ble utført i isokratisk modus ved 1,0 ml/min ved å benytte PBS 1x klargjort ved en 10x fortykning i vann fra PBS 10x (Gibco BRL, code 70013-016), og påvisningen ble utført med UV ved 214 nm.

IFN-PEG-formulerte prøver ble injisert ved å benytte de følgende injeksjonsvolumene: 200 mcL (til 44 og 55 mcg/ml prøver, 100 mcL til 110 mcg/ml prøver).

For analysen ble proteinkvantifisering utført mot referansestandard PS200-01 (enkelpunktsanalyse).

3.2. Renhet ved RP-HPLC

Renheten ved RP-HPLC ble utført på en C4-kolonne (Symmetry 300 C4, 5 m størrelse 4,6x250 mm, Waters) termofiksert på 35 °C, bølgelengden var satt til 214 nm og elueringen ble utført ved 1 ml/min ved å benytte de følgende betingelsene:

Mobil fase: A=0,1 % TFA/vann, B=0,1 % TFA/acetonitril

Gradient: 30 % → 70 % B på 40 min.

Tid (min)	Strømning (ml/min)	% A	% B
0	1,0	70	30
3	1,0	70	30
40	1,0	30	70
45	1,0	70	30

IFN-PEG-formulerte prøver ble injisert som de forelå ved å benytte de følgende injeksjonsvolumene: 160 mcL (for 44 mcg/ml prøver), 200 mcL (for 55 mcg/ml prøver), 100 mcL (for 110 mcg/ml prøver).

3.3. Biologisk aktivitet (in vitro-bioanalyse)

Den biologiske aktiviteten ble målt ved å benytte fremgangsmåten som er tilgjengelig for IFN- β , som er en antivirusanalyse, basert på den IFN- β -induserte beskyttelsen av celler (WISH-celler – humant amniotisk vev) mot den cytopatiske effekten av et virus (Vesikulært stomatittvirus).

3.4. Bestemmelse av pH

pH-målingene ble utført ved å benytte et kalibrert pH-meter (Mettler-Toledo, mod. 713) i overensstemmelse med en standardoperasjonsprosedyre.

3.5. Oksiderte former ved peptidkartlegging/UPLC

Fremgangsmåten for kvantifiseringen av de oksiderte metioninrestene (Met1, Met117, Met36) forutser den proteolytiske fordøyningen av IFN-PEG-prøven med endoproteinase Lys-C, etterfulgt av en gradient-UPLC-analyse, en forhåndsbehandling av den formulerte prøven blir utført før den proteolytiske fordøyningen for å fjerne enhver interferens med matrikskomponentene. Separasjonen av den proteolytiske blandingen blir utført på en Acquity UPLC analytisk kolonne (BEH C18 1,7 μ m 2,1x50 mm cod. 1860002350, Waters), elueringen blir utført ved gradientbetingelser ved å benytte 0,1 % TFA/vann (A1) og 0,1 % TFA/acetonitril (B1).

De følgende instrumentsettingene og analyseparametrene kan bli benyttet:

UV-detektorbølgelengde	214 nm				
Autoprøvetaker-temperatur	+5 °C \pm 3 °C				
Kolonnetemperatur	+40 °C \pm 5 °C				
Kolonnestrømningshastighet	0,6 ml/min				
Analysevarighet	23 min				
Neste injeksjonsforsinkelse	10 min				
Lineær gradient	Tid (min)	Strømning (ml/min)	A1 (%)	B1 (%)	Kurve
	0	0,6	95	5	-----
	1,0	0,6	95	5	6
	3,0	0,6	90	10	6
	8,0	0,6	64	36	6
	18,0	0,6	60	40	6
	20,0	0,6	0	100	6
	22,0	0,6	0	100	6
23,0	0,6	95	5	6	
Total analysetid	33 minutter				

Tabell 1

PEG-IFN-beta-formuleringssammensetning (mg/ml)

	PEG-IFN	Buffer	Mannitol	L-metionin	Poloxamer 188	Beholder
PEG-IFN Man/F68-vial	0,044	10 mM acetat pH 4,2 (*)	45,0	-	0,5	DIN2R-rør
PEG-IFN Man/Met-vial (**)	0,044	10 mM acetat pH 4,2 (*)	45,0	0,12	-	DIN2R-rør
PEG-IFN Man/F68/Met-vial	0,044	10 mM acetat pH 4,2 (*)	45,0	0,12	0,5	DIN2R-rør
PEG-IFN Man/F68/Met-syr	0,044	10 mM acetat pH 4,2 (*)	45,0	0,12	0,5	1 ml sprøyte

