



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 832**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)	A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)	A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)	A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)	A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)	A61K 38/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08720138 .0**

96 Fecha de presentación : **29.02.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2117514**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54

Título: **Composiciones que comprenden conjugados de peg-interferón alfa y rafinosa como crioprotector.**

30

Prioridad: **05.03.2007 IN MU0412/07**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.10.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.10.2011

73

Titular/es: **CADILA HEALTHCARE LIMITED**
Zyduz Tower Satellite Cross Roads
Ahmedabad, Gujarat 380 015, IN

72

Inventor/es: **Bandyopadhyay, Sanjay;**
Mendiratta, Sanjeev, Kumar;
Natarajan, Venkatesan y
Patel, Pankaj, Ramanbhai

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 832 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

Composiciones que comprenden conjugados de PEG-interferón alfa y rafinosa como crioprotector

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevas formulaciones liofilizadas y estabilizadas de conjugados de PEG-interferón alfa y a procesos para su preparación.

Antecedentes de la invención

10 La principal desventaja del uso terapéutico de la mayoría de los productos biológicos es que se administran a través de una ruta parenteral, por ejemplo, de manera intra-venosa (i.v.), sub-cutánea (s.c.) o intra-muscular (i.m.), etc., lo que significa que la administración al paciente está asociada con dolor y molestia. Además, debido a que normalmente presentan semividas cortas, los materiales biológicos requieren administraciones frecuentes al paciente con el fin de mantener los niveles terapéuticos del fármaco en sangre. Muchos tipos de inyecciones que no se pueden auto-administrar requieren visitas frecuentes a la clínica, lo que supone una molestia adicional para el paciente. Existen muchos ejemplos de dichos fármacos biológicos que requieren una administración frecuente. Interferón alfa -2a (Roferon, Roche) e interferón alfa-2b (Intron A, Schering AG), las dos formas recombinantes de interferón alfa humana, usadas en el tratamiento de hepatitis B y C crónicas presentan una semivida menor que 12h (McHutchison et al., Engl. J. Med. 1998, 339, 1485-1492; Glue, et al., Clin. Pharmacol. Ther. 2000, 68, 556-557) y por tanto requieren una administración del fármaco de al menos 3 veces por semana. También se requieren inyecciones repetidas con interferón beta-1b (Betaseron) para el tratamiento de pacientes que padecen esclerosis múltiple (MS). La dosificación recomendada se administra diariamente por vía sub-cutánea. Otro ejemplo de fármaco que precisa de inyecciones repetidas es filgrastim (factor estimulador de las colonias de granulocitos, o G-CSF), en el que la inyección es administrada diariamente para una duración del tratamiento de dos semanas.

25 Otro método satisfactorio y muy aceptado para solucionar el inconveniente de las inyecciones frecuentes de dosificación elevada para mantener los niveles de umbral del fármaco en el cuerpo es aumentar la semivida in-vivo de la proteína terapéutica mediante conjugación con un polímero, preferentemente polietilenglicol (PEG). Se piensa que las moléculas de PEG, con sus largas cadenas, crean un escudo protector alrededor de la molécula de fármaco pegilada en disolución acuosa, y por tanto, contribuyen a reducir la inmunogenia de los fármacos de proteína al tiempo que también los protegen de la acción de las proteasas. Además de esto, debido a su gran volumen hidrodinámico, las moléculas de PEG son capaces de reducir la tasa de depuración renal del fármaco al tiempo que alargan la semivida del fármaco de proteína en la circulación. La conjugación de proteínas a PEG se ha documentado desde los años 70. Normalmente, los restos de PEG se unen a la proteína en primer lugar activando el resto PEG y posteriormente haciéndolo reaccionar con las cadenas laterales de los residuos de lisina y/o con el grupo amino N-terminal de la proteína. El PEG más frecuentemente usado es PEG monofuncional ya que este resto resiste la reticulación y la agregación. Un ejemplo ha sido descrito por Davis et al. en la patente de EE.UU. N°. 4.179.337. Se formaron conjugados de PEG-proteína haciendo reaccionar un material biológicamente activo con una concentración de exceso molar de polímero altamente activado que tiene un grupo de enlace terminal con respecto al cual el polímero se uniría a la proteína y que da lugar a una composición de polipéptido soluble en agua, no inmunogénico y fisiológicamente activo. La pegilación de interferones se ha documentado en las patentes de EE.UU. Nos. 4.766.106 y 4.917.888 que describen, entre otros, un interferón beta conjugado con polímeros activados que incluyen mPEG-2,4,6-tricloro-S-triazina, glutarato de mPEG-N-succinimidilo o succinato de mPEG-N-succinimidilo. Una de tales descripciones de la patente de EE.UU. N°. 5.951.974 describe la conjugación de un interferón a un polímero considerablemente no antigénico en el sitio de la histidina. Otra de dichas descripciones, en la patente de EE.UU. N°. 5.981.709 describe un conjugado de interferón alfa-polímero con una semivida in-vivo de circulación relativamente larga.

