



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 224 290**

⑤① Int. Cl.7: **A61K 47/18**  
**A61K 38/21**  
**A61K 9/08**

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **97952621 .7**

⑧⑥ Fecha de presentación: **23.12.1997**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0948358**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.1999**

⑤④ Título: **Formulaciones líquidas estables de interferón.**

③⑩ Prioridad: **24.12.1996 US 34353 P**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2005**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2005**

⑦③ Titular/es: **Biogen Idec MA Inc.**  
**14 Cambridge Center**  
**Cambridge, Massachusetts 02142, US**

⑦② Inventor/es: **Dibiasi, Mary, D.;**  
**Staples, Mark;**  
**Chung, Wen-Li y**  
**Scharin, Eric**

⑦④ Agente: **Díez de Rivera de Elzaburu, Alfonso**

ES 2 224 290 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Formulaciones líquidas estables de interferón.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a métodos para estabilizar interferón beta humano y a formulaciones líquidas estables de interferón beta.

10 **Antecedentes de la invención**

Los interferones son proteínas que tienen una diversidad de actividades biológicas, algunas de las cuales son antivirales, inmunomoduladoras y antiproliferativas. Son polipéptidos de cadena única, relativamente pequeños y específicos de especie, producidos por las células de los mamíferos en respuesta a la exposición a una diversidad de inductores tales como virus, polipéptidos, mitógenos y similares. Los interferones protegen los tejidos y las células animales contra el ataque viral, y son un mecanismo importante de defensa del anfitrión. En la mayoría de los casos, los interferones proporcionan mejor protección a los tejidos y células de la especie a partir de la cual han sido producidos que a otros tipos de tejidos y células, lo que indica que el interferón derivado de humanos debería ser más eficaz para tratar las enfermedades humanas que los interferones procedentes de otras especies.

Hay varios tipos distintos de interferones humanos, clasificados generalmente como leucocito (interferón alfa), fibroblasto (interferón beta) e inmune (interferón gamma), y un gran número de sus variantes. Se pueden encontrar discusiones generales de interferones en diversos textos y monografías, que incluyen: *The Interferon System* (W. E. Stewart, II, Springer-Verlag, N.Y. 1979); e *Interferon Therapy* (World Health Organization Technical Reports Series 676, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 1982).

El método de administración de interferón es un factor importante en la aplicación clínica de este importante agente terapéutico. La administración sistémica de interferón mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea se ha usado más frecuentemente con cierto éxito para tratar enfermedades tales como tricoleucemia, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y el sarcoma de Kaposi asociado. Se sabe, sin embargo, que las proteínas en forma purificada son especialmente susceptibles a la degradación. Para el interferón beta, el/los mecanismo(s) de degradación primario(s) en disolución son la agregación y desamidación. La falta de estabilidad de interferón en disoluciones y otros productos ha limitado por ello su utilidad.

Las composiciones farmacéuticas de interferón para uso clínico contienen comúnmente interferón en forma de una preparación liofilizada (es decir, congelada y deshidratada) en combinación con excipientes y estabilizantes orgánicos complejos, tales como agentes tensoactivos no iónicos (es decir, tensoactivos), diversos hidratos de carbono, polioles orgánicos y/o albúmina de suero humano. Las preparaciones liofilizadas tienen la desventaja de que necesitan un envasado complejo, ya que se necesita un suministro separado de agua estéril para inyección. Además, las preparaciones liofilizadas necesitan varias manipulaciones antes del uso, aumentando así la probabilidad de pinchazos con agujas y caída de componentes durante la preparación de la inyección. Estas manipulaciones son especialmente problemáticas para las poblaciones de pacientes que presentan debilidad muscular y coordinación pobre, como las personas con esclerosis múltiple (EM). Los pacientes de EM pueden administrarse interferones, de forma que la disponibilidad de una forma farmacéutica que es mucho más fácil de administrar que los productos liofilizados actuales representa un valor añadido importante para la población de pacientes destinataria. Las formulaciones líquidas simples de interferón son muy deseables, para evitar la reconstitución necesaria cuando se usan preparaciones liofilizadas.

Las formulaciones líquidas sin liofilizar que contienen interferones pueden contener también vehículos complejos tales como albúmina de suero humano, polioles, hidratos de carbono y agentes estabilizantes tensoactivos aniónicos. Véase, por ejemplo, el documento WO 89/10756 (Hara *et al.*- que contiene polioliol y p-hidroxibenzoato). El documento WO 88/09674 describe formulaciones estabilizadas de interferón gamma que comprenden ácido lactobiónico y un tampón acetato/glicocola. La adición de ácido lactobiónico evita la formación de agregados de orden superior en la reconstitución de la formulación liofilizada. El documento EP0163111 revela que los aminoácidos, tales como arginina o glutamato, pueden incrementar la solubilidad de las composiciones de interferón en agua. El documento EP0284249 describe composiciones de interferón liofilizadas que comprenden glicocola o albúmina de suero humano (HSA), un tampón (p.ej. acetato) y un agente isotónico (p.ej. NaCl). El documento US4496537 describe composiciones de interferón liofilizadas que contienen tampón fosfato, glicocola y HSA. Se dice que el uso de glicocola junto con HSA mejora la reconstitución de la formulación liofilizada.

60 **Resumen de la invención**

Esta invención ha resuelto los problemas anteriores con el descubrimiento de que el interferón beta humano se puede estabilizar cuando se coloca en disoluciones tamponadas que tienen un pH entre alrededor de 4 y 7,2, y las disoluciones contienen un aminoácido como agente estabilizante, y en algunos casos una sal (si el aminoácido no contiene una cadena lateral cargada). El interferón beta no se liofiliza, sino que una vez preparado a partir de sus fuentes usando métodos conocidos para el técnico de experiencia habitual, se incluye directamente en la formulación de esta invención.

## ES 2 224 290 T3

Por lo tanto, un aspecto de la invención es una composición líquida que comprende un interferón y un agente estabilizante entre alrededor de 0,3% y 5% en peso, que es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos ácidos, arginina y glicocola. La composición líquida no se ha liofilizado previamente. Además, es preferible que la composición líquida esté contenida dentro de un recipiente, tal como una jeringa, en el cual el recipiente tiene una superficie en contacto con el líquido que está revestida con un material inerte para interferón, tal como silicona o politetrafluoroetileno. Las composiciones preferidas incluyen interferón beta, o un interferón producido recombinantemente, en un tampón que tiene un pH entre alrededor de 4,0 y alrededor de 7,2. Otras formulaciones de la invención incluyen:

(1) un tampón acetato 20 mM de pH 5,0, no liofilizado previamente, en el que el tampón incluye interferón beta más ingredientes seleccionados de (a) arginina-HCl 150 mM; (b) cloruro sódico 100 mM y glicocola 70 mM; (c) arginina-HCl 150 mM y 15 mg/ml de albúmina de suero humano; (d) arginina-HCl 150 mM y 0,1% de Pluronic F-68; (e) cloruro sódico 140 mM; (f) cloruro sódico 140 mM y 15 mg/ml de albúmina de suero humano; y (g) cloruro sódico 140 mM y 0,1% de Pluronic F-68;

(2) un líquido a pH 5,0 que incluye interferón beta, ácido L-glutámico 170 mM e hidróxido sódico 150 mM, no liofilizado previamente;

(3) un tampón fosfato 20 mM a pH 7,2, no liofilizado previamente, en el que el tampón incluye interferón beta más ingredientes seleccionados de (a) arginina-HCl 140 mM; y (b) cloruro sódico 100 mM y glicocola 70 mM.

Otra realización de la invención es un equipo para administración parenteral de una formulación líquida de interferón. El equipo comprende un recipiente que contiene una formulación líquida a un pH entre 4 y 6, y el líquido comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de interferón beta que no se ha liofilizado previamente, y un agente estabilizante de aminoácido de alrededor del 5% en peso o menos; e instrucciones para el uso.

Aún otra realización de la invención es una composición farmacéutica líquida adecuada para administración parenteral a mamíferos, que consiste esencialmente en una cantidad efectiva de interferón beta, que no se ha liofilizado previamente, en un tampón que mantiene el pH dentro del intervalo de 4,0 a 6,0, y un agente estabilizante de aminoácido a una fuerza iónica apropiada. La composición está contenida dentro de un recipiente de almacenamiento tal como una jeringa. Preferiblemente, el recipiente de almacenamiento carece de interfase oxígeno/líquido (es decir, la disolución de interferón no está expuesta a gas que contiene oxígeno durante la preparación y el almacenamiento). El interferón beta conserva esencialmente su actividad antiviral durante el almacenamiento, a una temperatura entre alrededor de 2 grados C y alrededor de 25 grados C durante un periodo de al menos 3 meses.

Un proceso de la invención para estabilizar interferón beta en composiciones farmacéuticas líquidas, de forma que conserva esencialmente su estabilidad física durante el almacenamiento a una temperatura entre alrededor de 2 y alrededor de 25 grados C durante un periodo de al menos 3 meses, comprende mezclar: a) una cantidad efectiva de interferón beta; b) un tampón que mantiene el pH dentro del intervalo de 4,0 a 7,2 a una fuerza iónica apropiada; y c) un agente estabilizante de aminoácido, en el que el líquido no se ha liofilizado previamente, y no ha sido expuesto a un gas que contiene oxígeno durante la preparación y el almacenamiento.

Las formulaciones líquidas de la invención tienen muchas ventajas sobre las formulaciones liofilizadas. Las ventajas incluyen: (i) un volumen de inyección menor necesario para una formulación líquida inducirá menos molestia que un volumen mayor; (ii) la sustitución de excipientes complejos por aminoácidos simples hace posible monitorizar la calidad del producto final más exactamente; (iii) el envasado se simplifica enormemente debido a la eliminación de la necesidad de un suministro separado de agua para inyección (WFI) y jeringa y vial separados; (iv) se puede mejorar la exactitud de la dosificación debido al menor número de transferencias de líquido; y (v) la seguridad del producto se mejora porque la administración más simple disminuye la probabilidad de pinchazos con agujas y caída de componentes durante la preparación de la inyección.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar una formulación líquida biológicamente activa y estable de interferón beta para uso en aplicaciones inyectables.

Otro objetivo de esta invención es proporcionar una formulación que no necesita una liofilización previa de una composición de interferón beta.

Otro objetivo de esta invención es evitar la pérdida de estabilidad de una formulación líquida de interferón beta: a) evitando la cavitación y/o la formación de un espacio de cabeza durante la preparación de la composición líquida, o b) almacenando la formulación líquida con un espacio de cabeza que consiste en un gas inerte, tal como argón o nitrógeno.

Aún otro objetivo de esta invención es proporcionar una formulación líquida que permite el almacenamiento durante un largo periodo de tiempo en estado líquido, que facilita el almacenamiento y el transporte previos a la administración. Otro objetivo de esta invención es proporcionar una formulación líquida que se hace y se administra fácilmente, al haber eliminado las etapas de liofilización y reconstitución.

## ES 2 224 290 T3

Un objetivo adicional de la invención es el uso de aminoácidos simples como estabilizantes alternativos además de la albúmina de suero comúnmente usada, haciendo más fácil monitorizar la calidad del producto.

5 Aún otro objetivo de esta invención es proporcionar una composición farmacéutica que contiene interferón beta sin liofilizar, que se puede producir de forma menos costosa.

10 Otras ventajas de la invención se enuncian en parte en la descripción que sigue, y en parte serán obvias a partir de esta descripción, o se pueden conocer a partir de la práctica de esta invención. Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen una parte de esta especificación ilustran, y junto con esta descripción, sirven para explicar el principio de la invención.

### Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 es un gráfico que muestra el porcentaje de monómero de interferón beta restante en el líquido de proceso bruto en función del porcentaje de oxígeno disuelto en el líquido.

20 La Figura 2 es un gráfico que muestra el porcentaje de concentración de proteína normalizada con la del material de partida frente al tiempo para la formulación líquida BG9589-1. Las muestras marcadas con "4°C" (cuadrados oscuros) se incuban entre 2-8°C. Las otras muestras se incuban a 25°C (círculos oscuros); 33°C (triángulos oscuros) y 40°C (rombos oscuros).

25 La Figura 3 es un gráfico que muestra el porcentaje de concentración de proteína normalizada con la del material de partida frente al tiempo para la formulación BG9589-3. Las muestras marcadas con "4°C" se incuban entre 2-8°C. Las otras muestras se incuban a 25°C (círculos oscuros); 33°C (triángulos oscuros) y 40°C (rombos oscuros).