(*) Rester av PBS-buffer er også til sted fra utgangspunktet (på grunn av 5 ganger fortykning av PEG-IFN-legemiddelstoff)

(**) Referanse

Tabell 2
% renhet ved SE-HPLC

	Nulltid	1 uke +40 °C	2 uker +40 °C	4 uker +40 °C			
	Monomer	Monomer	Monomer	Monomer			
PEG-IFN Man/F68-vial	85,2	83,3	82,1	79,8			
PEG-IFN Man/Met-vial (**)	85,3	84,3	82,2	80,3			
PEG-IFN Man/F68/Met- vial	85,0	83,0	81,1	78,7			
PEG-IFN Man/F68/Met- syr	85,2	83,4	82,0	78,8			
	Nulltid	2 uker +25 °C	4 uker +25 °C	6 uker +25 °C	28 uker +25 °C	13 uker +25 °C	26 uker +25 °C
	Monomer	Monomer	Monomer	Monomer	Monomer	Monomer	Monomer
PEG-IFN Man/F68-vial	85,2	87,1	87,1	87,2	87,3	86,3	86,7
PEG-IFN Man/Met-vial (**)	85,3	87,2	87,3	86,9	86,5	85,5	84,7
PEG-IFN Man/F68/Met- vial	85,0	87,0	86,7	86,8	86,7	85,8	86,1
PEG-IFN Man/F68/Met- syr	85,2	87,3	86,7	86,9	86,8	86,3	86,7
	Nulltid	4 uker +2-8 °C	6 uker +2-8 °C	8 uker +2-8 °C	13 uker +2-8 °C	26 uker +2-8 °C	
	Monomer	Monomer	Monomer	Monomer	Monomer	Monomer	
PEG-IFN Man/F68-vial	85,2	86,4	86,3	86,7	86,4	88,1	
PEG-IFN Man/Met-vial (**)	85,3	86,4	86,3	86,0	84,8	87,3	
PEG-IFN Man/F68/Met- vial	85,0	85,8	85,9	85,7	85,7	87,5	
PEG-IFN Man/F68/Met- syr	85,2	85,9	86,3	86,7	86,4	87,0	

(**) Referanse

Tabell 3
% renhet ved RP-HPLC

	Nulltid	1 uke +40 °C	2 uker +40 °C	4 uker +40 °C			
PEG-IFN Man/F68-vial	96,0	94,1	91,7	87,4			
PEG-IFN Man/Met-vial (**)	96,3	93,9	90,8	88,5			
PEG-IFN Man/F68/Met- vial	95,9	93,7	92,3	90,0			
PEG-IFN Man/F68/Met- syr	96,4	93,4	92,5	88,8			
	Nulltid	2 uker +25 °C	4 uker +25 °C	6 uker +25 °C	8 uker +25 °C	12 uker +25 °C	26 uker +25 °C
PEG-IFN Man/F68-vial	96,0	95,0	94,5	93,3	93,5	93,9	90,6
PEG-IFN Man/Met-vial (**)	96,3	94,3	95,0	93,4	93,3	94,1	90,9
PEG-IFN Man/F68/Met- vial	95,9	94,5	94,4	93,4	93,1	94,3	90,8
PEG-IFN Man/F68/Met- syr	96,4	94,3	94,3	93,3	93,4	93,1	90,6
	Nulltid	4 uker +2-8 °C	6 uker +2-8 °C	8 uker +2-8 °C	12 uker +2-8 °C	26 uker +2-8 °C	
PEG-IFN Man/F68-vial	96,0	94,5	94,9	94,4	95,7	96,0	
PEG-IFN Man/Met-vial (**)	96,3	95,2	93,9	94,0	95,1	95,8	
PEG-IFN Man/F68/Met- vial	95,9	94,9	94,5	93,9	95,3	95,7	
PEG-IFN Man/F68/Met- syr	96,4	94,7	94,1	94,6	94,7	96,1	