45 Algunas proteínas terapéuticas pegiladas disponibles comercialmente incluyen, ADAGEN (adenosin desaminasa bovina pegilada), que se usa para tratar síndrome de inmunodeficiencia combinada agudo con unión X; PEGASYS (alfa-interferón 2a pegilado), que se usa en el tratamiento de la hepatitis C; PEG-Intron (alfa-interferón 2b pegilado) para hepatitis C crónica; Oncaspar (L-asparaginasa pegilada) para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda en pacientes que presentan hipersensibilidad a la forma no modificada nativa de L-asparaginasa; y Neulasta (factor estimulador de la colonia de granulocito humano de metionilo recombinante pegilado) para quimioterapia de cáncer inducida por neutrocitopenia.

55 El virus de la hepatitis C (HCV) es una de las principales causas de enfermedad hepática en el mundo. Alrededor de 200 millones de personas se encuentran afectadas a lo largo del mundo. Se ha comprobado que el interferón en combinación con Ribavirin resulta eficaz para reducir la carga viral en pacientes con hepatitis C crónica, aunque no obstante es necesario una administración de tres veces por semana. El PEG-interferón alfa 2b es un conjugado covalente de interferón alfa 2b recombinante con monometoxi PEG en una proporción molar de 1:1 (Glue P et al., Clin Pharmacol Ther. 2000; 68; 556-567). La semivida media de absorción de PEG-interferón alfa 2b es 5 veces mayor que la del interferón alfa-2b no pegilado. La semivida media de eliminación es de 40 horas en pacientes con infección de hepatitis C. Otro producto es PEG-interferón alfa 2a, que presenta un molécula de cadena ramificada de 40 kDa con cada ramificación de PEG con un peso molecular de 20 kDa. Se unen las dos cadenas de monometoxi

PEG por medio de enlaces de uretano hidrolíticamente estables a una molécula de enlace de lisina, una en el grupo amino de la lisina alfa y la otra en el grupo amino de la lisina ε. La semivida media de absorción de PEG-interferón alfa 2a es 10 veces mayor que la del interferón alfa-2a no pegilado. La semivida media de eliminación es de aproximadamente 60 horas en pacientes con infección de hepatitis C. Ambos productos precisan ser administrados únicamente en un régimen de una vez por semana.

Al tiempo que algunos conjugados de proteína-polímero son estables en forma líquida, otros no. Por ejemplo, a diferencia del caso de PEG-interferón alfa 2a en el que la pegilación da lugar a un enlace de uretano estable, que es fundamentalmente estable en medio acuoso, el producto PEG-interferón alfa 2b, que contiene PEG fundamentalmente unido a un residuo de histidina (His 34), es altamente inestable en forma líquida. Con dichos conjugados de proteína-polímero, es preciso usar técnicas tales como liofilización/secado por congelación – un proceso en el que tiene lugar la sublimación de agua a partir de una composición tras congelación – que puede proporcionar una forma estable del producto biológico durante un período de tiempo deseado. De este modo, para preparar una formulación de PEG-interferón alfa 2b, es necesario liofilizar con precaución la formulación con un crioprotector(es) o un lioprotector(es) apropiado, y estabilizadores, que estabilizan los conjugados de interferón alfa pegilados para evitar la des-pegilación durante y después de la liofilización – un fenómeno comúnmente asociado con el producto de PEG-interferón alfa 2b. De manera adicional, además del crioprotector y de estabilizadores, la formulación liofilizada también contiene agentes que confieren volumen para aumentar la cantidad de material sólido en el frasco.