### Descripción detallada de la invención

30 La presente invención supera los problemas y desventajas asociados a las estrategias y diseños actuales, y proporciona un método simple para estabilizar interferón, y una formulación de interferón simple con estabilidad de almacenamiento aumentada. La invención se basa, en parte, en los descubrimientos de que:

a) el interferón beta es particularmente inestable y agrega al ponerlo en contacto con oxígeno, que se hace burbujear de forma activa en el líquido o que se pone en contacto estático, como en un espacio de cabeza;

35 b) las preparaciones líquidas de interferón beta que carecen de un vehículo tal como albúmina de suero humano son particularmente susceptibles a la adsorción (es decir, reacción química o unión física) en superficies de vidrio; y

c) el interferón beta agrega a bajas fuerzas iónicas, y necesita un medio iónico para estabilizarse en estado acuoso.

40 Por lo tanto, la invención se dirige a los métodos para estabilizar interferón beta humano que evitan estas dificultades, y a las formulaciones líquidas resultantes de interferón beta estabilizado.

#### A. Definiciones

45 El término "tampón" se refiere a las disoluciones de un ácido débil y una sal que contiene el anión del ácido, o a las disoluciones de una base débil y su sal. En particular, el término "acetato", cuando se usa en esta especificación (véase también la Tabla I, más adelante) se refiere a un sistema tampón que contiene preferiblemente acetato sódico y ácido acético, y el término "fosfato" se refiere a un sistema tampón que contiene preferiblemente fosfato sódico dibásico y monobásico hepta y monohidrato, respectivamente. Además, las disoluciones de la Tabla II (más adelante) que  
50 contienen un aminoácido ácido en combinación con hidróxido sódico, aunque convencionalmente no se consideran tampones de la manera que este término se conoce en la técnica, se incluyen sin embargo dentro de la definición.

55 El término "excipiente" se refiere a cualquier compuesto añadido durante el procesamiento y/o almacenamiento a una formulación líquida con el propósito de alterar las propiedades macroscópicas, mejorando la estabilidad y/o el ajuste de la osmolalidad.

La expresión "agente estabilizante" se refiere a un excipiente que mejora o aumenta de otra forma la estabilidad.

60 El término "estabilidad" tiene necesariamente una definición funcional, y significa la constancia temporal relativa de la actividad de interferón, tal como la actividad antiviral y/o la estructura del interferón.

65 El término "cavitado" se refiere a cualquier formulación líquida de interferón que, debido a cambios de presión o a agitación física, ha tenido contacto con burbujas que contienen oxígeno (p.ej., aire) al menos durante su preparación y almacenamiento. El término "cavitación" también significa que se ha formado una interfase gas que contiene oxígeno/líquido en algún punto durante la preparación, almacenamiento y uso de la formulación líquida de interferón. El término "cavitado" también significa que los niveles de oxígeno disuelto en las formulaciones líquidas de interferón excede alrededor del 10% de los valores de equilibrio atmosférico a las temperaturas encontradas típicamente al menos durante la preparación y el almacenamiento.

## ES 2 224 290 T3

El término “parenteral” como se usa aquí incluye las técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intrasternal, intraperitoneal, oftálmica o intrarraquídea.

5 La expresión “sal farmacéuticamente aceptable” significa cualquier sal de adición orgánica o inorgánica que es relativamente atóxica e inocua para un paciente a concentraciones coherentes con una actividad efectiva, de forma que los efectos secundarios atribuibles a la sal no vician los efectos beneficiosos del interferón.

10 Una “cantidad efectiva” de un compuesto es la cantidad que produce un resultado o ejerce una influencia sobre la enfermedad particular que se está tratando. Una “cantidad efectiva” también significa la cantidad que produce un resultado positivo (es decir, ejerce un efecto antiviral) en el ensayo CPE de actividad antiviral.

15 Como se usa aquí, una “cantidad farmacéuticamente efectiva” de interferón significa un porcentaje de concentración del agente que se sabe en las técnicas médicas y farmacéuticas que es seguro y efectivo para tratar una enfermedad particular.

20 “Isotónico con la sangre” (usado de forma intercambiable con “isotonicidad”) se refiere a una composición líquida de interferón que tiene una concentración suficiente de componentes, de forma que su comportamiento osmótico es sustancialmente idéntico al de la sangre, es decir, las células en contacto con la formulación conservarán sustancialmente su forma y no sufrirán transferencias de agua por presiones osmóticas.

25 “Especie poliónica” (usado de forma intercambiable con “especie polielectrolítica”) se refiere a una sustancia de alto peso molecular que es un electrolito y, cuando se usa en las formulaciones de esta invención, lleva al máximo la fuerza iónica para una osmolalidad dada. Esta definición se basa en el descubrimiento de que el interferón beta se estabiliza mediante una fuerza iónica elevada, pero la fuerza iónica total está limitada por la necesidad de que la disolución sea isotónica con la sangre (véase el Ejemplo 7). Una forma preferida de llevar al máximo la fuerza iónica para una osmolalidad dada es usar un excipiente que es una especie poliónica.

30 Un material que es “inerte para interferón” significa un material que tiene al menos la propiedad de no reaccionar físicamente y/o químicamente con interferón.

### B. Producción de interferones

35 Esta invención es aplicable en general a todos los tipos de interferón, que incluyen interferón natural, interferón producido mediante tecnología de ADN recombinante e interferón producido mediante síntesis o modificación química. Además, la invención se puede usar con interferón bruto, semipurificado y purificado procedente de fibroblastos, leucocitos, linfocitos o cualquier otro tejido que contiene o produce interferón, de humanos o de cualquier otra especie apropiada. Más preferiblemente, la invención es aplicable a interferón de fibroblastos humanos (interferón beta).

40 El interferón beta más preferido es una forma recombinante, y los métodos de ADN recombinante para producir proteínas, que incluyen los diversos interferones, son conocidos y no pretenden limitar la invención de ninguna manera. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.399.216, 5.149.636, 5.179.017 (Axel *et al.*); 4.470.461 (Kaufman). Se han producido formas recombinantes de interferón beta. Véase, por ejemplo, la patente europea 0 41313 (Fiers - expresión de interferón beta); la patente de EE.UU. 4.966.843 (McMormick *et al.* - expresión de interferón en células CHO); la patente de EE.UU. 5.326.859 (Sugano *et al.* - ADN codificante de interferón beta); el interferón beta también se puede modificar, recombinantemente o químicamente, y se puede producir en medios con o sin suero. Las formas de interferón beta pueden incluir variantes tales como mutantes deficientes de cisteína (patentes de EE.UU. 4.588.585 y 4.737.462: Mark *et al.*) y mutantes deficientes de metionina (documento EP 260 350 - Wang *et al.*). La secuencia primaria de aminoácidos de la proteína se puede aumentar mediante modificación usando restos de hidratos de carbono (glicosilación) o mediante otras moléculas suplementarias. Otras modificaciones pueden tener lugar por medio de los sistemas de procesamiento postranslacional de la célula anfitriona. Los residuos de aminoácidos individuales de la cadena se pueden modificar adicionalmente mediante oxidación, reducción u otra modificación, y la proteína se puede escindir para obtener fragmentos activos. La estructura química exacta de un interferón beta recombinante particular dependerá por tanto de varios factores, y no pretende limitar el alcance de la invención. Todas las proteínas de interferón beta incluidas en las formulaciones descritas aquí conservarán su bioactividad cuando se coloquen en condiciones ambientales adecuadas.

50 Un método para producir interferón beta recombinante es cultivar células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con el gen de interferón beta humano. El interferón beta recombinante es segregado por las células CHO desarrolladas en cultivo en suspensión por cargas que contiene suero bovino fetal. Las células se pueden cultivar en frascos con agitador almacenados en un incubador de CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>) a alrededor de 35 grados Celsius (en adelante “C”). Los múltiples frascos con agitador se pueden mezclar e inocular en fermentadores de tamaño creciente si se desea aumentar la producción. El crecimiento en un fermentador dado se lleva a cabo durante alrededor de seis días, tiempo en el que el producto de interferón beta activo se acumula en el medio de cultivo. Entonces se puede recolectar el cultivo y eliminar las células del medio que contiene el producto mediante, por ejemplo, filtración de flujo tangencial.

## C. Purificación de interferones

Los esquemas de purificación para interferones están bien caracterizados y disponibles para los que tienen experiencia habitual en la técnica. Tales métodos incluyen procedimientos de etapa única o de etapas múltiples que implican 5 diversas etapas de separación cromatográfica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.015.730 (Friesen *et al.* - cromatografía de afinidad y HPLC); 4.541.952 (Hosoi *et al.* - cromatografía de quelación).

Un método ejemplar implica explotar la naturaleza extraordinariamente hidrofóbica y relativamente básica de la molécula de interferón beta, así como su fuerte afinidad para unir iones metálicos. Véase, por ejemplo, Knight y 10 Fahey, "Human Fibroblast Interferon, an Improved Purification", *J. Biol. Chem.*, **256**: 3609-3611 (1981) y Edy *et al.*, "Purification of Human Fibroblast Interferon by Zinc Chelate Chromatography", *J. Biol. Chem.* **232**: 5934-5935 (1981), los cuales se incorporan aquí como referencia.

Brevemente, las etapas de captura y purificación implican la unión de interferón beta a una serie de columnas 15 de Sepharose<sup>®</sup> (fabricado por Pharmacia Biotech) y la elución con sales y un poliol. Una vez que el eluato final de la Sepharose se ha diluido y ajustado disminuyendo el pH, el interferón beta se unirá a SP Sepharose<sup>®</sup> (Pharmacia Biotech). La mayor parte de las proteínas restantes presentes en la carga de la columna son de naturaleza más básica que el interferón beta monomérico, y se unen más fuertemente a la columna que el interferón. El ADN y los virus se separan del interferón beta en esta columna. La columna se lava después con una serie de tampones que contienen 20 cloruro sódico.

El producto de interferón se unirá ahora a una columna de Sepharose<sup>®</sup> quelante (Pharmacia Biotech) que se ha cargado previamente con zinc. Véase Edy *et al.*, anteriormente. Esta columna se hace funcionar en una atmósfera sin 25 oxígeno para proteger el grupo sulfhidrilo libre de la molécula, como en todas las etapas siguientes. El interferón purificado se acidifica y se mantiene a pH bajo para inactivar cualquier virus restante. Tras la neutralización, se concentra el interferón usando filtración de flujo cruzado y después el tampón se cambia con una disolución tampón neutra. El proceso de cambio de tampón reduce las concentraciones de zinc y compuestos orgánicos. Después, el interferón bruto se puede almacenar a -70°C antes de las etapas de formulación.

## D. Formulación de interferones

En el método de purificación ejemplar descrito anteriormente, y tras el primer proceso de cambio de tampón, se 30 inicia un segundo proceso de cambio de tampón, sólo que la disolución tampón neutra se sustituye con una disolución tampón de pH entre 4 y 7,2 que contiene un agente estabilizante, descrito con más detalle más adelante. La formulación resultante que contiene interferón se califica como "intermedio de proceso", y se puede congelar para su almacenamiento. Véase también el Ejemplo 7.

Si se almacenó en estado congelado (en una atmósfera de un gas inerte tal como argón o nitrógeno), después se 40 puede descongelar y bombear a través de un filtro de 0,22 micras a un recipiente tarado, preferiblemente de acero inoxidable, en el que el intermedio de proceso se combina con un diluyente previamente esterilizado mediante filtración, hasta que se alcanza el peso de producto final deseado. El diluyente consiste en el mismo tampón que se usó para el segundo proceso de cambio de tampón. El producto líquido final se esteriliza después mediante filtración mediante procedimientos asépticos, usando por ejemplo dos filtros de 0,22 micras en serie, y se dispensa en un recipiente sellado, preferiblemente de acero inoxidable, que contiene una entrada de gas inerte, una combinación de válvula/filtro de 45 desgasificación, y un tubo sonda afluente/efluente. El producto final se bombea a través del tubo sonda al recipiente sellado. Usando un gas inerte tal como nitrógeno, el producto final se transfiere por presión al cabezal de la bomba de un aparato capaz de llenar asépticamente jeringas estériles.