(**) Referanse

Tabell 4
Titer (mcg/ml) ved SE-HPLC

	Nulltid	1 uke +40 °C	2 uker +40 °C	4 uker +40 °C			
PEG-IFN Man/F68-vial	41,2	44,4	44,3	43,7			
PEG-IFN Man/Met-vial (**)	40,5	43,1	43,3	41,5			
PEG-IFN Man/F68/Met- vial	43,0	46,3	45,3	44,9			
PEG-IFN Man/F68/Met- syr	43,4	46,7	46,0	45,7			
	Nulltid	2 uker +25 °C	4 uker +25 °C	6 uker +25 °C	8 uker +25 °C	12 uker +25 °C	26 uker +25 °C
PEG-IFN Man/F68-vial	41,2	43,6	42,7	41,9	44,5	41,8	41,4
PEG-IFN Man/Met-vial (**)	40,5	42,0	41,2	40,4	42,7	40,6	38,4
PEG-IFN Man/F68/Met- vial	43,0	45,1	44,2	43,3	45,7	43,1	42,5
PEG-IFN Man/F68/Met- syr	43,4	45,6	44,6	43,7	46,2	43,8	43,4
	Nulltid	4 uker +2-8 °C	6 uker +2-8 °C	8 uker +2-8 °C	12 uker +2-8 °C	26 uker +2-8 °C	
PEG-IFN Man/F68-vial	41,2	42,7	42,0	44,4	42,2	41,9	
PEG-IFN Man/Met-vial (**)	40,5	41,7	40,4	43,3	41,1	39,9	
PEG-IFN Man/F68/Met- vial	43,0	44,4	43,3	45,7	43,6	43,3	
PEG-IFN Man/F68/Met- syr	43,4	44,7	44,1	46,4	44,3	44,2	

(**) Referanse

Tabell 5
Titer (mcg/ml) ved SE-HPLC

	Før filtrering (mcg/ml)	Etter filtrering (mcg/ml)	T0 (mcg/ml)	AF-gjenvinning (%)	T0-gjenvinning (%)
PEG-IFN Man/F68-vial	43,4	41,7	41,2	96,1	94,9
PEG-IFN Man/Met-vial (**)	43,3	42,7	40,2	98,3	92,5
PEG-IFN Man/F68/Met-vial	43,5	42,0	43,0	96,7	98,9
PEG-IFN Man/F68/Met-syr	43,5	42,0	43,4	96,7	99,9

Tabell 6
pH-bestemmelse

	Nulltid	4 uker +25 °C	8 uker +25 °C	12 uker +25 °C	26 uker +25 °C
PEG-IFN Man/F68-vial	4,22	4,20	4,16	4,19	4,22
PEG-IFN Man/Met-vial (**)	4,23	4,20	4,17	4,21	4,20
PEG-IFN Man/F68/Met-vial	4,22	4,21	4,19	4,23	4,22
PEG-IFN Man/F68/Met-syr	4,22	4,20	4,19	4,22	4,21
	Nulltid	4 uker +2-8 °C	8 uker +2-8 °C	12 uker +2-8 °C	26 uker +2-8 °C
PEG-IFN Man/F68-vial	4,22	4,22	4,17	4,21	4,17
PEG-IFN Man/Met-vial (**)	4,23	4,23	4,17	4,19	4,18
PEG-IFN Man/F68/Met-vial	4,22	4,25	4,19	4,23	4,20
PEG-IFN Man/F68/Metsyr	4,22	4,26	4,18	4,24	4,22

Tabell 7
Bioanalyse (MIU/ml)

	MIU/ml				
	Nulltid	4 uker +25 °C	8 uker +25 °C	12 uker +25 °C	26 uker +25 °C
PEG-IFN Man/F68/Met-vial	33,9	36,6	35,7	33,6	27,0
PEG-IFN Man/F68/Met-syr	34,8	37,9	40,1	32,6	30,2
	Nulltid	4 uker +2-8 °C	8 uker +2-8 °C	12 uker +2-8 °C	26 uker +2-8 °C
PEG-IFN Man/F68/Met-vial	33,9	38,8	36,8	34,0	31,5
PEG-IFN Man/F68/Met-syr	34,8	38,1	40,1	40,1	31,3

Tabell 8
Renhet ved SE-HPLC (%)