Una forma específica para resolver el problema de inestabilidad del enlace de uretano al residuo de His 34 en el caso de PEG-interferón alfa 2b es mediante la utilización de una formulación que ha sido descrita en la patente de EE.UU. Nº. 6.180.096, en la que se someten a liofilizado conjugados de PEG-IFN alfa 2b en presencia de un tampón, crioprotectores, un estabilizador y un disolvente del cual dicha formulación contiene una sacarosa de disacárido, como crioprotector, junto con, fosfato de sodio monobásico dihidratado y fosfato de sodio dibásico anhidro como tampón, con polisorbato 80 como estabilizador, y agua como disolvente. Mientras la formulación anterior ha resultado exitosa desde el punto de vista comercial para el tratamiento de la hepatitis C, sin embargo se encuentra asociada a problemas graves, algunos de los cuales se presentan en otra solicitud de patente, WO 2006/020720, por parte de la misma compañía, que apunta ciclos de liofilización largos que dan lugar a mayores costes de fabricación y un mayor contenido de humedad asociado a la formulación comercial como los motivos para descubrir e informar sobre la nueva formulación de WO 2006/020720. En el documento 2006/020720, los inventores divulgan otra formulación liofilizada de PEG-IFN alfa 2b, en la que el crioprotector comprende al menos 60 % de trehalosa, los componente de agente tampón comprenden fosfato de sodio monobásico dihidratado y fosfato de sodio dibásico anhidro y en la que la formulación además comprende polisorbato 80 como estabilizador y agua como disolvente, y que es capaz de resolver los problemas anteriormente descritos de la formulación comercial. La necesidad de formulaciones adicionales para la protección de los conjugados de PEG-IFN alfa 2b no se puede justificar mejor que el hecho de que los cesionarios de la patente de EE.UU. 6.180.096 (formulación comercial), y los solicitantes de WO 2006/020720, son la misma compañía, Schering Corporation, que continúa desarrollando y divulgando más formulaciones liofilizadas para PEG-IFN alfa 2b.

Con US 2005 031576 la producción de PEG-interferón alfa pegilado se explica en el Ejemplo 13. Se anticipan posibles composiciones farmacéuticas sugiriendo la inclusión de carbohidratos, tampón, anti-oxidantes, tensioactivos un disolvente.

La necesidad de formulaciones adicionales de PEG-IFN alfa-2b con respecto a las que ya existen constituye un objetivo no solo para proteger el conjugado PEG-interferón alfa durante y después de la liofilización, sino también para aportar un almacenamiento al largo plazo en estado liofilizado en el interior de un recipiente. El proceso de tales formulaciones debería ser sencillo de manejar y más rentable que los que se usan en las formulaciones actuales. La formulación actual comercial de PEG-IFN alfa 2b, basada en sacarosa (como se describe en la patente de EE.UU. 6.180.096) presenta un ciclo de liofilización bastante largo, como se describe en el documento PCT/US2005/028441. La formulación descrita en la presente invención usa un ciclo de liofilización, en el que el tiempo de proceso se reduce al menos en 48 h, con respecto a algunas otras formulaciones conocidas. Esto, a su vez, contribuya a disminuir el coste de fabricación del fármaco, de manera significativa.

La presente invención proporciona nuevas formulaciones liofilizadas y estabilizadas de conjugados de PEG-interferón alfa y el proceso de su preparación.

Realizaciones de la invención

En una realización de la presente invención se proporcionan nuevas formulaciones liofilizadas de conjugados de PEG-interferón alfa.

En otra realización de la invención se proporciona un proceso para la preparación de nuevas formulaciones de conjugados de PEG-interferón alfa.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a nuevas formulaciones liofilizadas y estabilizadas de conjugados de PEG-interferón alfa y a un proceso(s) para su preparación. Las formulaciones implican formular conjugados de PEG-interferón alfa con un tampón(es) apropiado, un crioprotector(es) apropiado, un estabilizador(es) apropiado y un disolvente, de manera opcional con otros excipientes apropiados, que posteriormente se somete a liofilización.