Están disponibles varios métodos para llenar asépticamente jeringas estériles, y el método particular usado no 50 pretende limitar el alcance de la presente invención. Un método ejemplar implica el uso de un cargador de jeringas autoclavable HYPACK<sup>®</sup> (Becton Dickinson Pharmaceutical Systems, Franklin Lakes, NJ). Las jeringas se autoclavan con los protectores en su lugar. Generalmente, los aparatos de este tipo incorporan una cámara de vacío que contiene las jeringas a llenar con la formulación de interferón. La cámara se coloca en un medio aséptico. Cada jeringa se 55 sitúa verticalmente en la cámara con su extremo abierto acoplado a un vástago de émbolo, adaptado para ajustarse al extremo abierto del cilindro de la jeringa. El vástago está diseñado para insertar una junta de estanqueidad en el cilindro para retener el líquido dentro. Se deja un pequeño espacio de cabeza en la jeringa tras la inserción. La cámara se vacía y se vuelve a llenar con un gas inerte sin oxígeno (p.ej., argón, nitrógeno) varias veces, y cuando se alcanza el vacío final los vástagos se llevan mecánicamente a poca distancia de los cilindros abiertos de las jeringas, y las juntas de estanqueidad se insertan automáticamente en las jeringas respectivas. Después la cámara se ventila con aire filtrado 60 para devolver la presión dentro de la cámara a los niveles atmosféricos. La cantidad de vacío determinará el tamaño del espacio de cabeza que contiene gas inerte.

En el sistema particular que se usa, las jeringas se orientan verticalmente y se mantienen en su lugar mediante un 65 engranaje sobre un disco rotatorio. Las jeringas se colocan primero bajo una aguja que se inserta en la jeringa. La aguja llena el interior de la jeringa con un gas inerte (p.ej., nitrógeno, argón). Después la aguja se retira fuera de la jeringa. La jeringa se coloca entonces bajo una segunda aguja que se inserta en la jeringa. Esta aguja está unida a una bomba que dispensa el producto en la jeringa. Después la segunda aguja se retira de la jeringa. La jeringa se coloca entonces bajo una tercera aguja que se inserta en la jeringa. Un émbolo (previamente autoclavado) se empuja en la

## ES 2 224 290 T3

jeringa con un gas inerte sin oxígeno (p.ej., nitrógeno, argón), y se retira la aguja de la jeringa. El émbolo se coloca para dejar un espacio de cabeza de gas inerte entre la parte superior del líquido y la parte inferior del émbolo.

### 1. *El excipiente*

El excipiente es preferiblemente una especie poliónica que lleva al máximo la fuerza iónica para una osmolalidad dada, tal como, por ejemplo, un polielectrolito que puede incluir heparina u otra especie polimérica. Como se discute en el Ejemplo 4, el interferón beta se estabiliza mediante una fuerza iónica elevada, pero la fuerza iónica total está limitada por la necesidad de que la disolución sea isotónica con la sangre. Por tanto, una forma preferida de llevar al máximo la fuerza iónica para una osmolalidad dada es usar una especie poliónica. Las disoluciones de interferón beta de la invención son isotónicas con la sangre (alrededor de 290 miliosmoles/kilogramo).

El agente estabilizante más preferido para la presente invención es un aminoácido, que puede incluir uno de los siguientes: cualquier aminoácido ácido (p.ej., ácido glutámico, ácido aspártico) o un aminoácido seleccionado de arginina y glicocola. Más preferiblemente, el agente estabilizante de aminoácido es arginina que se incorpora en su forma ácida (arginina-HCl) en disoluciones de pH 5,0. Un aminoácido ácido preferido es ácido L-glutámico. Sin querer ceñirse a ninguna teoría, el hecho de que se prefieran los excipientes poliónicos es probablemente porque arginina y lisina (con 3 grupos cargados) estabilizan interferón mejor que glicocola (con 2 grupos cargados), la que a su vez estabiliza mejor que cualquiera de las especies sin carga ensayadas.

Si el excipiente es arginina-HCl, su concentración oscilará entre 0,5% (p/v) a 5%, y es más preferiblemente 3,13% (equivalente a arginina-HCl 150 mM). Si el excipiente es glicocola, su concentración oscilará entre 0,50% (p/v) a 2,0%, y es más preferiblemente 0,52% (equivalente a 66,7 mM a 266,4 mM, y más preferiblemente 70 mM). Si el excipiente es ácido glutámico, su concentración oscilará entre 100 mM a 200 mM, y es más preferiblemente 170 mM (equivalente a un porcentaje p/v que oscila de 1,47% a 2,94%, y es más preferiblemente 2,5%).

Se analizaron diferentes excipientes como agente estabilizante para formulaciones líquidas de interferón beta, usando el sistema tampón de pH de acetato sódico 50 mM y ácido acético glacial en combinación con cloruro sódico 100 mM, pH 5,0. Las muestras líquidas de interferón se someten a esfuerzo térmico mediante incubación a 37 grados C durante alrededor de 1 a 3 semanas o se colocan en un agitador rotatorio durante 1 a 3 días para someterlas a esfuerzo mecánico. A las muestras tratadas se les evalúa la estabilidad de interferón beta mediante los métodos descritos en el Ejemplo 1. Como se describe con más detalle en el Ejemplo 7, las formulaciones que se tamponaron a pH 5,0 con acetato sódico que contiene un excipiente de aminoácido (y que contiene opcionalmente cloruro sódico) muestran la mejor estabilidad.

### 2. *El interferón*

El interferón preferido es interferón beta de fibroblastos, más preferiblemente en forma de interferón beta humano recombinante producido a partir de células mamíferas. El interferón beta humano recombinante puede contener un sulfhidrilo libre y al menos un enlace disulfuro. Una molécula particularmente preferida contiene un sulfhidrilo libre en posición 17 y un enlace disulfuro entre las posiciones 31 y 141 por molécula. Como se sabe que es el caso con IFN beta humano natural, es de esperar una N-glicosilación en Asn-80. El intervalo de concentración en las formulaciones líquidas de la invención es de alrededor de 30 ug/ml a alrededor de 250 ug/ml. Un intervalo de concentración preferido es 48 a 78 ug/ml, y la concentración más preferida es de alrededor de 60 ug/ml. Por lo que se refiere a los valores estándar internacionales, el patrón interno de Biogen se ha estandarizado con el patrón internacional de la OMS para interferón, Natural #Gb-23-902-531, de forma que el intervalo de concentración en UI (para un volumen de inyección de 0,5 ml) es de alrededor de 6 MUI a 50 MUI, y la concentración más preferida es 12 MUI.

### 3. *El tampón*

Los tampones de ácido orgánico y fosfato para ser usados en la presente invención para mantener el pH en el intervalo de alrededor de 4,0 a 7,2, y preferiblemente de alrededor de 4,5 a alrededor de 5,5, y más preferiblemente 5,0, pueden ser tampones convencionales de ácidos orgánicos y su sales, tales como tampones citrato (p.ej., mezcla citrato monosódico-citrato disódico, mezcla ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla ácido cítrico-citrato monosódico, etc.), tampones succinato (p.ej., mezcla ácido succínico-succinato monosódico, mezcla ácido succínico-hidróxido sódico, mezcla ácido succínico-succinato disódico, etc.), tampones tartrato (p.ej., mezcla ácido tartárico-tartrato sódico, mezcla ácido tartárico-tartrato potásico, mezcla ácido tartárico-hidróxido sódico, etc.), tampones fumarato (p.ej., mezcla ácido fumárico-fumarato monosódico, mezcla ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla fumarato monosódico-fumarato disódico, etc.), tampones gluconato (p.ej., ácido glucónico-gluconato sódico, mezcla ácido glucónico-hidróxido sódico, mezcla ácido glucónico-gluconato potásico, etc.), tampones oxalato (p.ej., mezcla ácido oxálico-oxalato sódico, mezcla ácido oxálico-hidróxido sódico, mezcla ácido oxálico-oxalato potásico, etc.), tampones lactato (p.ej., mezcla ácido láctico-lactato sódico, mezcla ácido láctico-hidróxido sódico, mezcla ácido láctico-lactato potásico, etc.), tampones fosfato (fosfato sódico monobásico/fosfato sódico dibásico) y tampones acetato (p.ej., mezcla ácido acético-acetato sódico, mezcla ácido acético-hidróxido sódico, etc.).

En los ejemplos descritos más adelante, se usan diferentes concentraciones de tampón y diferentes pHs de fosfato sódico, citrato sódico, succinato sódico, carbonato sódico y acetato sódico para evaluar el tampón más adecuado. Las muestras de interferón beta se colocan a 37 grados C durante 6 días a 2 semanas, o se colocan en un agitador rotatorio

## ES 2 224 290 T3

durante 7 a 9 horas para acelerar los procesos degradativos. Después se determinan las propiedades químicas de las muestras. Se analizan las muestras mediante densidad óptica, cartografía de péptidos, HPLC de exclusión por tamaño, SDS-PAGE reductora y no reductora/transferencias de Western, e isoelectroenfoque/transferencias de Western (IEF), todo ello descrito más adelante en el Ejemplo 1. Todas las muestras de interferón beta experimentales se comparan con el material de partida de interferón beta o con muestras de interferón beta colocadas entre 2 y 8 grados C. Los datos indican que el pH es el factor principal que determina la estabilidad de las muestras de interferón beta, y que las muestras entre pHs de 4,0 y 5,0 son más estables que las de pH 7,0 o más. Véase el Ejemplo 2. Sin embargo, se pudieron desarrollar varias formulaciones de interferón beta a pH fisiológico (pH 7,2). Véase el Ejemplo 6.

### 4. Cavitación

La mayoría de los residuos sulfhidrilo libres de interferón beta sufren oxidación a pH alto (pH > 8,0), el pH al cual los enlaces disulfuro sufren reordenamientos. Se ha detectado cierta agregación de interferón beta en el intermedio bruto mediante cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE no reductora y dispersión de luz láser. Se ha descubierto posteriormente que la formación de interferón beta agregado puede ser dependiente del nivel de oxígeno disuelto. Los criterios de proceso que se han desarrollado para asegurar que las formulaciones líquidas de interferón beta no sufren cavitación incluyen: (a) si es posible, no debería haber presente una interfase gas que contiene oxígeno/líquido durante la preparación y el almacenamiento; y/o (b) no se deberían formar burbujas durante la preparación y el almacenamiento; y/o (c) los niveles de oxígeno disuelto en la formulación deberían mantenerse por debajo del 10% del equilibrio atmosférico a la temperatura de preparación y almacenamiento. Véase el Ejemplo 3.

### 5. Adsorción de interferón en superficies

También se ha determinado que el interferón se adsorberá en ciertas superficies, y su almacenamiento en un recipiente de vidrio requiere que al menos una superficie del recipiente en contacto con el interferón se revista o se cubra de otra manera con un material que evitará o eliminará sustancialmente la adsorción. Esta superficie puede ser química o físicamente inerte a la adsorción. Los materiales ejemplares para este propósito son conocidos para aquellos de experiencia habitual en la técnica, y pueden incluir, por ejemplo, silicona pulverizada o calentada, polipropileno o politetrafluoroetileno (PTFE). Se tomaron las formulaciones líquidas preferidas de 60 ug/ml (BG9589-1, 2, 3 y 4; resumidas en la Tabla 1, más adelante) y se colocaron en jeringas de vidrio de tipo I de 1 ml de largo revestidas con silicona pulverizada (Becton Dickinson) y en viales de vidrio de tipo I de 0,75 ml. Las muestras se analizaron después mediante HPLC de fase inversa (rpHPLC) para determinar la concentración de proteína. Los datos indican que hubo menos proteína en disolución en las muestras que se colocaron en los viales de vidrio comparado con las jeringas precargadas revestidas con silicona. Véase el Ejemplo 5.

### 6. Formulaciones preferidas

Se realizaron análisis cinéticos de estabilidad de proteínas usando las cuatro formulaciones líquidas cuyas concentraciones finales se muestran más adelante en la Tabla 1, cada una conteniendo 60 ug/ml de interferón beta. Las formulaciones alternativas, algunas conteniendo tensoactivos tales como Pluronic F-68 (fabricado por BASF) se dan en la Tabla 2.

