



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **322334**

(13) **B1**

(51) Int Cl.

A61K 38/18 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19993702	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.01.29 PCT/JP98/00371
(22)	Inng.dag	1999.07.29	(85)	Videreføringsdag	1999.07.29
(24)	Løpedag	1998.01.29	(30)	Prioritet	1997.01.30, JP, 16349/97
(41)	Alm.tilgj	1999.09.29			
(45)	Meddelt	2006.09.18			
(73)	Innehaver	Biopharm Gesellschaft zur Biotechnologischen Entwicklung von Pharmaka mbH , Czernyring 22, D-69115 Heidelberg, DE			
(72)	Oppfinner	Hideki Ichikawa, Kawagoe-shi, Saitama, JP Mitsuko Inagaki, Iruma-shi, Saitama, JP			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS , Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Lyofilisert preparat av human benmorfogenetisk faktor MP52, og fremgangsmåte for fremstilling av et lyofilisert preparat av human benmorfogenetisk faktor MP52			
(56)	Anførte publikasjoner	EP 955 313			
(57)	Sammendrag				

Ved å blande human benmorfogenetisk faktor MP52 med mannitol i et vektforhold på 1 : 5-50, etterfulgt av lyofilisering, oppnås et stabilt lyofilisert preparat av human benmorfogenetisk faktor MP52 som unngår farging og atrofi av det lyofiliserte produkt av human benmorfogenetisk faktor MP52 under lagring og så forhindre kohesjon ved tidspunktet for rekonstituering.

OPPFINNELSENS OMRÅDE

Foreliggende oppfinnelse angår et lyofilisert preparat av en human benmorfogenetisk faktor MP52 og en fremgangsmåte for fremstilling av denne. Mer spesielt angår
5 oppfinnelsen et lyofilisert preparat som inneholder human benmorfogenetisk faktor MP52 og mannitol og en fremgangsmåte for fremstilling av dette.

OPPFINNELSEN BAKGRUNN

10 cDNA for human benmorfogenetisk faktor MP52 ble isolert for første gang i 1994 som en osteogeneserelatert faktor klassifisert som en TGF- β -superfamilie (Biochem. Biophys. Res. Comm., vol. 204, nr 2, 1994). Deretter har en avansert genteknologi gjort det mulig å fremstille human
15 benmorfogenetisk faktor MP52 uten å svekke dens benmorfogenetiske aktivitet (W096/33215). Human benmorfogenetisk faktor MP52 lagres i en lyofilisert tilstand. Den er imidlertid assosiert med en ulempe at en volumreduksjon (skrumping) oppstår under lagring og kohesjon av pulver
20 oppstår på tidspunkt for rekonstitusjon.

For å overkomme de ovenfor beskrevne problemer, anvendes aminosyrer, sakkarider eller flerverdige alkoholer for BMP-2 som er et protein klassifisert til den samme TGF- β -superfamilie og har egenskaper nærmest human benmorfogenetisk
25 faktor MP52 (JP-A No. HEI 6-508777). Foreliggende oppfinnere forsøkte derfor anvendelse av slike additiver til human benmorfogenetisk faktor MP52 men klarte ikke å overvinne problemene ovenfor. Beskrevet spesifisert, ble kohesjon på tidspunktet for rekonstituering observert selv om en nøytral
30 eller basisk aminosyre slik som alanin, valin eller lysin ble tilsatt human benmorfogenetisk faktor MP52 i en mengde på 0,5

til 2,5 % før lyofilisering. Når et sakkarid slik som sukrose eller dekstran ble tilsatt i en mengde på 0,5 til 1 %, etterfulgt av lyofilisering, ble fargeutvikling til blek gulgrønn og skrumping observert fra det lyofiliserte produkt.

5 Når en flerverdige alkoholer slik som sorbitol ble tilsatt i en mengde på 0,5 til 1 %, etterfulgt av lyofilisering, ble human benmorfogetisk faktor MP52 oppløst under lyofiliseringsperioden, hvilket gjorde det umulig å fremstille et lyofilisert produkt.

10

BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnere har fortsatt en utstrakt forskning for å overkomme de ovenfor beskrevne problemer. Som et resultat er det funnet at når mannitol tilsettes human
15 benmorfogetisk faktor MP52, etterfulgt av lyofilisering, observeres verken fargedannelse eller skrumping under lagring av lyofiliserte produkt og kohesjon oppstod ikke ved tidspunkt for rekonstituering, hvilket har ført til fullføring av foreliggende oppfinnelse.

20

Foreliggende oppfinnelse frembringer derfor et lyofilisert preparat av human benmorfogetisk MP52 inneholdende human benmorfogetisk faktor MP52 og mannitol. Som human benmorfogetisk faktor MP52 og mannitol. Som human benmorfogetisk faktor MP52 i foreliggende oppfinnelse
25 anvendes fortrinnsvis human benmorfogetisk faktor MP52 (som heretter benevnes "rhMP52") som er blitt fremstilt ved genteknologi beskrevet i WO96/33215. Som mannitol anvendes fortrinnsvis det beskrevet som D-mannitol i den japanske farmakope. Human benmorfogetisk faktor MP52 og mannitol
30 blandes fortrinnsvis i et vektforhold på 1 : 5 - 50.