Se apreciará que la presente invención no se encuentra limitada por las concentraciones de los componentes de las nuevas formulaciones como se describe en la memoria descriptiva.

Los conjugados de PEG-interferón alfa de acuerdo con la presente invención son moléculas de interferón alfa o sus variantes unidas covalentemente a una o más moléculas de PEG. Las moléculas de PEG pueden ser las que se conocen bien y se usan en la preparación de productos biológicos pegilados para uso terapéutico. Los conjugados de PEG-interferón alfa de la presente invención pueden comprender Interferón alfa-2a, interferón alfa-2b o interferón alfa-2c y sus variantes apropiadas, del modo más preferido, el conjugado PEG-interferón alfa-2b.

Los polímeros son moléculas que comprenden unidades químicas repetidas unidas por medio de enlace covalente. Con frecuencia, se designa el peso molecular aproximado del polímero con un número que sigue al nombre de unidades químicas repetidas. Por ejemplo, "PEG₁₂₀₀₀" o "polietilenglicol (12000)" se refiere a un polímero de polietilenglicol que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 12.000 daltons.

La conjugación de polímeros a proteínas puede resultar en una molécula sencilla de polímero conjugada a una proteína o conjugaciones múltiples a una proteína sencilla. El grado de conjugación y el sitio de pegilación dependen principalmente de las condiciones de reacción y de la proporción PEG/proteína. En una realización preferida, el conjugado PEG-interferón alfa de las formulaciones de la presente invención comprende un único interferón alfa-2b conjugado a una única molécula de PEG, de forma predominante. En una realización preferida, el conjugado PEG-interferón alfa de las formulaciones de la presente invención comprende un interferón alfa 2b sencillo conjugado a una única molécula de PEG₁₂₀₀₀. En una realización particularmente preferida, la molécula de interferón alfa-2b se encuentra unida a la molécula de PEG₁₂₀₀₀ con un enlace de uretano. Se conocen varios procesos para preparar conjugados de PEG-IFN en la técnica y se considera que tales procesos y los productos derivados de ellos se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Ejemplos de tales proceso(s) para producir el conjugado de proteína-polímero se pueden encontrar en la patente de EE.UU. N°. 5612460 (Zalipsky) y en la patente de EE.UU. N°. 5711944 (Glibert et al.). Sin limitar el alcance de la presente invención, cuando se utiliza dicho conjugado de proteína-polímero en las disoluciones de formulación de la presente invención, la concentración preferida de conjugado PEG-interferón alfa es de 0,03 a 2,0 mg de interferón alfa por cada ml. Cuando una única molécula de interferón alfa se encuentra unida a una única molécula de PEG₁₂₀₀₀, los conjugados resultantes de PEG-interferón alfa pueden estar en forma sencilla o de mezcla de distintos isómeros de posición.

Para conservar el conjugado de PEG-interferón alfa en su forma más estable y activa, se puede usar liofilización. La liofilización es un proceso de secado por congelación de una composición, en el que la mezcla acuosa congelada se trata para retirar el agua. Comúnmente, el proceso implica la sublimación de agua a partir de las disoluciones acuosas, normalmente en condiciones de presión reducida. Después de la liofilización, se puede almacenar el conjugado(s) PEG-interferón alfa durante largos períodos de tiempo.

No obstante, los conjugados PEG-interferón alfa, está expuestos a daño durante y después de la liofilización (documento de EE.UU. 6.180.096). Además, es necesario formular de manera apropiada los conjugados de PEG-interferón alfa para protegerlos de la degradación durante y después de la liofilización. Además, también resulta útil si dichas formulaciones proporcionan resistencia física a la formulación.

La presente invención protege los conjugados PEG-interferón alfa frente al daño incluyéndolos en formulaciones que evitan el daño durante y después de la liofilización. Mientras que la presente invención no se encuentra limitada a una formulación particular, las formulaciones que se anticipan en el presente documento utilizan un tampón(es) apropiado, un estabilizador(es) apropiado, un crioprotector(es) apropiado y/o lioprotector(es) apropiado, un agente(s) que confiere volumen y un disolvente(s), solos o en combinación apropiada, de manera opcional con otros excipientes apropiados, además del conjugado de PEG-interferón alfa. Se pueden usar varias combinaciones posibles de los grupos escogidos de tampones, estabilizadores y crioprotectores que se han descrito anteriormente, para preparar las nuevas formulaciones de la presente invención.