TABLA 1

*Formulaciones preferidas*

SISTEMA DE pH	EXCIPIENTE	pH FINAL
acetato 20 mM	arginina-HCl 150 mM	5,0 ("BG9589-1")
acetato 20 mM	glicocola 70 mM cloruro sódico 100 mM	5,0 ("BG9589-2")
fosfato 20 mM	arginina-HCl 140 mM	7,2 ("BG9589-3")
fosfato 20 mM	glicocola 70 mM cloruro sódico 100 mM	7,2 ("BG9589-4")

Todos los componentes de las formulaciones son materiales de grado USP. Las composiciones detalladas son:

## ES 2 224 290 T3

### BG9589-1

Ingrediente (como materias primas)	Cantidad
5 Arginina-HCl, USP	15,8 mg
Acido acético glacial, USP	0,167 mg
Acetato sódico trihidrato, USP	0,972 mg
Interferón beta	30 ug
10 Agua para inyección, USP	0,5 ml

### BG9589-2

Ingrediente (como materias primas)	Cantidad
15 Glicocola, USP	2,628 mg
Acido acético glacial, USP	0,185 mg
Acetato sódico trihidrato, USP	0,932 mg
20 Interferón beta-1a	30 ug
Agua para inyección, USP	0,5 ml
Cloruro sódico	2,922 mg

### BG9589-3

Ingrediente (como materias primas)	Cantidad
25 Arginina-HCl, USP	14,725 mg
Fosfato sódico dibásico-7H <sub>2</sub> O	2,332 mg
30 Fosfato sódico monobásico-1H <sub>2</sub> O	0,359 mg
Interferón beta-1a	30 ug
Agua para inyección, USP	0,5 ml

### 35 BG9589-4

Ingrediente (como materias primas)	Cantidad
40 Fosfato sódico dibásico-7H <sub>2</sub> O	1,984 mg
Fosfato sódico monobásico-1H <sub>2</sub> O	0,359 mg
Interferón beta-1a	30 ug
Glicocola	2,628 mg
Cloruro sódico	2,922 mg
45 Agua para inyección, USP	0,5 ml

50 (Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

TABLA 2

*Formulaciones alternativas*

SISTEMA DE pH	EXCIPIENTE	pH FINAL
acetato 20 mM	arginina-HCl 150 mM y albúmina de suero humano 15 mg/ml	5,0
acetato 20 mM	arginina-HCl 150 mM y 0,1% Pluronic F-68	5,0
acetato 20 mM	cloruro sódico 140 mM	5,0
acetato 20 mM	albúmina de suero humano 15 mg/ml cloruro sódico 140 mM	5,0
acetato 20 mM	0,1% Pluronic F-68 cloruro sódico 140 mM	5,0
ácido L-glutámico 170 mM, hidróxido sódico 150 mM	albúmina de suero humano 15 mg/ml	5,0
ácido L-glutámico 170 mM, hidróxido sódico 150 mM	0,1% Pluronic F-68	5,0

Se pueden incorporar otros materiales a las formulaciones de esta invención. Estos pueden incluir los siguientes conservantes, en los que todos los porcentajes preferidos están en p/v: fenol (alrededor del 0,2%); metilparabeno (0,08%); propilparabeno (0,008%); m-cresol (0,1%); clorobutanol (0,25%); alcohol bencílico (0,1%); y timerosal (0,1%). Basándose en los análisis para determinar la agregación y desamidación de proteínas (datos no presentados), los conservantes más preferidos son clorobutanol y alcohol bencílico.

#### 7. Equipos para administración parenteral

Las realizaciones preferidas de la invención incluyen un equipo envasado para la administración parenteral de las presentes formulaciones líquidas. El envase puede incluir jeringas precargadas con las formulaciones líquidas de la invención, varias gasas de algodón con alcohol, al menos una aguja, una o más vendas adhesivas e instrucciones de uso. También se apreciará que las presentes formulaciones líquidas de la invención se pueden usar con sistemas convencionales de inyección sin aguja.

#### E. Uso de interferones

Las formulaciones de interferón de esta invención tienen actividad antiviral. Véase el Ejemplo 7. Para uso clínico, la cantidad de interferón que se administra en cualquier caso particular, así como la frecuencia con la que se administra el interferón, depende de factores tales como el tipo de interferón usado, la enfermedad que se está tratando y la respuesta del paciente al tratamiento con interferón.

Un uso preferido de las composiciones líquidas de la invención es para el tratamiento de la esclerosis múltiple recidivante. Se han administrado formulaciones líquidas liofilizadas (es decir, reconstituidas) de interferón beta natural e interferón beta recombinante a pacientes que padecen esclerosis múltiple recidivante. Véase Jacobs *et al.*, *Annals of Neurology* 39: 285-294 (marzo de 1996) y las referencias citadas allí, y Jacobs y Munschauer, "Treatment of multiple sclerosis with interferons" (págs. 223-250) en *Treatment of multiple sclerosis: trial design, results and future perspectives*, (R.A. Rudnick *et al.*, eds), Londres: Springer, 1992. El uso de las formulaciones líquidas descritas aquí para tratar la esclerosis múltiple sigue los mismos protocolos, y mide las mismas variables de respuesta primaria que se describen en el artículo de Jacobs *et al.* anterior.

Una forma de evaluar la utilidad de las presentes formulaciones líquidas es realizar un estudio toxicológico y evaluar la irritación tisular asociada a la administración de la formulación líquida. Se ha realizado un estudio toxicológico de las presentes formulaciones líquidas en conejos. Véase el Ejemplo 8.

## ES 2 224 290 T3

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar las realizaciones de la invención, pero no se deberían considerar limitantes del alcance de la invención.

### Ejemplo 1

#### Métodos de ensayo

Se usan varios métodos bien caracterizados para determinar las propiedades fisicoquímicas de interferón beta en las formulaciones líquidas, y estos métodos se pueden usar también para monitorizar las propiedades de otros interferones.

La presencia/ausencia de agregado insoluble se monitoriza midiendo la absorbancia a 320 nm y la transmitancia a 580 nm. La concentración de proteína soluble se determina mediante la medida de la absorbancia a 278-280 nm (con un coeficiente de extinción de 1,5) o mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de fase inversa usando concentraciones conocidas de interferón beta añadidas en el tampón de la formulación como patrones. Las muestras de la formulación líquida se centrifugan antes del ensayo. El porcentaje de agregado soluble se determina separando los agregados del monómero de interferón beta mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna TSK-Gel® G2000SWXL (Toso Haas, Montgomeryville, PA). Las áreas de los picos monitorizados a 280 nm se usan para calcular el porcentaje de agregado soluble.

La estabilidad de la cadena peptídica se confirma mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). El interferón beta se reduce con mercaptoetanol en presencia de dodecil sulfato sódico antes de someterlo a electroforesis en un gel en gradiente 10-20% (MiniPlus Sepragel®, Integrated Separation Systems, Natick, MA). Las proteínas se transfieren después electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa y se revelan mediante inmunodetección usando anticuerpo anti-interferón beta y anticuerpo anti-ratón de cabra acoplado a peroxidasa de rábano. Véase, por ejemplo, *Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach*, 2ª edición, B.D. Hames y D. Rickwood, IRL Press.

El cambio en la carga superficial neta, causado por la desamidación y otros cambios químicos, se monitoriza mediante isoelectroenfoque en un gel de poliacrilamida (IEF 3-10 MiniPlus Sepragel®, Integrated Separation Systems). Véase, *Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach*, ídem.

La oxidación de metionina, desamidación de asparagina y otros cambios químicos posibles también se monitorizan mediante cartografía de péptidos. Se digiere interferón beta con Endoproteinasa Lys-C (Wako Pure Chemicals) en presencia de ditioneitol, y los fragmentos peptídicos resultantes se separan mediante HPLC de fase inversa. Véase de forma general, Kalgahgti, K., & Horvath, C. "Rapid Peptide Mapping by High Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatography* **443**, 343-354 (1988).

El perfil de oligosacáridos unidos a N se determina usando un sistema Fluorophore-Assisted-Carbohydrate-Electrophoresis (FACE®) de Glyko, Inc. (Novato, CA). Los oligosacáridos unidos a asparagina (unidos en N) se liberan de la glicoproteína usando la enzima Péptido N-glicosidasa F, después se marcan con un fluoróforo en los extremos reductores mediante aminación reductora, se separan y después se cuantifican en un gel de poliacrilamida.

La actividad antiviral de los interferones se determina mediante una serie de métodos tales como los descritos más detalladamente en: W.E. Stewart II, *The Interferon System*, Springer-Verlag (2ª ed. 1981). El ensayo de inhibición del efecto citopático (CPE) es particularmente útil para determinar la actividad antiviral de interferón. El método preferido se describe en WHO Technical Report Series nº 725, anexo 1, (1985), incorporado aquí como referencia. Brevemente, este método de CPE se inicia preparando una reserva de trabajo de patrón de interferón beta que se ha calibrado previamente respecto de un patrón de referencia de la OMS. Esta reserva se prepara en medio D-MEM+ que contiene un 10% de suero bovino fetal y L-glutamina 4 mM a una concentración de 10.000 unidades (U) por ml. El día del ensayo, el patrón, el control y las muestras se diluyen en D-MEM+ en tres series de dilución separadas: a) se empieza a 32 U/ml y a continuación se diluye 2 veces; b) se empieza a 12 U/ml y a continuación se diluye 1,5 veces; y c) se empieza a 6 U/ml y a continuación se diluye 1,2 veces. Se añaden 50 microlitros de las diluciones por columnas a los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos, una placa por cada serie de diluciones. A continuación, se añaden células A549 (número de catálogo ATCC CCL-185, Rockville, MD) en D-MEM+ a cada pocillo a  $5 \times 10^5$  células/ml, 50 microlitros por pocillo, efectuando una dilución de un medio tanto de las células como de interferón beta. Se incuban las células y el interferón a 37 grados C en un 5% de dióxido de carbono durante 15 a 20 horas. Se agita el contenido de las placas en un cubo de lejía, y se añaden 100 microlitros de virus de EMC (encefalomiocarditis) a una dilución apropiada en medio a cada pocillo. El virus y las células se incuban a 37 grados C y 5% de dióxido de carbono durante 30 horas. El contenido de las placas se agita en un cubo de lejía, y se añade un 0,75% de colorante violeta cristal a las placas. Tras 5 a 10 minutos, se lavan las placas con agua destilada y se dejan secar. Cada placa de ensayo incluye pocillos de control de crecimiento celular que no contienen ni interferón ni EMC, pocillos de control de virus que contienen EMC y células pero no interferón, y una serie de diluciones de patrón de interferón. Las placas se examinan visualmente para determinar el último pocillo de cada columna con células viables (>25% de tinción púrpura confluyente). El límite de detección se determina como la concentración más baja de patrón que protege de la citotoxicidad del virus. La dilución de la muestra en el último pocillo positivo se multiplica por el límite de detección determinado para el patrón y el factor de dilución de la muestra, para obtener la actividad de interferón (MU/ml) de la muestra. Los resultados de cada placa se transforman en unidades logarítmicas para la determinación de la media geométrica y el cálculo de los intervalos de confianza del 95%.

## ES 2 224 290 T3

### Ejemplo 2

#### *Elección del sistema tampón*

5 Se prepararon tres grupos de tampones que contienen entre nueve y diez componentes diferentes para cada grupo. El grupo I contiene una serie de disoluciones de fosfato sódico y/o cloruro sódico 100 mM entre pH 4,0 y 7,2. El grupo II contiene una serie adicional de tampones de citrato sódico entre pH 4,0 y 7,0. El grupo III contiene una serie de disoluciones tampón de succinato sódico, acetato sódico y carbonato sódico, combinadas todas con cloruro sódico 100 mM, que tienen valores de pH que oscilan de 4,0 a 7,2. Otras dos disoluciones sustituyeron el cloruro sódico con sulfato sódico 50 mM a un pH de 4,0 y 7,2.

15 El interferón beta descongelado bruto se dializa en diferentes tampones durante la noche a 2-8 grados C con al menos dos cambios de tampón, después se filtra de forma estéril antes del uso. Las concentraciones de proteína se determinan mediante absorbancia a 278 nm (con un coeficiente de extinción de  $1,5 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), y todas las muestras contenían 140  $\mu\text{g/ml}$  ó 150  $\mu\text{g/ml}$  de interferón beta. Las muestras se filtran y se dividen en cuatro grupos llenando parcialmente tubos eppendorf de 2,2 ml. Un grupo se coloca a 2-8 grados C; un grupo se coloca a 37 grados C durante 6 días a dos semanas; otro grupo se coloca en un agitador rotatorio durante 7 a 9 horas; y el grupo final se usa como el control de tiempo cero. El porcentaje de pérdida de proteína debido a agregados insolubles se calcula mediante la pérdida de concentración de proteína durante los diversos tratamientos dividido por la concentración inicial.