Preparatet ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved å frysetørke en vandig blandingsløsning av

human benmorfogenetisk faktor MP52 og mannitol ved en konvensjonell metode. Beskrevet særskilt er preparatet ifølge foreliggende oppfinnelse tilgjengelig ved å tilsette en forutbestemt mengde av mannitol til en vandig løsning av rensset human benmorfogenetisk faktor MP52, blande dem, filtrere den dannede vandige blandingsløsning, fylle filtratet på en steril ampulle og utføre frysetørkingen.

Preparatet ifølge foreliggende oppfinnelse administreres til en pasient i en mengde effektivt for terapeutisk behandling etter at det er oppløst i destillert vann for injeksjon eller svak syre (ca. pH 3), f.eks. en saltsyreløsning eller sitratsyrebuffer ved anvendelse.

Foretrukne mengder mannitol inkorporert i preparatet ifølge oppfinnelsen ble bestemt ved en stabilitetstest. Stabilitetstesten ble utført ifølge metoden beskrevet i instruksjonen for standard operasjonsprosedyrer laget basert på den japanske farmakope XIII, der egenskaper slik som forekomst og klarhet av løsning, elektroforese og vanninnhold ved starttidspunktet for testen og 3 måneder senere og ektopisk bendannelse etter 6 måneder ble observert og målt.

Som et resultat ble ingen endringer i egenskapene slik som forekomst og klarhet av løsningen observert ved starttidspunktet for testen og 3 måneder senere. Fra resultatene av målingen på elektroforese og vanninnhold, var preparatet inneholdende mannitol ved de ovenfor beskrevne vektforhold stabile både ved starttidspunktet for testen og 3 måneder senere.

Det antas at det foretrukne vanninnhold av et frysetørket produkt vanligvis er 2 % eller lavere. Det ble antatt fra funnene ovenfor at en human benmorfogenetisk faktor MP52-preparat inneholdende mannitol i en mengde på 5 til

50 mg, helst 10 mg per 1 mg human benmorfogenetisk faktor MP52 foretrekkes som et farmasøytisk produkt.

I tillegg ble ektopisk bendannelse for hver av de lyofiliserte preparater av human benmorfogenetisk faktor MP52 inneholdende henholdsvis 10, 25 og 50 mg mannitol målt etter lagring i 6 måneder. Som et resultat ble ektopisk bendannelse observert fra alle preparater uavhengig av lagringstemperatur og mengde mannitol. Basert på de ovenfor beskrevne forsøksresultater, er det bekreftet at tilsetning av mannitol til human benmorfogenetisk faktor MP52 før lyofilisering ikke har skadelige effekter på human benmorfogenetisk faktor MP52 og det dannede preparat forblir stabilt i en lang tidsperiode.

Foreliggende oppfinnelse vedrører slik et lyofilisert preparat av human benmorfogenetisk faktor MP52, kjennetegnet ved at det omfatter en blanding av human benmorfogenetisk faktor MP52 og mannitol ved et blandingsforhold i området 1 : 5 - 50 (vektforhold) og en fremgangsmåte for fremstilling av et lyofilisert preparat av human benmorfogenetisk faktor MP52, kjennetegnet ved at tilsetning av mannitol til en vandig, rensset løsning av human benmorfogenetisk faktor MP52 i en mengde som gir et blandingsforhold av human benmorfogenetisk faktor MP52 og mannitol i området 1 : 5 - 50 (vektforhold) og deretter lyofilisering av den dannede blandingsløsning.

25

BESTE MÅTE Å UTFØRE OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse vil heretter bli beskrevet mer spesielt ved de følgende eksempler.

Eksempel 1 Fremstilling av et rhMP52-preparat til et mg/ml av en vandig løsning av rensset MP52, som var blitt laget ved fremstillingsprosessen beskrevet i WO96/33215, ble D-mannitol fra den japanske farmakope tilsatt i en mengde på henholdsvis

10, 25 og 50 mg, og de ble blandet. Deretter ble den dannede blanding filtrert gjennom et 0,22 µm membranfilter, 1 ml porsjoner av filtratet som ble frembrakt ble fylt på ampuller under sterile betingelser. De ble lyofilisert hvormed et
5 preparat ifølge foreliggende oppfinnelse ble frembrakt i form av et farmasøytisk produkt.