40 °C

	T=0		1 uke		2 uker		4 uker	
	HMW+ Dim	Monomer	HMW+ Dim	Monomer	HMW+ Dim		HMW+ Dim	Monomer
PEG-IFN/Acet55mcg	3,5	96,5	4,0	96,0	3,8	96,2	4,4	95,6
PEG-IFN/Acet55mcg/0,25 Met	3,5	96,5	3,8	96,2	4,1	95,9	4,4	95,7
PEG-IFN/Acet110mcg	3,6	96,4	4,5	95,5	5,6	94,4	5,7	94,3
PEG-IFN/Acet110mcg/0,25 Met	3,9	96,1	4,3	95,7	4,5	95,5	5,1	94,9

25

25 °C

	T=0		4 uke		8 uker		13 uker	
	HMW+ Dim	Monomer	HMW+ Dim	Monomer	HMW+ Dim	Monomer	HMW+ Dim	Monomer
PEG- IFN/Ac et55mc g	3,5	96,5	3,4	96,6	3,6	96,4	3,5	96,5
PEG- IFN/Ac et55mc g/0,25 Met	3,5	96,5	3,3	96,7	3,6	96,4	3,5	96,5
PEG- IFN/Ac et110m cg	3,6	96,4	3,7	96,3	4,0	96,0	3,7	96,3
PEG- IFN/Ac et110m cg/0,25 Met	3,9	96,1	3,7	96,3	4,0	96,1	3,9	96,1

2-8 °C

	T=0		4 uke		8 uker		13 uker	
	HMW+ Dim	Monomer	HMW+ Dim	Monomer	HMW+ Dim	Monomer	HMW+ Dim	Monomer
PEG- IFN/Ac et55mc g	3,5	96,5	3,9	96,1	3,8	96,2	3,6	96,4
PEG- IFN/Ac et55mc g/0,25 Met	3,5	96,5	3,6	96,4	4,0	96,0	3,6	96,4
PEG- IFN/Ac et110m cg	3,6	96,4	3,9	96,1	4,2	95,8	3,9	96,1
PEG- IFN/Ac et110m cg/0,25 Met	3,9	96,1	3,9	96,1	4,1	95,9	3,8	96,2

Tabell 9
Proteininnhold ved SE-HPLC

40 °C

	T=0	1 uke	2 uker	4 uker
PEG-IFN/Acet 55mcg	52,7	51,9	52,3	51,9
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	53,0	52,1	52,2	51,8
PEG-IFN/Acet 110mcg	110,2	109,1	107,9	108,0
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	110,9	108,7	107,9	107,5

25 °C

	T=0	4 uker	8 uker	13 uker
PEG-IFN/Acet 55mcg	52,7	52,5	53,0	51,6
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	53,0	53,4	53,1	51,2
PEG-IFN/Acet 110mcg	110,2	110,0	109,5	107,0
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	110,9	109,6	109,1	106,7

2-8 °C

	T=0	4 uker	8 uker	13 uker
PEG-IFN/Acet 55mcg	52,7	54,4	53,8	51,9
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	53,0	54,0	53,7	52,4
PEG-IFN/Acet 110mcg	110,2	111,1	110,5	108,6
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	110,9	111,0	110,5	108,3

Tabell 10
Renhet ved RP-HPLC

40 °C

	T=0	1 uke	2 uker	4 uker
PEG-IFN/Acet 55mcg	97,6	96,1	94,4	94,6
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	97,7	95,7	94,2	94,6
PEG-IFN/Acet 110mcg	95,9	95,5	93,8	94,4
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	96,0	95,7	93,7	94,2

25 °C

	T=0	4 uker	8 uker	13 uker
PEG-IFN/Acet 55mcg	98,7	98,3	96,5	97,3
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	98,7	98,8	96,8	96,2
PEG-IFN/Acet 110mcg	97,0	98,6	96,8	96,5
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	97,0	98,5	96,5	95,9

2-8 °C

	T=0	4 uker	8 uker	13 uker
PEG-IFN/Acet 55mcg	98,7	99,3	98,1	98,6
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	98,7	99,6	98,3	98,4
PEG-IFN/Acet 110mcg	97,0	98,3	96,8	96,6
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	97,0	98,3	96,7	96,9