#### *Resultados*

25 El porcentaje de pérdida de proteína por agregados insolubles se calcula como la pérdida de concentración de proteína dividida por la concentración de proteína inicial. Un análisis estadístico de todos los datos indica que las muestras de interferón en los tampones de pH 4,0 y 5,0 tuvieron un porcentaje inferior de pérdida de proteína debido a agregación comparado con las de pH superior. Las muestras de interferón incubadas a 37 grados C y pH 4,0 y 5,0 perdieron entre alrededor del 10% y 15% debido a la agregación. A valores de pH mayores de 6,0, las pérdidas se incrementaron hasta un 40-50%. También se determinó que las muestras de interferón tienen más agregados solubles a valores de pH mayores de 6,0. Además, se ha determinado mediante cartografía de péptidos que al incrementarse el pH de 4,0 a 7,2 hay un incremento sustancialmente lineal en la cantidad de interferón que se desamida; a pH 7,0 y superior, más del 85% de interferón se desamida durante el estudio. Se midió el punto isoeléctrico (pI) de las especies proteicas de la muestra (es decir, el pH al cual la proteína no migra en un campo eléctrico, y la carga media de la proteína es cero) con IEF/transferencias de Western, y las transferencias muestran bandas de pI extras de las muestras en citrato sódico y un desplazamiento de la intensidad de las bandas en succinato sódico. El fosfato no tiene capacidad tamponadora a pH 5,0. Acetato sódico con cloruro sódico a pH 5,0 no mostró cambios en el patrón o intensidad de las bandas.

### Ejemplo 3

#### *El efecto de la cavitación*

45 Durante los experimentos de cribado de pH descritos en el Ejemplo 2, se descubrió que el espacio de cabeza de los tubos de almacenamiento parece ser crítico para la pérdida de proteína de algunas de las muestras. Con 1,5 ml de muestra en tubos de 2,2 ml de volumen, no se observó pérdida de proteína. Al contrario, 1,2 ml de muestra produjo un incremento significativo de agregados. Esto está de acuerdo con las observaciones de que la formación de interferón beta agregado durante la etapa de inactivación viral del proceso de purificación depende del nivel de oxígeno disuelto durante esta etapa.

50 En resumen, la etapa de inactivación viral implica ajustar el pH del eluato de Sepharose quelante (véase la Sección C) de 7,85  $\pm$  0,25 a entre 2,5 y 3,5 con ácido fosfórico del 15%, mantener el eluato acidificado durante 120-135 minutos, y después reajustar el pH a 6,7  $\pm$  0,7 con hidróxido sódico 0,5 N. Todas las etapas se realizan a 2-8 grados C. Se diseñó un estudio para determinar si existe relación entre la formación de agregados de interferón beta en esta etapa y la cantidad de oxígeno disuelto.

#### *Materiales y métodos*

60 El eluato de la columna de Sepharose quelante se divide en alícuotas de 50 ml ó 100 ml y se coloca en frascos con agitador de 100 ml. A cada frasco se le añade 1 ml de ácido fosfórico del 15% purgado con argón. Después se agita el frasco suavemente durante alrededor de 2 minutos, y se mantiene sin agitación durante alrededor de 2 horas a 2-8 grados C. Después de este periodo de reposo, se añaden 6,5 ml de hidróxido sódico purgado con argón, y se somete a la muestra a cromatografía de exclusión por tamaño a diversos tiempos. El oxígeno disuelto en el líquido se mide continuamente con una sonda de oxígeno (Orion, Model 860) y se registra en el momento de la adición de la base. Para las muestras con niveles de oxígeno disuelto iguales o menores del 10%, se introduce gas argón en el espacio de cabeza del recipiente de reacción.

## ES 2 224 290 T3

### Resultados

Los datos se presentan en la Figura 1, que revela una relación clara entre la cantidad de oxígeno disuelto presente en el momento de la adición de hidróxido sódico y el rendimiento de monómero de interferón beta en la etapa de inactivación de virus. Los valores de rendimiento obtenidos a concentraciones de oxígeno disuelto menores o iguales al 10% son significativamente diferentes de todos los otros rendimientos a otras concentraciones de oxígeno. También se caracterizó el agregado (datos no presentados aquí) y se determinó que su actividad específica se reduce alrededor de 30-40 veces respecto del intermedio bruto. También se determinó que más de alrededor del 90% del agregado es resistente a la desnaturalización con SDS en condiciones no reductoras, lo que sugiere un entrecruzamiento covalente. En condiciones reductoras (2% de  $\beta$ -mercaptoetanol) el agregado vuelve al monómero, lo que sugiere un entrecruzamiento que implica enlaces disulfuro.

### Ejemplo 4

#### 15 Elección de excipiente

Se prepara una serie de formulaciones de interferón beta (60 ug/ml) que contienen diferentes excipientes en un tampón preferido de pH 5,0, que contiene acetato sódico 50 mM y cloruro sódico 100 mM. Los excipientes incluyen glicocola, arginina-HCl, lisina-HCl, sacarosa, glicerina, PEG3350, glutatión y Pluronic F-68. El intermedio bruto de interferón beta se dializa en acetato sódico 50 mM y cloruro sódico 100 mM, pH 5,0 durante la noche a 2-8 grados C con al menos dos cambios de tampón, y después se filtra antes del uso. Las concentraciones de interferón beta se determinan mediante la absorbancia a 278 nm restando el fondo. Todas las muestras se diluyen hasta concentraciones finales de interferón de alrededor de 60 ug/ml. Todas las muestras preparadas se filtran, se transfieren dos mililitros a viales de vidrio de 4 ml (no siliconado), el espacio de cabeza se purga con argón y los viales se sellan. Los grupos de muestras se colocan a 2-8 grados C y 37 grados C durante períodos de hasta dos semanas. Otras muestras se someten a esfuerzo mecánico haciéndolas rotar a temperatura ambiente durante 3 días.

Las muestras se analizan según los procedimientos del Ejemplo 1. Además, se mide el porcentaje de oxígeno disuelto en las formulaciones mediante un analizador de gases sanguíneos Ciba-Corning Model 248. El valor "experimental" es la presión parcial de oxígeno (mm Hg) de las muestras menos la del blanco de tampón purgado con nitrógeno, y el valor "control" es la presión parcial de oxígeno en el blanco de tampón almacenado a temperatura ambiente menos la presión parcial de oxígeno del blanco de tampón purgado con nitrógeno. El porcentaje de oxígeno disuelto ("experimental"/"control") es siempre menor del 30%.

### 35 Resultados

Los IEF/transferencias de Western y SDS-PAGE/transferencias de Western de las muestras incubadas a 37 grados C durante dos semanas indican desplazamiento de bandas y pérdida de intensidad, así como la presencia de múltiplos de interferón en las muestras que contienen PEG3350 y glutatión. Tras una semana adicional a 37 grados C, el excipiente de glicerina muestra una banda extra en las transferencias. El excipiente de sacarosa muestra pérdida de intensidad de las bandas. Este procedimiento de cribado inicial permitió considerar con más detalle arginina-HCl, glicocola, cloruro sódico y manitol para estudios adicionales.

### Ejemplo 5

#### 45 Adsorción de interferón

Se dializa interferón beta bruto descongelado en BG9589-1, 2, 3 y 4 (véase la Tabla 1) durante la noche a 2-8°C con al menos dos cambios de tampón, y después se filtra antes del uso. Las concentraciones de proteína se determinan mediante absorbancia a 280 nm (con un coeficiente de extinción de  $1,5 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Todas las muestras se diluyen a concentraciones finales de aproximadamente 60 ug/ml. Las muestras diluidas se filtran y se colocan 0,5 ml en jeringas BD (vidrio de tipo I) de silicona pulverizada de 1,0 ml de longitud triplicadas con espacio de cabeza purgado con nitrógeno, ó 0,75 ml en viales de vidrio de tipo I de 0,75 ml con espacio de cabeza purgado con argón. Las concentraciones de proteína se determinan mediante HPLC de fase inversa (Ejemplo 1).

### 55 Resultados

La Tabla 3, más adelante, enumera las concentraciones de proteína que se determinaron mediante HPLC de fase inversa. Los datos indican que hay menos proteína en las muestras que se colocaron en los viales de vidrio comparado con las jeringas precargadas revestidas de silicona. Así, las jeringas revestidas de silicona se usan para la formulación líquida de interferón beta.

65

## ES 2 224 290 T3

TABLA 3

	Vial de vidrio (ug/ml) (D.E.)	Jeringas revestidas con silicona (ug/ml) (D.E.)	
5	BG9589-1	59,3 (2,6)	63,3 (2,5)
	BG9589-2	58,3 (0,7)	61,7 (0,1)
10	BG9589-3	56,4 (0,4)	58,8 (1,1)
	BG9589-4	55,5 (0,7)	59,3 (0,5)

### 15 Ejemplo 6

#### *Formulaciones a pH fisiológico*

20 Fuerza iónica/fosfato. Se llevaron a cabo estudios iniciales en sistemas tampón de fosfato/cloruro sódico de pH 7,2 con concentraciones variables de los componentes del tampón, en los que la concentración de fosfato varió entre 10, 50 y 75 mM con una fuerza iónica (definida por  $I = \sum c_i z_i^2$ , en la que  $c_i$  y  $z_i$  son la concentración molar y la carga de valencia de la especie iónica I, respectivamente) de 0,2, 0,4 y 0,6, ajustada mediante la adición de cloruro sódico.

25 Se usó un diseño factorial completo con las variables de la concentración de fosfato (10, 50 y 75 mM) y la fuerza iónica ( $I=0,2, 0,4$  y  $0,6$ ). Las composiciones de fosfato sódico monobásico, fosfato sódico dibásico y cloruro sódico (para alcanzar la fuerza iónica deseada) en los tampones se calculan usando una hoja de cálculo adaptada de Ellis y Morrison, "Buffers of Constant Ionic Strength for Studying pH-dependent Processes", *Methods Enzymol.* 87: 405-426 (1982). Las ecuaciones permitieron la determinación de las cantidades necesarias de cada componente del tampón para el pH especificado, la concentración de fosfato y la fuerza iónica. Cada una de las nueve disoluciones usadas en el experimento factorial se obtiene mediante intercambio de tampón de intermedio bruto de interferón beta a través de columnas desalinizadoras Pharmacia PD-10. Los pHs de todas las disoluciones resultantes están en  $7,20 \pm 0,15$ . Las concentraciones se analizan mediante absorbancia a 280 nm y después se diluyen a 150 ug/ml de interferón beta con el tampón apropiado. Las disoluciones resultantes se filtran de forma estéril en argón a través de filtros de 0,22 micras, y se alicuotan 1,3 ml en viales de vidrio de 5 ml con un espacio de cabeza de argón. Las muestras se incuban a 37 grados C durante 6 días y se procesan por triplicado. Las muestras se analizan mediante el porcentaje de transmitancia a 580 nm, porcentaje de recuperación de proteína e IEF-PAGE/transferencias de Western.

#### *Resultados*

40 El análisis del porcentaje de transmitancia con respecto a fuerza iónica variable muestra una tendencia hacia una transmitancia creciente (es decir, cantidades decrecientes de agregados proteicos insolubles) con la fuerza iónica creciente. Los datos de porcentajes de recuperación de proteínas muestran una tendencia similar, aunque los IEF-PAGE/transferencias de Western no muestran tendencia a la desamidación con la fuerza iónica variable, de forma que todas las muestras están igualmente desamidadas. Así, tras almacenamiento durante seis días a 37°C, las muestras tendieron a mostrar menos agregación con la concentración de fosfato decreciente y la fuerza iónica creciente. Los resultados de los experimentos sobre el porcentaje de transmitancia y el porcentaje de recuperación en función de la concentración variable de fosfato (no presentados aquí) muestran una tendencia débil hacia un % decreciente de transmitancia con la concentración creciente de fosfato, pero un análisis de la varianza no muestra una diferencia significativa para las muestras con diferentes concentraciones de fosfato. Los datos de porcentaje de recuperación muestran una recuperación de proteína mejorada para las concentraciones de fosfato inferiores (una diferencia significativa en el nivel de confianza del 94%). Los IEF-PAGE/transferencias de Western no muestran tendencias perceptibles en la desamidación con concentraciones variables de fosfato.