Los tampones son apropiados para mantener el pH de la combinación. El sistema tampón que se puede usar comprende un fosfato, succinato, histidina, glucinato y similares, bien solos o en combinación apropiada, que proporciona el intervalo de pH deseado. El intervalo de pH preferido está entre 4,5-7,1, preferentemente 6,5-7,1 y del modo más preferido 6,8. La concentración molar preferida del tampón está en el intervalo de 0,001 a 0,5 M. Los tampones preferidos se pueden escoger entre fosfato de sodio, succinato de sodio, succinato de potasio, cloruro de histidina, glucinato de sodio o sus combinaciones apropiadas. También se pueden usar otros sistemas tampón que mantienen el intervalo de pH deseado.

De manera general, el término "crioprotectores" incluye agentes, que proporcionan estabilidad a la proteína a partir

de los esfuerzos inducidos por congelación; no obstante, el término también incluye agentes que proporcionan estabilidad, por ejemplo, a formulaciones de fármacos en bruto durante el almacenamiento a partir de esfuerzos que no están inducidos por congelación. Ejemplos de estos crioprotectores incluyen distintos polioles y sacáridos, por ejemplo, sacarosa, lactosa, trehalosa, rafinosa y manitol o sus combinaciones apropiadas.

5 El término “crioprotector” incluye agentes que proporcionan estabilidad a la proteína durante la retirada de agua del sistema durante el proceso de secado, presumiblemente manteniendo la conformación apropiada de la proteína a través del enlace de hidrógeno. Los crioprotectores también pueden presentar efectos lioprotectores; por tanto, los términos “crioprotector” y “lioprotector” se usan indistintamente en el presente documento.

10 El agente estabilizador resulta útil para evitar la adsorción de los conjugados de PEG-interferón alfa sobre superficies de vidrio y de acero inoxidable del equipamiento del proceso usado para preparar y almacenar la formulación. Agentes estabilizadores apropiados, que se pueden usar, son sulfato de dodecilo (SDS), polisorbatos (por ejemplo, Polisorbato 20, 40 u 80, bien solo o en combinación). Ejemplos puede ser los derivados de la clase de poli(oxi1,2-etanodilo). Un agente estabilizador preferido es mono-oleato de polioxietilen 20 de sorbitán, polisorbato 80 (Tween 80) a una concentración preferida de 0,01 a 1 mg/ml.

15 La presente invención no se encuentra limitada a ninguna cantidad específica de crioprotector. El crioprotector se puede usar solo o en combinaciones apropiadas. En una realización, los crioprotectores están presentes en una cantidad de 0,05 % a 90 %, preferentemente de 0,05 a 50 % y del modo más preferido en una cantidad de 0,15 a 20 %, basado en el peso total de la disolución de PEG-interferón.

20 El disolvente apropiado para la presente formulación es agua, preferentemente el disolvente puede ser agua para inyección.

Se pueden añadir otros excipientes apropiados a la formulación. Dichos excipientes incluyen glicina, en una concentración apropiada, para estabilizar la formulación.

25 Las nuevas formulaciones de conjugados de PEG-interferón alfa se preparan usando combinaciones apropiadas de un tampón, estabilizador, crioprotector(es) y/o lioprotector(es) y un disolvente, de manera opcional con otros excipientes y se liofilizan de manera apropiada y se almacenan en forma de polvo seco para proceder a su reconstitución antes de ser usados.

Las formulaciones preparadas de este modo contienen una cantidad eficaz de conjugados de PEG-interferón alfa activos biológicamente, y resulta útiles para tratar varias enfermedades tales como Hepatitis B y C y cáncer, etc. Preferentemente, se usan como disoluciones acuosas inyectables.