Eksempel 2 Stabilitetstest av rhMP52-preparatet

Det lyofiliserte rhMP52-preparat frembrakt i eksempel 1 ble fylt på en ampulleflaske (lufttett,
10 gjennomsiktig) og ble lagret ved 2 - 8 °C, 25 °C og 40°C. Stabiliteten ble undersøkt basert på de følgende kriterier etter tre måneders lagring. Kriteriene for evaluering var som følger:

Egenskaper:

15 (Forekomst): Preparatet som forble i form av en hvit kake og som ikke ble farget ble vurdert som "uendret".

(Klarhet av løsning): En løsning der preparatet løst i 1 ml destillert vann for injeksjon ble vurdert som "uendret" når den var fargeløs, gjennomsiktig og kohesjonsfri.

20 (Elektroforese): En renhet for et hovedbånd ble beregnet fra en arealprosent etter introduksjon av et bilde ved en filmscanner som tilpasser transmisjon ved hjelp av en rød film og deretter beregner en integrert optisk tetthet (IOD) % for hvert bånd.

25 (Vanninnhold): Vanninnholdet av preparatet ble målt med et mikrofuktighetsmeter.

Med hensyn på egenskaper forble, som et resultat, preparatet ifølge oppfinnelsen uforandret med hensyn på forekomst og klarhet av løsningen, mens kohesjon ble observert
30 i et lyofilisert produkt av rhMP52 alene. Som et resultat av elektroforese viste hvert preparat god stabilitet (%).

Måleresultatenes vanninnhold (%) vises i tabell 1, der det fremgår at det ikke er noen stor endring i vanninnholdet (%) blant preparatene. Tabell 1 viser at sammenlignet med produktet bestående av bare rhMP52, er vanninnholdet for hvert av preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse lavere ved tidspunktet for fremstilling eller etter lagring og derfor oppstår ikke skrumpning så lett.

Tabell 1

Preparat	Initielt	3 måneder senere		
		2 - 8 °C	25 °C	40 °C
rhMP52 alene	9,7 %	9,2 %	7,6 %	7,8 %
+ Mannitol 10 mg	1,6 %	1,6 %	1,4 %	1,2 %
+ Mannitol 25 mg	0,9 %	0,7 %	0,6 %	0,5 %
+ Mannitol 50 mg	0,6 %	0,5 %	0,5 %	0,4 %

10

Eksempel 3 Ektopisk bendannelse av rhMP52

En ampulle (1 mg/ampulle) inneholdende rhMP52-preparatet frembrakt i eksempel 1 ble lagret ved henholdsvis 4 °C og 25 °C i 6 måneder, deretter ble 1 ml destillert vann for injeksjon tilsatt ampullen, hvormed en løsning for administrering ble frembrakt. Den frembrakte løsning ble administrert intramuskulært til en ICR-mus (levert fra Nippon Crea Co., Ltd.) i en mengde på 20 µg/20 µl. To uker senere ble nærvær eller fravær av ektopisk bendannelse observert ved en myk-røntgenfotografering (n=2). Resultatene vises i tabell 2.

20

Tabell 2

Preparat	4 °C	25 °C
rhMP52 alene	ebf* observert	ebf observert
+ Mannitol 10 mg	ebf observert	ebf observert
+ Mannitol 25 mg	ebf observert	ebf observert
+ Mannitol 50 mg	ebf observert	ebf observert

ebf: ektopisk bendannelse

INDUSTRIELL ANVENDBARHET

5 Det lyofiliserte produkt av human benmorfofogenetisk faktor MP52 omfatter problemene med farging eller skrumping under lagring og kohesjon ved tidspunkt for rekonstituering. Det lyofiliserte preparat ifølge foreliggende oppfinnelse er imidlertid fri for slike problemer. Human benmorfofogenetisk

10 faktor MP52 i det lyofiliserte preparat ifølge oppfinnelsen forblir stabil og ingen vesentlige endringer observeres i renhet, vanninnhold og ektopisk bendannelse selv etter lagring over lang tid. Følgelig er foreliggende oppfinnelse anvendbar innen området for farmasøytisk produkt.

P a t e n t k r a v

- 5 1. Lyofilisert preparat av human benmorfogenetisk faktor MP52,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en blanding av human benmorfogenetisk faktor MP52 og mannitol ved et blandingsforhold i området 1 : 5 - 50 (vektforhold).
- 10 2. Preparat ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at human benmorfogenetisk faktor MP52 fremstilles ved hjelp av genteknologi.
- 15 3. Fremgangsmåte for fremstilling av et lyofilisert preparat av human benmorfogenetisk faktor MP52,
k a r a k t e r i s e r t v e d tilsetting mannitol til en vandig, rensset løsning av human benmorfogenetisk faktor MP52 i en mengde som gir et blandingsforhold av human benmorfogenetisk faktor MP52 og mannitol i området 1 : 5 - 50 (vektforhold) og deretter lyofilisering av den dannede blandingsløsning.
- 20 4. Fremgangsmåte ifølge krav 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at human benmorfogenetisk faktor MP52 fremstilles ved hjelp av genteknologi.