55 Proporción excipiente/sal. Los estudios preliminares (no mostrados) indican que algunos excipientes pueden necesitar sales (p.ej., cloruro sódico) para mantener una fuerza iónica elevada y para exhibir un efecto estabilizante a pH 7,2. Se diseñó un estudio factorial usando excipientes (glicocola, lisina, arginina, sacarosa y manitol) y fracción de cloruro sódico que contribuye a la isotonicidad ( $f_{sal} = 0, 0,25, 0,75$  y  $1,0$ ). La fracción se calcula mediante:  $f_{sal} = O_{sal} / (O_{sal} + O_{excipiente})$ , en el que  $O_{sal}$  y  $O_{excipiente}$  son las osmolalidades en mOsm/kg de cloruro sódico y excipiente, respectivamente, en la disolución. La fracción de sal proporciona un medio para comparar los efectos de las sales entre los diferentes excipientes. Todas las muestras contenían aditivos hasta isotonicidad, con proporciones variables de excipiente:sal (como se definió mediante  $f_{sal}$ ).

65 Se preparan, desgasifican y se purgan con argón disoluciones reserva del diez por ciento (p/v) de cada excipiente en fosfato 20 mM, pH 7,2. Se prepara, desgasifica y se purga con argón una disolución reserva de cloruro sódico 250 mM, fosfato 20 mM, pH 7,2. El intermedio de interferón beta bruto se dializa de forma extensiva con tampón fosfato 20 mM, pH 7,2 purgado con argón. La concentración de interferón beta se analiza en la disolución resultante mediante absorbancia a 280 nm, y se diluye con tampón fosfato y las disoluciones reserva respectivas de excipiente y sal para alcanzar 60 ug/ml de interferón beta y las condiciones de sal y excipiente finales deseadas. Las muestras resultantes

## ES 2 224 290 T3

se esterilizan mediante filtración (0,22 micras) y se colocan en jeringas de vidrio de tipo I de Becton Dickinson de silicona pulverizada de 1,0 ml (volumen de llenado 0,5 ml) con un espacio de cabeza de nitrógeno. Las muestras se almacenan a 40 grados C.

- 5 A los 6 días, se analizan muestras de arginina, glicocola y sacarosa mediante absorbancia a 320 y 280 nm, ambas antes y después de filtración a través de filtros de 0,22 micras. A las 2 semanas, se analizan de forma similar arginina, lisina y manitol, junto con IEF-PAGE, SDS-PAGE reductora y SDS-PAGE no reductora. Las muestras de control se almacenaron entre 2 y 8 grados C y se analizaron de forma similar.

### 10 *Resultados*

La recuperación de interferón beta-1a (como porcentaje del control) aumenta con  $f_{\text{sal}}$  creciente para sacarosa y manitol, alcanzando una recuperación máxima a  $f_{\text{sal}}=1$  (cloruro sódico 130 mM). Para arginina y lisina, la recuperación disminuye con  $f_{\text{sal}}$  crecientes. La recuperación máxima para las formulaciones de glicocola a pH 7,2 se alcanza a  
15 alrededor de  $f_{\text{sal}}=0,75$ .

Este estudio de cribado de excipientes, que usa un tampón fosfato de pH 7,2 con diversos excipientes tales como glicocola, lisina, arginina, manitol y sacarosa añadidos hasta isotonicidad, mostró una recuperación pobre para todos los excipientes sin carga. El grado de desamidación no se vio afectado por estos aditivos. Por ejemplo, la SDS/PAGE reductora y no reductora indica la pérdida de especies de interferón beta no glicosilado en todas las formulaciones, y bandas de multímeros más pesados para cloruro sódico sólo y manitol isotónicos. En suma, hay así una fuerte correlación entre el carácter iónico del excipiente y su capacidad para estabilizar interferón beta contra la agregación en estos sistemas tampón a pH fisiológico. Los aditivos no iónicos tales como sacarosa y manitol parecen no ofrecer protección, o pueden realmente promover la pérdida de proteína a pH fisiológico. El cloruro sódico, con una única carga por especie soluble, funciona mejor que manitol o sacarosa. Los aminoácidos contienen dos cargas por molécula a pH fisiológico. En el caso de glicocola, la naturaleza dipolar de la molécula por sí misma no parece ser suficiente para estabilizar interferón beta. Arginina y lisina, cada una conteniendo tres cargas por molécula, estabilizan interferón beta mejor que las formulaciones de cloruro sódico sólo o glicocola/cloruro sódico.

### 30 Ejemplo 7

#### *Estabilidad y estudios cinéticos*

Las formulaciones se cargan de forma aséptica en una atmósfera inerte, las jeringas se incuban en un intervalo de temperaturas durante períodos de tiempo variables y se analiza el contenido de las jeringas. Brevemente, el interferón beta bruto descongelado se dializa con BG9589-1, -2, -3 y -4 durante la noche a 2-8 grados C con al menos dos cambios de tampón. Las concentraciones de proteína se determinan mediante absorbancia a 280 nm con un coeficiente de extinción de 1,5 ml/mg/cm. Todas las muestras se diluyen a una concentración final de interferón beta-1a de alrededor de 60 ug/ml. Las cuatro formulaciones de interferón beta-1a de la Tabla 1 se filtran, y se dispensan 0,5 ml en jeringas Becton Dickinson (BD) de 1,0 ml de largo cuyas superficies interiores estaban revestidas con silicona calentada o con silicona pulverizada. Las muestras se analizaron mediante DO, HPLC de exclusión por tamaño (SEC), electroforesis en gel de isoelectroenfoque (IEF)/transferencia de Western, electroforesis reductora en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)/transferencia de Western, cartografía de péptidos, electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos (FACE) y bioensayo CPE. El espacio de cabeza de la jeringa es gas nitrógeno. Las jeringas se incuban a 2-8 grados C, 25 grados C, 33 grados C y 40 grados C durante hasta noventa días. Las muestras se analizan según los métodos del Ejemplo 1.

#### *Resultados*

Se analizaron las concentraciones de proteína de las muestras, se normalizaron frente a las del material de partida para períodos de hasta noventa días a una diversidad de temperaturas. La Figura 2 ilustra que BG9589-1 mostró una estabilidad de proteína completa (sin pérdida de proteína) tras 3 meses de incubación a temperaturas que oscilan de 2-8 grados C (media de 4 grados C) hasta 25 grados C. A una temperatura de almacenamiento (33 grados C) que se aproxima a la temperatura corporal, se degradó alrededor del 18% de proteína. A una temperatura de almacenamiento (40 grados C) que excede la temperatura corporal, se degradó alrededor del treinta por ciento de proteína al cabo de 3 meses. Se obtuvieron resultados sustancialmente idénticos para BG9589-2 (no mostrados). La Figura 3 ilustra los resultados de los ensayos de almacenamiento de 2 meses para BG9589-3. La degradación de proteína fue mínima a 4 hasta 25 grados C, pero fue rápida a temperaturas superiores. Los resultados para BG9589-4 son sustancialmente idénticos a los de las figuras 2 y 3. Estos datos se confirmaron usando SDS-PAGE reductora/transferencias de Western.

En las jeringas “calentadas”, durante el periodo de este estudio no hay agregados solubles detectables. No se observan cambios significativos en la concentración de proteína, ensayo CPE, porcentaje de AP6 oxidado y perfiles de carbohidratos. No hay cambios observables en las muestras vistos mediante SDS-PAGE reductora/transferencia de Western e IEF/transferencia de Western. Hay cierto incremento en el porcentaje de desamidación comparado con el punto de inicio. Sin embargo, el intermedio bruto que se usó para cargar estas jeringas tiene un 37% de desamidación, que es mayor que el valor de 33,8% del material tras ser cargado en las jeringas. Este último valor bajo puede ser debido a la variabilidad de ensayo. En las jeringas “pulverizadas” durante el periodo de tiempo de este estudio tampoco hay agregados solubles detectables. No se observan cambios significativos en la concentración de proteína, ensayo CPE,

## ES 2 224 290 T3

porcentaje de desamidación, porcentaje de AP6 oxidado y perfiles de carbohidratos. No hay cambios observables en las muestras vistos mediante SDS- PAGE reductora/transferencia de Western e IEF/transferencia de Western. Brevemente, los resultados hasta ahora han mostrado que el producto final BG9589-1 es estable hasta 3 meses a 2-8 grados C en las jeringas de “silicona calentada”, y 6 meses a 2-8 grados C en las jeringas de “silicona pulverizada”.

Se realizó el ensayo CPE antiviral con las formulaciones BG9589-1 y BG9589-2 (véase la Tabla 1) tras cargar asépticamente las jeringas. Los valores de actividad informados para BG9589-1 y BG9589-2 son 12,0 MU/ml. El ensayo CPE antiviral se repitió tras el almacenamiento de las muestras durante hasta 3 meses a 2-8 grados C. Los valores de actividad informados para BG9589-1 son 11,6 MU/ml (n=8) con un intervalo de confianza del 95% de 10,2-13,3 MU/ml.

También se midió la estabilidad del material intermedio bruto de BG9589-1 a 2-8 grados C durante 5 meses, y -70 grados C durante 6 meses. Las muestras de BG9589-1 procedentes de estudios piloto de diafiltración se analizaron mediante los métodos del Ejemplo 1. Los resultados han mostrado hasta ahora que el material en proceso de BG9589-1 es estable a 2-8 grados C durante 5 meses, y a 70 grados C durante 6 meses.

Durante el periodo de este estudio particular, no hay agregados solubles detectables. No se observan cambios significativos para el porcentaje de desamidación y los perfiles de carbohidratos (las diferencias en el porcentaje de desamidación están dentro de la variabilidad del ensayo). No hay cambios observables en las muestras vistos mediante SDS-PAGE reductora/transferencia de Western e IEF/transferencia de Western. Hay una ligera disminución en la concentración de proteína. La disminución en la concentración de proteína para los -70 grados C puede ser debida a que la muestra se somete a un ciclo de congelación/descongelación. La disminución de la concentración de proteína está todavía dentro del 15% de la concentración inicial.

### Ejemplo 8

#### *Estudios preclínicos*

Se lleva a cabo un estudio de tolerancia local a dosis intramuscular (IM) única en conejos, que evalúa la toxicidad local de interferón cuando se administra en varias formulaciones nuevas. Las reacciones del lugar de inyección debidas a la administración de la presente formulación líquida o con formulaciones de interferón liofilizadas y reconstituídas son comparables a aquellas evidentes después de la administración de solución salina normal.

#### *1. Estudio de irritación/biodisponibilidad en conejos después de administración IM de dosis única de cuatro formulaciones de interferón beta*

Veinte conejos blancos de Nueva Zelanda machos recibieron una única inyección intramuscular (IM) de 30 ug de interferón beta-1a de una de las cinco formulaciones: BG9589-1 (pH 5,0, tampón acetato, estabilizante de arginina, 0,5 ml/dosis); BG9589-2 (pH 5,0, tampón acetato, estabilizante de glicocola/NaCl, 0,5 ml/dosis); BG9589-3 (pH 7,2, tampón fosfato, estabilizante de arginina, 0,5 ml/dosis); BG9589-4 (pH 7,2, tampón fosfato, estabilizante de glicocola/NaCl, 0,5 ml/dosis); y una formulación de interferón beta liofilizada a pH 7,2 que contiene un 1,5% de HSA, 1,0 ml/dosis (véase Jacobs *et al.*, anteriormente).

Cuatro animales recibieron cada tratamiento. Los animales que recibieron BG9589-1 o la formulación liofilizada también recibieron una inyección de volumen equivalente de solución salina normal en un lugar contralateral como control negativo. Se recogen las muestras de sangre durante las 72 horas después de la dosis para los análisis de actividad de interferón beta en suero. Se llevan a cabo evaluaciones dérmicas macroscópicas de eritema, formación de cicatrices y edema a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas tras la dosis. Después de la recogida de sangre de las 72 horas después de la dosis, se sacrifican los animales, se inspeccionan los lugares de inyección macroscópicamente en busca de señales de daño tisular y después se fijan en formalina del 10% tamponada neutra. Las muestras de músculo (tres/lugar de inyección) se examinan microscópicamente en busca de inflamación, necrosis, hemorragia y lesiones.

#### *Resultados*

Cuando se clasificaron mediante las puntuaciones del índice de irritación primaria (EPA Dermal Classification System), no se determinó que ninguna de las formulaciones líquidas anteriores fuera más que un irritante cutáneo ligero. La inspección macroscópica de un lugar de inyección de BG9589-4 en un animal indicó una irritación ligera (hemorragia); sin embargo, la investigación microscópica no reveló signos de hemorragia, y se determinó que la observación macroscópica era un artefacto. Brevemente, los exámenes microscópicos revelan que las reacciones en el lugar de inyección del artículo de ensayo de la formulación líquida fueron consistentemente de mínimos a ligeros, y que ninguna reacción fue más grave que las inducidas mediante la administración de la formulación liofilizada o de solución salina normal.