27

Tabell 11
pH-verdier

25 °C

	T=0	4 uker	8 uker	13 uker
PEG-IFN/Acet 55mcg	4,22	4,21	4,22	4,12
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	4,21	4,19	4,23	4,21
PEG-IFN/Acet 110mcg	4,21	4,15	4,25	4,21
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	4,20	4,15	4,19	4,19

2-8 °C

	T=0	4 uker	8 uker	13 uker
PEG-IFN/Acet 55mcg	4,22	4,15	4,17	4,19
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	4,21	4,16	4,19	4,21
PEG-IFN/Acet 110mcg	4,21	4,15	4,17	4,20
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	4,20	4,16	4,15	4,19

Tabell 12
Bioanalyse (U/ml)

25 °C

	T=0	4 uker	8 uker	13 uker
PEG-IFN/Acet 55mcg	40,3	36,0	32,7	32,4
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	38,7	33,0	34,9	30,0
PEG-IFN/Acet 110mcg	81,9	65,7	70,8	63,9
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	77,0	63,7	72,9	65,6

2-8 °C

	T=0	4 uker	8 uker	13 uker
PEG-IFN/Acet 55mcg	40,3	40,7	34,9	28,0
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	38,7	40,1	35,7	27,4
PEG-IFN/Acet 110mcg	81,9	68,8	72,0	57,7
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	77,0	75,3	70,0	56,8

Tabell 13
Oksiderte former ved peptidkartlegging/UPLC (%)

5

2-8 °C				Stigning (%Mo)
Met1	T=0	8 uker	13 uker	
PEG-IFN/Acet 55mcg	1,7	2,0	1,3	-0,09
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	1,6	1,5	1,2	-0,13
PEG-IFN/Acet 110mcg	1,5	1,6	1,3	-0,03
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	1,3	1,6	1,3	0,02
Met117	T=0	8 uker	13 uker	
PEG-IFN/Acet 55mcg	4,6	5,5	5,3	0,24
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	4,8	4,7	4,4	-0,10
PEG-IFN/Acet 110mcg	5,0	5,1	5,1	0,06
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	5,3	5,1	4,5	-0,24
Met36	T=0	8 uker	13 uker	
PEG-IFN/Acet 55mcg	4,0	4,3	4,7	0,21
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	4,2	3,8	4,0	-0,07
PEG-IFN/Acet 110mcg	3,8	4,2	4,5	0,24
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	3,9	3,9	4,0	0,03
	0	2	3	

25 °C				Stigning (%Mo)	
Met1	T=0	4 uker	8 uker		13 uker
PEG-IFN/Acet 55mcg	1,7	1,4	1,9	1,6	0,01
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	1,6	1,2	1,8	1,3	-0,03
PEG-IFN/Acet 110mcg	1,5	-	1,9	1,5	0,05
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	1,3	1,2	1,7	1,3	0,06
Met117	T=0	4 uker	8 uker	13 uker	
PEG-IFN/Acet 55mcg	4,6	4,2	5,4	5,2	0,29
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	4,8	4,4	4,9	4,7	0,02
PEG-IFN/Acet 110mcg	5,0	-	5,2	5,0	0,02
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	5,3	4,4	5,0	4,5	-0,20
Met36	T=0	4 uker	8 uker	13 uker	
PEG-IFN/Acet 55mcg	4,0	3,5	4,6	4,8	0,36
PEG-IFN/Acet 55mcg/0,25Met	4,2	3,4	3,7	4,1	0,02
PEG-IFN/Acet 110mcg	3,8	-	4,3	4,6	0,26
PEG-IFN/Acet 110mcg/0,25Met	3,9	3,6	3,8	4,0	0,06
	0	1	2	3	

NB: I alle tabellene står mcg for mikrogram, HMW står for enheter med høy molekylvekt, Dim står for dimer, Mo for måned.

Referanseliste:

1. Derynk R. et al., *Nature* 1980; 285, 542-547;
2. Familletti, P. C., Rubinstein, S., and Pestka, S. 1981 "A Convenient and Rapid Cytopathic Effect Inhibition Assay for Interferon," in *Methods in Enzymology*, Vol. 78 (S. Pestka, ed.), Academic Press, New York, 387-394;
3. Mark D.F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81 (18) 5662-5666 (1984);
4. Pestka, S. (1986) "Interferon Standards and General Abbreviations," in *Methods in Enzymology* (S. Pestka, ed.), Academic Press, New York 119, 14-23;
5. Rubinstein, S., Familletti, P.C., and Pestka, S. Convenient Assay for Interferons. *J. Virol* 1981; 37, 756-758;
6. Shepard H.M. et al., *Nature* 1981; 294, 563-565.
7. Woghiren et al. In *Bioconjugate Chem.*, 4(5): 314-318, 1993.