30 Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran las composiciones farmacéuticas descritas de la presente invención y los medios para llevar a cabo la invención para obtener una forma de dosificación farmacéutica de los conjugados PEG-interferón alfa. Se apreciará que los ejemplos son ilustrativos y se pretende que otras modificaciones/adiciones apropiadas etc. que también se encuentran dentro del alcance de las personas expertas en la técnica queden incluidas dentro del alcance de la presente invención.

35 Ejemplos

40 Se prepararon varias formulaciones de PEG-interferón alfa-2b disueltas en un tampón apropiado en presencia de crioprotector(es) apropiados y estabilizador(es) de los descritos en la memoria descriptiva y posteriormente se liofilizaron. Después de la liofilización, se almacenaron las muestras a 5 °C (± 3 °C) y, en diferentes períodos de tiempo, se reconstituyeron las muestras con agua para el análisis. Se analizaron las muestras reconstituidas en cuanto a claridad visual, actividad antivírica in-vitro y nivel de interferón libre. En el ensayo antivírico in-vitro, el conjugado de PEG-interferón alfa nuevo, no formulado y formulado mostraron la misma actividad específica dentro del intervalo de $0,1 \times 10^8$ a $0,8 \times 10^8$ IU por miligramo de proteína de interferón.

Ejemplo 1

45 Se formuló el conjugado de PET-interferón alfa preparado según las técnicas conocidas en la técnica, como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1

Componentes de la formulación de conjugado PEG-interferón alfa sometido a liofilización	
Componentes	Concentraciones
PEG ₁₂₀₀₀ -interferón alfa-2b	0,2 mg/ml *
Succinato de sodio, pH 6,8	10 mM
Rafinosa	42,85 mg/ml
Polisorbato 80	0,1 mg/ml
Agua pura	c.s.

* Basado en el peso de proteína

5 Se llevó a cabo la liofilización colocando la disolución anteriormente especificada en recipientes de vidrio seguido de la introducción de los recipientes de vidrio en el interior de un liofilizador a temperatura y presión ambientales. Se congelaron las muestras de forma gradual, de manera controlada, a presión ambiental, rebajando la temperatura hasta -55 °C durante un período de 11,5 h. Posteriormente, se sometieron las muestras congeladas a un secado principal, por etapas durante 23 horas, al tiempo que se aumentó la temperatura de -55 °C hasta 0 °C y reduciendo la presión desde presión ambiental hasta 50 mTorr. Después de los ciclos principales de secado, se llevaron a cabo ciclos de secado secundarios durante al menos 16 h, al tiempo que se reducía la presión de 50 a 20 mTorr. Tras completar los ciclos de liofilización, se descargaron los recipientes de vidrio que contenían las tortas liofilizadas a valores de temperatura y presión ambientales.

15 Tras la liofilización, se recogieron los frascos y se almacenaron a 5 (± 3) °C hasta que se usaron para el posterior análisis. Se reconstituyeron las muestras con agua para el análisis en distintos períodos de tiempo, como se especifica en la Tabla 2. Se evaluó la claridad visual de las disoluciones reconstituidas. Se evaluó la estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa en cuanto a actividad antivírica in-vitro y la cantidad de interferón libre (grado de des-pegilación) presente en la disolución reconstituida, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Estabilidad de conjugado PEG-interferón alfa formulado tras liofilización				
Tiempo (meses)	Temp. Almacenamiento (± 3 °C)	Potencia (IU/mg)	% de IFN libre	Claridad visual
Inicial		0,38 x 10 ⁸	2,8	CS
3		0,27 x 10 ⁸	2,8	CS
6	5	0,41 x 10 ⁸	3,6	CS
9		0,45 x 10 ⁸	4,8	CS

CS – disolución transparente

Ejemplo 2

20 Se formuló el conjugado de PEG-interferón alfa preparado según las técnicas conocidas en la técnica como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Componentes de la formulación de conjugado PEG-interferón alfa sometido a liofilización	
Componentes	Concentraciones
PEG ₁₂₀₀₀ -interferón alfa-2b	0,2 mg/ml *
Succinato de sodio, pH 6,8	10 mM
Lactosa	28,5 mg/ml
Rafinosa	42,85 mg/ml
Glicina	1,05 mg/ml
Polisorbato 80	0,1 mg/ml
Agua pura	c.s.