Además, la irritación dérmica en conejos después de administraciones IM repetidas de las formulaciones líquidas se puede ensayar fácilmente usando múltiples grupos de conejos que recibirán inyecciones intramusculares de formulaciones líquidas o de solución salina normal cada dos días durante ocho días (en total cinco dosis). Las dosis se administran en un área predefinida del lomo de cada animal para llevar al máximo la exposición local al artículo de ensayo. Las evaluaciones dérmicas macroscópicas se llevan a cabo 4-6 horas después de cada administración y

24 horas después de la última administración para cada grupo de tratamiento. Se hacen observaciones diarias generales en el momento de cada evaluación dérmica. Después del examen macroscópico de las 24 horas después de la dosis, se sacrifican los animales, se inspeccionan los lugares de inyección en busca de signos de daño tisular y el tejido se fija en formalina del 10% tamponada neutra. Los tejidos conservados se examinan microscópicamente en busca de inflamación, necrosis, hemorragia y lesiones. También se recogen muestras de sangre inmediatamente antes de la administración inicial del artículo de ensayo y en el momento del sacrificio para evaluaciones hematológicas y bioquímicas en suero.

Ejemplo 9

Estudios clínicos

Las presentes formulaciones líquidas difieren significativamente de las anteriores formulaciones de interferón. Para cualquier indicación clínica, existe la posibilidad de un cambio en el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico del interferón cuando se administra a humanos. Desafortunadamente, las actividades de interferón beta son altamente específicas de especie y la información farmacológica más pertinente se deriva de estudios en células humanas en cultivo, en humanos, y, en menor parte, en monos rhesus. Una forma preferida para ensayar el cambio farmacológico, si existe, es llevar a cabo un ensayo de bioequivalencia humana.

Los niveles antivirales de interferón beta en suero se pueden cuantificar usando un bioensayo de efecto citopático (CPE), como se describió en el Ejemplo 1. Se puede llevar a cabo un estudio de bioequivalencia humana con cualquier número de formulaciones de interferón líquidas y liofilizadas. Por medio del análisis de suero, el área bajo la curva (AUC) y los parámetros de actividad C<sub>MAX</sub>, alguien de experiencia habitual puede determinar si las formulaciones liofilizadas y líquidas son bioequivalentes. Solamente como un ejemplo de protocolo de estudio de bioequivalencia, se describe brevemente un estudio transversal bienmascarado de dosis única para demostrar la bioequivalencia de una formulación líquida de la invención y un producto de interferón beta liofilizado en voluntarios sanos.

*Diseño.* Cada sujeto recibe la misma dosis (p.ej., 60 ug/12 MU) de formulaciones de interferón beta en un estudio transversal bienmascarado de dos periodos (Tabla 4). Los sujetos están entre las edades de 18 y 45 años inclusive, y dentro del 15% del intervalo de peso corporal normal para la altura y la constitución física. Se extraen inmediatamente muestras de sangre para hematología, bioquímica, actividad de interferón beta en suero y perfiles farmacodinámicos antes de, y en diversos momentos después de, cada dosis a lo largo de 144 horas después de la dosis. También se sigue la evaluación del dolor de la inyección y las reacciones en el lugar de inyección.

*Realización del estudio.* Como profilaxis contra el síndrome pseudogripal asociado a interferón, todos los sujetos recibirán paracetamol inmediatamente antes y a lo largo de los periodos de dosificación.

Farmacocinética

*Determinaciones de interferón beta en suero.* Los niveles en suero se miden como unidades de actividad antiviral mediante un ensayo (CPE). Los niveles antivirales en suero se analizan para determinar AUC, C<sub>max</sub> y T<sub>max</sub>. Los valores de AUC se calcularán a partir del momento de la dosis hasta el último nivel detectable (AUC<sub>0-T</sub>) y durante 144 horas después de la dosis (AUC<sub>0-144</sub>). El análisis descriptivo estándar de los datos de tratamiento se lleva a cabo usando SAS (versión 6.08, SAS Institute, Cary, North Carolina).

TABLA 4

Programa de dosis para un estudio ejemplar

Grupo de dosis	Vía	Dosis (MU)	Periodo de tratamiento:	
			1	2
1	IM	12	Liofilizado (60 mcg)	Líquido (60 mcg)
2	IM	12	Líquido (60 mcg)	Liofilizado (60 mcg)

*Farmacodinámica.* Se ha caracterizado el marcador biológico neopterina, un producto de la enzima inducida por interferón GTP ciclohidrolasa que refleja la activación de macrófagos y células T (C. Huber *et al.*, *J Exp Med* 1984; 160: 310-314; 20 de septiembre, 1996; D. Fuchs *et al.*, *Immunol. Today* 9: 150-155, 1988). Tanto en estudios no clínicos como clínicos de interferón beta humano recombinante, la inducción de neopterina se correlaciona con los niveles de actividad en suero después de la administración de diversos tratamientos con interferón beta humano recombinante.

## ES 2 224 290 T3

Neopterina se mide por medio de procedimientos estándar de laboratorio. El perfil farmacodinámico de interferón beta se describe de manera cuantitativa mediante el cálculo de tres parámetros de neopterina en suero. El primer parámetro,  $E_{AUC}$ , es el área bajo la curva de neopterina frente al tiempo normalizada con el nivel de la línea base. El segundo parámetro es  $E_{MAX}$ ; este parámetro es la diferencia entre el nivel de neopterina del pico observado y el nivel de neopterina de la línea base. El tercer parámetro es la proporción de inducción, IR; este parámetro se calcula como el nivel de neopterina del pico dividido por el nivel de neopterina de la línea base.

*Estadísticas.* Se usa el procedimiento de ensayo bilateral y unilateral de Wilcoxon-Mann-Whitney con AUC para determinar la equivalencia. Para estimar la biodisponibilidad relativa de interferón de la formulación líquida respecto de la formulación liofilizada y sus límites de confianza del 90%, AUC se somete a un análisis de varianza (ANOVA) después de transformación logarítmica. A partir de la variación “interindividual”, se aíslan las secuencias y los sexos. A partir de la variación “intraindividual”, se aíslan los componentes debidos a los períodos y tratamientos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 224 290 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición líquida que comprende un interferón y un agente estabilizante de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos ácidos, arginina y glicocola; en la que el agente estabilizante de aminoácido está presente entre el 0,3% y 5% p/v; en la que la composición líquida no se ha reconstituido a partir de interferón liofilizado; y en la que la composición líquida no se liofiliza posteriormente.
- 10 2. La composición líquida de la reivindicación 1, en la que el agente estabilizante de aminoácido se selecciona de arginina y glicocola, y en la que la composición líquida no comprende albúmina de suero.
3. La composición líquida de la reivindicación 1, en la que dicha composición líquida está contenida dentro de un recipiente, y en la que al menos una superficie del recipiente en contacto con la composición líquida está revestida con un material inerte a interferón.
- 15 4. La composición líquida de la reivindicación 1, en la que el interferón es un interferón beta, o un interferón producido de forma recombinante.
5. La composición líquida de la reivindicación 1, que tiene un pH entre 4,0 y 7,2.
- 20 6. La composición líquida de la reivindicación 5, que tiene un pH de 4,8 a 5,2.
7. La composición líquida de la reivindicación 6, que tiene un pH de 5,0.
- 25 8. La composición líquida de la reivindicación 6, en la que el aminoácido ácido es ácido glutámico.
9. La composición líquida de la reivindicación 1, en la que la arginina es arginina-HCl.
- 30 10. La composición líquida de la reivindicación 1, que tiene una concentración de interferón entre 6 MUI y 50 MUI.
11. La composición líquida de la reivindicación 1, que tiene una concentración de interferón entre 6 MUI y 50 MUI por dosis.
- 35 12. La composición líquida de la reivindicación 3, en la que dicha superficie del recipiente está revestida con un material seleccionado del grupo que consiste en silicona y politetrafluoroetileno.
13. La composición líquida de la reivindicación 12, en la que el recipiente es una jeringa.
- 40 14. La composición líquida de la reivindicación 1, que comprende además un tampón de pH 5,0; en la que el interferón es interferón beta; y en la que el agente estabilizante de aminoácido es ácido L-glutámico 170 mM.
15. La composición líquida de la reivindicación 1, que comprende además una sal, y en la que el agente estabilizante de aminoácido es glicocola.
- 45 16. La composición líquida de la reivindicación 14, que comprende además al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en albúmina de suero humano 15 mg/ml y Pluronic F-68 0,1% (p/v).
- 50 17. La composición líquida de la reivindicación 1, que comprende además un tampón fosfato 20 mM de pH 7,2; en la que el interferón es interferón beta; y en la que el agente estabilizante de aminoácido se selecciona del grupo que consiste en: (a) arginina 140 mM; y (b) cloruro sódico 100 mM combinado con glicocola 70 mM.
- 55 18. La composición líquida de la reivindicación 17, en la que dicha composición líquida está contenida dentro de un recipiente, y en la que al menos una superficie del recipiente en contacto con la composición líquida está revestida con un material seleccionado del grupo que consiste en silicona y politetrafluoroetileno.
19. La composición líquida de la reivindicación 18, en la que el recipiente es una jeringa.
- 60 20. La composición líquida de la reivindicación 1, que comprende además un tampón que mantiene el pH dentro del intervalo de 4,0 a 6,0; en la que la composición líquida es adecuada para la administración parenteral a mamíferos; y en la que el interferón es interferón beta.
21. La composición líquida de la reivindicación 20, en la que dicha composición líquida está contenida dentro de un recipiente, y en la que al menos una superficie del recipiente en contacto con la composición líquida está revestida con un material inerte a interferón.
- 65 22. La composición líquida de la reivindicación 21, en la que el recipiente de almacenamiento carece de una interfase gas que contiene oxígeno/líquido.