PATENTKRAV

1. Flytende farmasøytisk preparat,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et pegylert interferon- β (PEG-IFN- β), en
5 polyoleksipiens, en poloxamer 188 overflateaktivt middel og en
natriumacetatbuffer, der pH i det farmasøytiske preparatet er $4,2 \pm 0,2$.
2. Preparat ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte polyoleksipiens er mannitol.
10
3. Preparat ifølge krav 1 eller 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte PEG-IFN- β er til stede i en konsentrasjon på
0,01 mg/ml til 0,1 mg/ml.
- 15 4. Preparat ifølge krav 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte PEG-IFN- β er til stede i en konsentrasjon på
0,044 mg/ml, 0,055 mg/ml eller 0,110 mg/ml.
- 20 5. Preparat ifølge ethvert av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte PEG-IFN- β inneholder en lineær eller
forgrenet PEG, fortrinnsvis en forgrenet PEG.
- 25 6. Preparat ifølge krav 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte PEG har en molekylvekt på minst 20 kDa,
fortrinnsvis minst 40 kDa, mer foretrukket 40 kDa.
- 30 7. Preparat ifølge krav 1 eller 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte polyoleksipiens er til stede i en konsentrasjon
på 30 mg/ml til 50 mg/ml.
- 35 8. Preparat ifølge krav 1 eller 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte polyoleksipiens er til stede ved en
konsentrasjon på 40 mg/ml til 50 mg/ml.
9. Preparat ifølge krav 1 eller 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte polyoleksipiens er til stede i en konsentrasjon
på 45 mg/ml.
10. Preparat ifølge krav 1 eller 2,

karakterisert ved at nevnte poloxamer 188 er til stede i en konsentrasjon på 0,1 mg/ml til 1 mg/ml.

- 5 11. Preparat ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at nevnte poloxamer 188 er til stede i en konsentrasjon på 0,4 mg/ml til 0,7 mg/ml.
- 10 12. Preparat ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at nevnte poloxamer 188 er til stede i en konsentrasjon på 0,5 mg/ml.
- 15 13. Preparat ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at nevnte natriumacetatbuffer er til stede i en konsentrasjon på 5 mM til 500 mM.
- 20 14. Preparat ifølge krav 13, karakterisert ved at nevnte natriumacetatbuffer er til stede i en konsentrasjon på 10 mM.
- 25 15. Preparat ifølge ethvert av de foregående krav, karakterisert ved at nevnte preparat er en vandig løsning.
- 30 16. Preparat ifølge ethvert av de foregående krav, karakterisert ved at nevnte preparat ytterligere omfatter metionin.
- 35 17. Preparat ifølge krav 16, karakterisert ved at metionin er til stede i en konsentrasjon på 0,10 til 0,50 mg/ml, fortrinnsvis 0,20 til 0,40 mg/ml, mer foretrukket 0,12 eller 0,25 mg/ml.
- 40 18. Fremgangsmåte for fremstilling av et flytende farmasøytisk preparat ifølge ethvert av kravene 1-17, karakterisert ved at nevnte fremgangsmåte omfatter å tilsette en beregnet mengde av en polyoleksipiens og poloxamer 188 til den natriumacetatbufrede løsningen og deretter tilsette PEG-IFN-beta.
- 40 19. Beholder som er forseglet ved sterile betingelser og er hensiktsmessig for lagring før anvendelse, karakterisert ved at den omfatter den flytende farmasøytiske formuleringen ifølge ethvert av kravene 1-17.
- 40 20. Beholder ifølge krav 19,

k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte beholder er en forhåndsfylt sprøyte, eller et rør til en autoinjektor.

21. Sett med farmasøytisk preparat,
- 5 k a r a k t e r i s e r t v e d at settet omfatter en beholder fylt med et farmasøytisk preparat ifølge ethvert av kravene 1-17.

1/1

Fig. 1