* Basado en el peso de proteína

Se llevó a cabo la liofilización de la misma forma que se describe en el Ejemplo 1.

5 Tras la liofilización, se recogieron los frascos y se almacenaron a 5 (± 3) °C hasta que se usaron para el posterior análisis. Se reconstituyeron las muestras con agua para el análisis en distintos periodos de tiempo, como se especifica en la Tabla 4. Se evaluó la estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa en cuanto a actividad antivírica in-vitro y la cantidad de interferón libre (grado de des-pegilación) presente en la disolución reconstituida, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Estabilidad de conjugado PEG-interferón alfa formulado tras liofilización				
Tiempo (meses)	Temp. Almacenamiento (± 3 °C)	Potencia (IU/mg)	% de IFN libre	Claridad visual
Inicial		0,38 x 10 ⁸	2,94	CS
3		0,18 x 10 ⁸	2,19	CS
6	5	0,46 x 10 ⁸	3,22	CS
9		0,16 x 10 ⁸	4,0	CS

CS – disolución transparente

Ejemplo 3

10 Se formuló el conjugado de PEG-interferón alfa preparado según las técnicas conocidas en la técnica como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

Componentes de la formulación de conjugado PEG-interferón alfa sometido a liofilización	
Componentes	Concentraciones
PEG ₁₂₀₀₀ -interferón alfa-2b	0,2 mg/ml *
Succinato de sodio, pH 6,8	10 mM
Lactosa	71,43 mg/ml
Rafinosa	21,43 mg/ml
Glicina	1,05 mg/ml
Polisorbato 80	0,1 mg/ml
Agua pura	c.s.

* Basado en el peso de proteína

Se llevó a cabo la liofilización de la misma forma que se describe en el Ejemplo 1.

5 Tras la liofilización, se recogieron los frascos y se almacenaron a 5 (± 3) °C hasta que se usaron para el posterior análisis. Se reconstituyeron las muestras con agua para el análisis en distintos periodos de tiempo, como se especifica en la Tabla 6. Se evaluó la claridad visual de las disoluciones reconstituidas. Se evaluó la estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa en cuanto a actividad antivírica in-vitro y la cantidad de interferón libre (grado de des-pegilación) presente en la disolución reconstituida, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Estabilidad de conjugado PEG-interferón alfa formulado tras liofilización				
Tiempo (meses)	Temp. Almacenamiento (± 3 °C)	Potencia (IU/mg)	% de IFN libre	Claridad visual
Inicial		0,38 x 10 ⁸	2,8	CS
3		0,14 x 10 ⁸	2,56	CS
6	5	0,42 x 10 ⁸	2,53	CS
9		0,16 x 10 ⁸	3,52	CS

CS – disolución transparente

Ejemplo 4

10 Se formuló el conjugado de PEG-interferón alfa preparado según las técnicas conocidas en la técnica como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7

Componentes de la formulación de conjugado PEG-interferón alfa sometido a liofilización	
Componentes	Concentraciones
PEG ₁₂₀₀₀ -interferón alfa-2b	0,2 mg/ml *
Succinato de sodio, pH 6,8	10 mM
Rafinosa	57,14 mg/ml
Trehalosa	22,85 mg/ml
Glicina	7,14 mg/ml
Polisorbato 80	0,1 mg/ml
Agua pura	c.s.

* Basado en el peso de proteína

Se llevó a cabo la liofilización de la misma forma que se describe en el Ejemplo 1.

5 Tras la liofilización, se recogieron los frascos y se almacenaron a 5 (± 3) °C hasta que se usaron para el posterior análisis. Se reconstituyeron las muestras con agua para el análisis en distintos periodos de tiempo, como se especifica en la Tabla 8. Se evaluó la claridad visual de las disoluciones reconstituidas. Se evaluó la estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa en cuanto a actividad antivírica in-vitro y la cantidad de interferón libre (grado de des-pegilación) presente en la disolución reconstituida, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

Estabilidad de conjugado PEG-interferón alfa formulado tras liofilización				
Tiempo (meses)	Temp. (± 3 °C)	Potencia (IU/mg)	% de IFN libre	Claridad visual
Inicial		0,38 x 10 ⁸	2,85	CS
3		0,21 x 10 ⁸	2,47	CS
6	5	nd	4,07	CS
9		0,16 x 10 ⁸	6,19	CS

nd – no determinado; CS – disolución transparente

10 Se determinó el contenido IFN en todas las muestras anteriores por medio de cromatografía de HP de exclusión por tamaño.