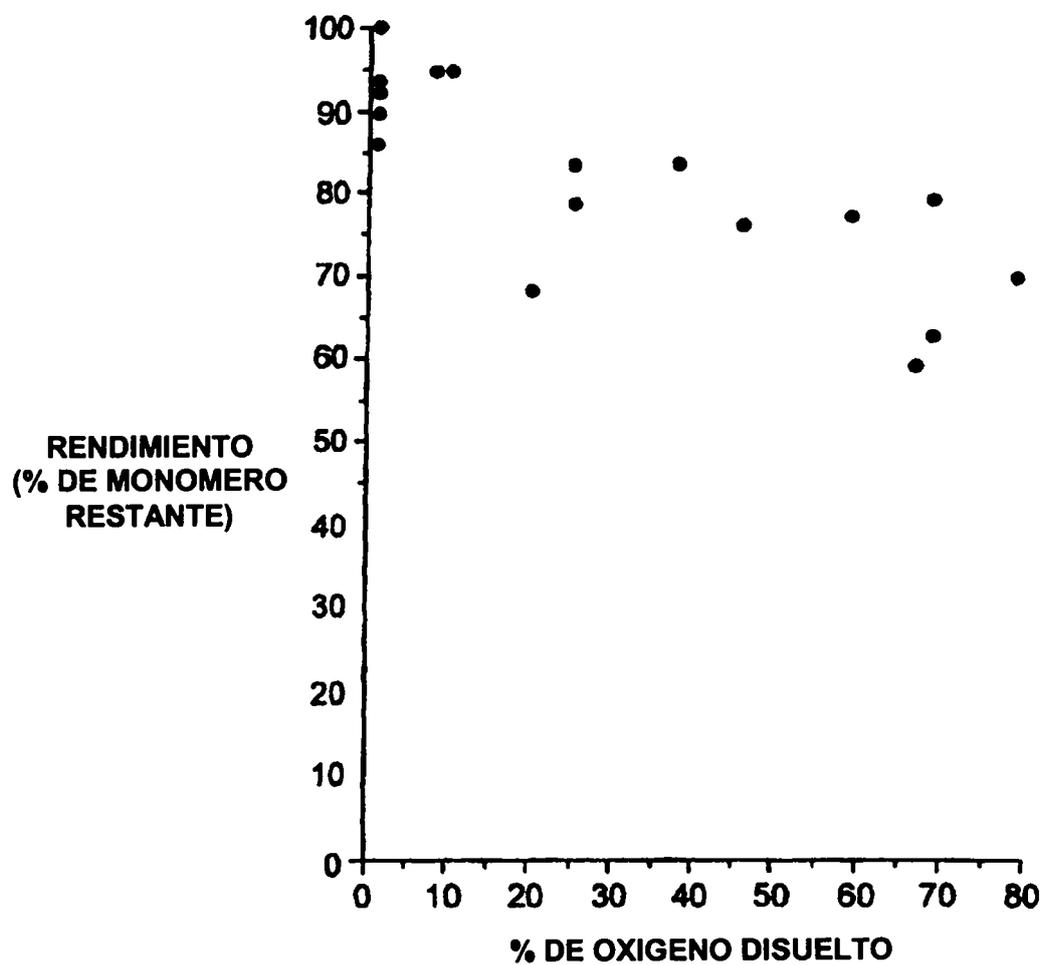
## ES 2 224 290 T3

23. La composición líquida de la reivindicación 21, en la que el interferón beta no se ha sometido a cavitación antes y durante el almacenamiento en el recipiente.
24. La composición líquida de la reivindicación 20, en la que el tampón es un tampón de ácido orgánico seleccionado del grupo que consiste en tampón citrato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato y acetato.
25. La composición líquida de la reivindicación 20, en la que el pH de la composición líquida está en el intervalo de 4,5 a 5,5.
26. La composición líquida de la reivindicación 20, en la que el pH de la composición líquida es 5,0.
27. La composición líquida de la reivindicación 20, en la que la composición es estéril.
28. La composición líquida de la reivindicación 20, en la que la composición es isotónica con la sangre.
29. La composición líquida de la reivindicación 20, en la que el interferón beta es interferón beta recombinante humano.
30. La composición líquida de la reivindicación 29, en la que la actividad de interferón beta recombinante humano está en el intervalo de 6 a 50 MUI.
31. La composición líquida de la reivindicación 1, en la que el agente estabilizante de aminoácido está presente entre 0,3% y 3,13% (p/v); y en la que la composición líquida está congelada.
32. Una composición farmacéutica líquida que comprende: (a) un interferón, (b) un tampón acetato, y (c) arginina; en la que la composición tiene un pH de entre 4,0 y 6,0; en la que la composición no comprende albúmina de suero.
33. La composición farmacéutica líquida de la reivindicación 32, en la que la arginina es arginina-HCl.
34. La composición farmacéutica líquida de la reivindicación 32 ó 33, en la que el interferón es interferón beta.
35. La composición farmacéutica líquida de la reivindicación 34, en la que el interferón está presente entre 6 MUI y 50 MUI.
36. La composición líquida de la reivindicación 34, en la que el interferón está presente entre 6 MUI y 50 MUI por dosis.
37. La composición líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 32-36, en la que el tampón acetato está presente en 20 mM.
38. La composición líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 32-37, en la que arginina o arginina-HCl está presente entre 0,3% y 5% p/v.
39. La composición líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 32-38, que además comprende un tensoactivo.
40. La composición líquida de la reivindicación 39, en la que el tensoactivo es Pluronic F-68 0,1% (p/v).
41. La composición líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 32-40, en la que dicha composición líquida tiene un nivel de oxígeno disuelto que es menor del 30% de los niveles de equilibrio atmosférico.
42. La composición líquida de la reivindicación 41, en la que dicha composición líquida tiene un nivel de oxígeno disuelto que es menor o igual al 10% de los niveles de equilibrio atmosférico.
43. Un método para estabilizar interferón en una composición farmacéutica líquida que comprende mezclar: a) un interferón; b) un tampón; y c) un agente estabilizante de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos ácidos, arginina y glicocola; en el que dicho agente estabilizante de aminoácido está presente entre 0,3% y 5% p/v; en el que dicha composición farmacéutica líquida no se ha reconstituido a partir de interferón liofilizado, y en el que dicha composición farmacéutica líquida no se liofiliza posteriormente.
44. Un método de la reivindicación 43, en el que dicho agente estabilizante de aminoácido se selecciona del grupo que consiste en arginina y glicocola; y en el que dicho método no comprende mezclar albúmina de suero.
45. Un método de la reivindicación 43, en el que dicha composición farmacéutica líquida está contenida dentro de un recipiente, y en el que al menos una superficie del recipiente en contacto con la composición farmacéutica líquida está revestida con un material inerte a interferón.

## ES 2 224 290 T3

46. El método de la reivindicación 43, en el que dicha composición farmacéutica líquida está contenida dentro de un recipiente, y en el que el interferón no se ha sometido a cavitación antes y durante la contención dentro del recipiente.
- 5 47. El método de la reivindicación 43, en el que el interferón es un interferón beta, o un interferón producido de forma recombinante.
48. El método de la reivindicación 43, en el que dicho tampón tiene un pH de entre 4,0 y 7,2.
- 10 49. El método de la reivindicación 48, en el que dicho tampón tiene un pH de entre 4,8 y 5,2.
50. El método de la reivindicación 49, en el que dicho tampón tiene un pH de 5,0.
51. El método de la reivindicación 43, en el que la arginina es arginina-HCl.
- 15 52. El método de la reivindicación 43, en el que el interferón está presente a una concentración de entre 6 MUI y 50 MUI.
53. El método de la reivindicación 45, en el que dicha superficie del recipiente está revestida con un material seleccionado del grupo que consiste en silicona y politetrafluoroetileno.
- 20 54. El método de la reivindicación 53, en el que el recipiente es una jeringa.
55. El método de la reivindicación 43, que comprende además un tampón fosfato 20 mM de pH 7,2; en el que el agente estabilizante de aminoácido se selecciona del grupo que consiste en: (a) arginina 140 mM, y (b) cloruro sódico 100 mM combinado con glicocola 70 mM.
- 25 56. El método de la reivindicación 55, en el que dicha composición farmacéutica líquida está contenida dentro de un recipiente, y en el que al menos una superficie del recipiente en contacto con la composición farmacéutica líquida está revestida con un material seleccionado del grupo que consiste en silicona y politetrafluoroetileno.
- 30 57. El método de la reivindicación 56, en el que el recipiente es una jeringa.
58. Un método para estabilizar interferón en una composición farmacéutica líquida que comprende mezclar: a) un interferón; b) un tampón acetato; y c) arginina; en el que la composición tiene un pH de entre 4,0 y 6,0; en el que la composición farmacéutica líquida no se ha reconstituido a partir de interferón liofilizado; y en el que la composición farmacéutica líquida no se liofiliza posteriormente.
- 35 59. El método de la reivindicación 58, en el que la arginina es arginina-HCl.
- 40 60. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 58-59, en el que el interferón es interferón beta.
61. El método de la reivindicación 60, en el que el interferón está presente entre 6 MUI y 50 MUI.
- 45 62. El método de la reivindicación 60, en el que el interferón está presente entre 6 MUI y 50 MUI por dosis.
63. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 58-62, en el que el tampón acetato está presente en 20 mM.
- 50 64. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 58-63, en el que arginina o arginina-HCl está presente entre 0,3% y 5% p/v.
65. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 58-64, que comprende además mezclar un tensoactivo.
- 55 66. El método de la reivindicación 65, en el que el tensoactivo es Pluronic F-68 0,1% (p/v).
67. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 58-66, en el que el método no comprende mezclar albúmina de suero.
- 60 68. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 58-67, en el que dicha composición líquida está contenida dentro de un recipiente, y en el que el interferón beta no se ha sometido a cavitación antes y durante la contención dentro del recipiente.
- 65 69. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 58-67, en el que dicha composición líquida está contenida dentro de un recipiente, y en el que no hay interfase gas que contiene oxígeno/líquido entre la composición farmacéutica líquida y el recipiente.

**% DE OXIGENO DISUELTO FRENTE A RENDIMIENTO  
DURANTE LA ETAPA DE INACTIVACION VIRAL**



**FIG. 1**

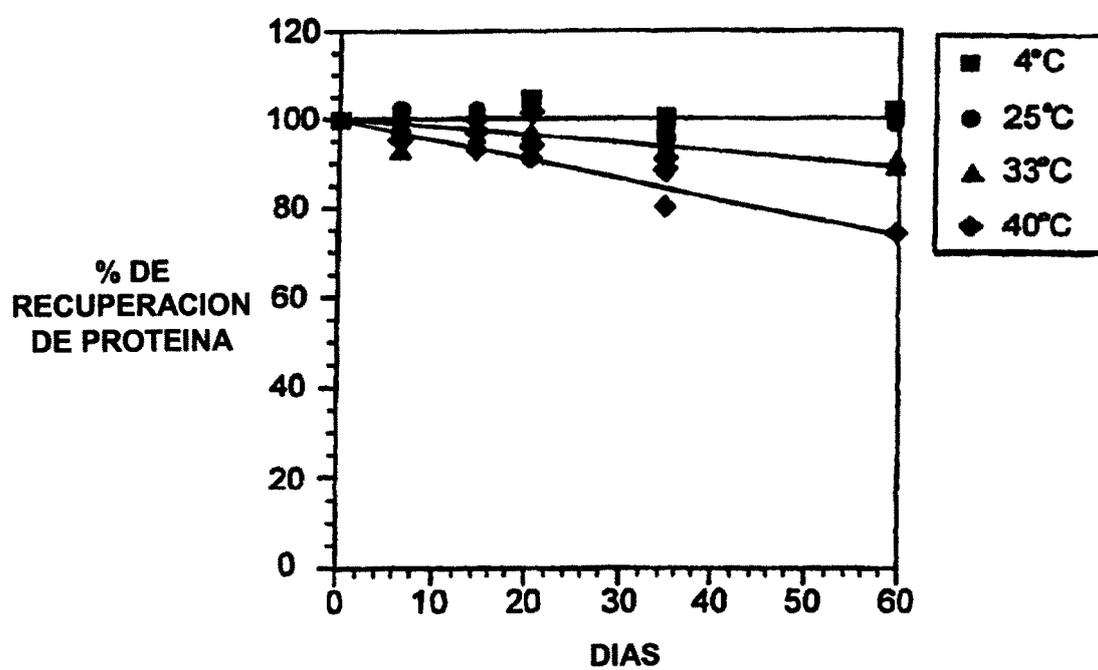


FIG. 2

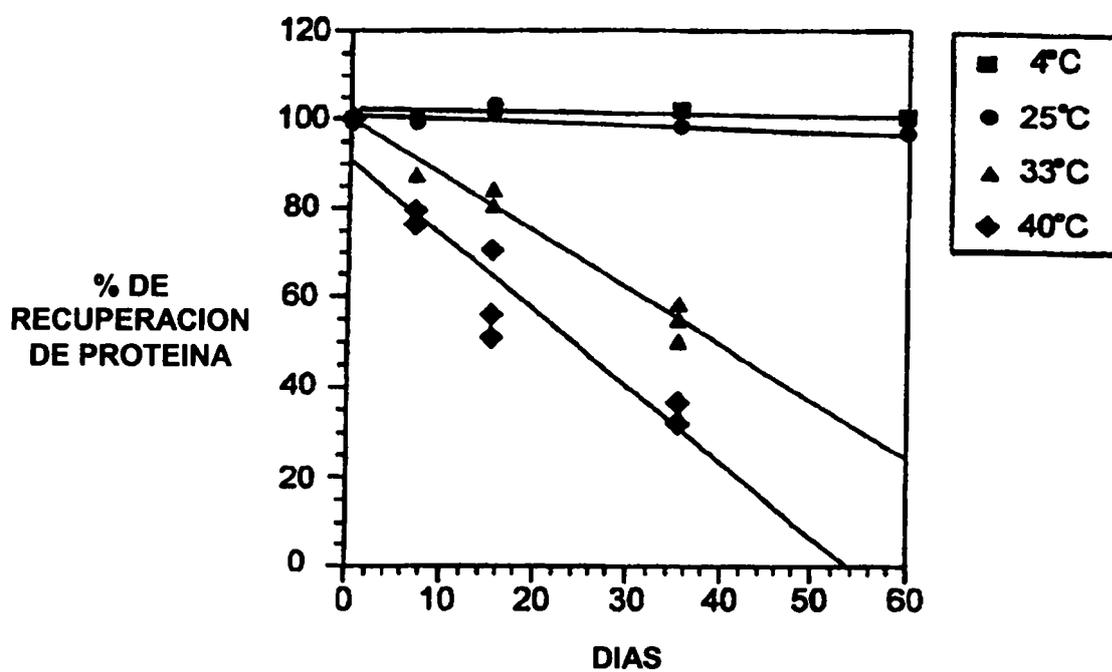


FIG. 3