Las nuevas formulaciones liofilizadas de los conjugados PEG-interferón alfa descritas en la presente invención presentan las siguientes ventajas:

1. implican simplicidad operacional,
2. Estabilizan los conjugados PEG-IFN,
- 15 3. Proporcionan buena resistencia física a la formulación liofilizada,
4. Reducen los ciclos de liofilización, reduciendo de esta forma el coste y el tiempo de operación de manera considerable.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una formulación que comprende un conjugado(s) PEG-interferón alfa, un tampón(es), un estabilizador(es), un crioprotector(es) y un disolvente, en la que dicho crioprotector es rafinosa.
- 2.- La formulación de las reivindicación 1, en la que el estabilizador se escoge entre SDS o polisorbatos apropiados.
- 5 3.- La formulación de la reivindicación 2, en la que el polisorbato se escoge entre polisorbato 20, 40 ó 80.
- 4.- La formulación de la reivindicación 1, en la que el tampón se escoge entre succinato apropiado, fosfato, histidina o tampones de glucinato, bien solos o en combinación.
- 5.- La formulación de la reivindicación 4, en la que el tampón se escoge entre succinato de sodio, succinato de potasio, fosfato de sodio, cloruro de histidina, glucinato de sodio, bien solo o en combinación.
- 10 6.- La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho tampón es succinato de sodio.
- 7.- La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el pH de dicha formulación se encuentra dentro del intervalo de 4,0-7,0.
- 8.- La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el crioprotector comprende además lactosa o trehalosa.
- 15 9.- La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la concentración de dichos conjugados de PEG-interferón alfa es de 0,03 a 2,0 mg de interferón alfa por ml.
- 10.- La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho estabilizador se encuentra presente en una concentración de 0,01 a 1,0 mg/ml.
- 20 11.- La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la concentración de tampón se encuentra dentro del intervalo de 0,001 a 1,0 M.
- 12.- La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la concentración de crioprotector se encuentra entre 10-100 mg/ml.
- 13.- La formulación que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho disolvente es agua.
- 25 14.- La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición además comprende glicina.
- 15.- La formulación de la reivindicación 14, en la que la concentración de glicina se encuentra entre 0,1-100 mg/ml.
- 16.- La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos conjugados de PEG-interferón alfa comprenden de manera predominante moléculas de PEG conjugadas con moléculas sencillas de interferón alfa.
- 30 17.- La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichas moléculas de interferón alfa se escogen entre el grupo que consiste en interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-2c o sus variantes apropiadas.
- 18.- La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichas moléculas de interferón alfa son interferón alfa-2b.
- 35 19.- La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende PEG-interferón alfa-2b, rafinosa como crioprotector, Tween 80 como estabilizador, succinato de sodio como tampón y agua como disolvente.
- 20.- La formulación de la reivindicación 19, en la que el crioprotector además comprende lactosa o trehalosa.
- 21.- Un proceso de liofilización de la formulación que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para obtener un polvo liofilizado.
- 40 22.- Una formulación liofilizada preparada de acuerdo con el proceso de la reivindicación 21.
- 23.- Una formulación que consiste en conjugado(s) de PEF-interferón alfa, tampón(es), estabilizador(es), crioprotector(es) y un disolvente, en la que dicho crioprotector es rafinosa.
- 24.- La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polvo liofilizado se reconstituye con agua antes de la administración.
- 45 25.- Un proceso para preparar una formulación liofilizada de conjugados de PEG-interferón alfa que comprende,

combinar dichos conjugados con un tampón apropiado, un estabilizador apropiado, un crioprotector apropiado y un disolvente, como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho crioprotector es rafinosa y, posteriormente, liofilizar la mezcla para obtener un polvo liofilizado.