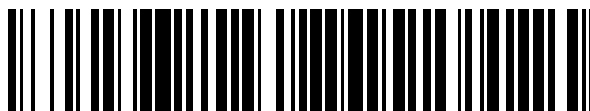


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 530**

51 Int. Cl.:
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04820468 .9**
96 Fecha de presentación: **10.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1691825**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **FORMULACIONES LÍQUIDAS DE INTERFERÓN ESTABILIZADO.**

30 Prioridad:
11.12.2003 EP 03104646
13.07.2004 EP 04103349

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.02.2012

73 Titular/es:
ARES TRADING S.A.
ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ
1170 AUBONNE, CH

72 Inventor/es:
DEL CURTO, Maria, Dorly

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 374 530 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 de interferón estabilizado

Campo de la Invención

5 La invención se refiere a una composición líquida farmacéutica estabilizada que comprende un interferón (IFN-beta) o una de sus sales, donde dicha formulación es una disolución que comprende un tampón acetato, HPBCD, manitol y metionina y donde dicho HPBCD está presente a una razón molar frente a dicho IFN-beta de un exceso molar de 600 veces hasta un exceso molar de 700 veces.

Antecedentes de la Invención

10 Los interferones son citoquinas, esto es, proteínas solubles que transmiten mensajes entre células y juegan un papel esencial en el sistema inmunitario ayudando a destruir los microorganismos que ocasionan infecciones y reparando cualquier daño resultante. Los interferones son secretados naturalmente por las células infectadas y fueron identificados por primera vez en 1957. Su nombre deriva del hecho de que "interfieren" en la replicación y la producción virales.

15 Los interferones muestran actividad tanto antiviral como anti-proliferativa. Basándose en las propiedades bioquímicas e inmunológicas, los interferones humanos de origen natural se agrupan en tres clases principales: Interferón-alfa (leucocitos), Interferón-beta (fibroblastos) e Interferón-gamma (inmunitario). El interferón alfa está actualmente aprobado en los Estados Unidos y otros países para el tratamiento de la leucemia de células pilosas, verrugas venéreas, sarcoma de Kaposi (un cáncer que afecta comúnmente a pacientes aquejados de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)), y hepatitis no A, no B crónica.

20 Adicionalmente, los interferones (IFN) son glicoproteínas producidas por el organismo en respuesta a una infección viral. Inhiben la multiplicación de virus en las células protegidas. Al consistir en una proteína de bajo peso molecular, los IFN tienen una acción notablemente no específica, esto es, el IFN inducido por un virus es eficaz frente a una amplia gama de otros virus. Sin embargo son específicos de la especie, esto es, el IFN producido por una especie solamente estimulará la actividad antiviral en las células de la misma especie o de una especie íntimamente relacionada. Los IFN fueron el primer grupo de citoquinas a explotar por sus potenciales actividades anti-tumorales y antivirales.

25 Los tres IFN principales son referidos como IFN- α , IFN- β e IFN- γ . Dichas clases principales de IFN fueron clasificadas inicialmente de acuerdo con sus células de origen (leucocitos, fibroblastos o células T). Sin embargo, quedó claro que varios tipos podrían ser producidos por una célula. Por tanto el IFN de leucocitos se denomina ahora IFN- α , el IFN de fibroblastos es el IFN- β y el IFN de células T es el IFN- γ . Existe también un cuarto tipo de IFN, el IFN linfoblastoide, producido en la línea celular "Namalwa" (derivada de linfoma de Burkitt), que parece producir una mezcla de IFN de leucocitos y de fibroblastos.

30 La unidad de interferón o la unidad internacional para el interferón (U o UI, para unidad internacional) ha sido referida como una medida de la actividad del IFN definida como la cantidad necesaria para proteger el 50% de las células frente al daño viral. El análisis que se puede utilizar para medir la bioactividad es el análisis de inhibición del efecto citopático descrito (Rubinstein, et al. 1981; *Familletti*, P. C., et al., 1981). En este análisis antiviral para el interferón aproximadamente 1 unidad/ml de interferón es la cantidad necesaria para producir un efecto citopático de 50%. Las unidades se determinan con respecto al patrón de referencia internacional para el Hu-IFN-beta proporcionado por el National Institute of Health (Pestka, S. 1986).

40 Cada clase de IFN contiene varios tipos distintos. Cada uno de IFN- β e IFN- γ es el producto de un único gen.

Las proteínas clasificadas como IFN- α son el grupo más diverso, conteniendo aproximadamente 15 tipos. Existe una agrupación de genes de IFN- α en el cromosoma 9, conteniendo al menos 23 miembros, de los cuales 15 son activos y se transcriben. Los IFN- α maduros no están glicosilados.

45 Los IFN- α e IFN- β tienen la misma longitud (165 o 166 aminoácidos) con actividades biológicas similares. Los IFN- γ tienen 146 aminoácidos de longitud, y se asemejan menos a las clases α y β . Solamente los IFN- γ pueden activar los macrófagos o inducir la maduración de las células T asesinas. Estos nuevos tipos de agentes terapéuticos pueden ser denominados a veces modificadores de la respuesta biológica (MRB), debido a que tienen un efecto sobre la respuesta del organismo frente al tumor, afectando al reconocimiento por medio de la inmunomodulación.

50 El interferón de fibroblastos humanos (IFN- β) tiene actividad antiviral y también puede estimular las células asesinas naturales contra las células neoplásicas. Es un polipéptido de aproximadamente 20.000 Da inducido por virus y ARN de doble hebra. A partir de la secuencia de nucleótidos del gen para el interferón de fibroblastos, clonado mediante tecnología de ADN recombinante, (Derynk et al. 1980) dedujeron la secuencia de aminoácidos completa de la proteína. Tiene 166 aminoácidos de longitud.

Shepard et al. (1981) describieron una mutación en la base 842 (Cys→Tyr a la posición 141) que anulaba su actividad anti-viral, y un clon variante con una delección de los nucleótidos 1119-1121.

5 Mark et al. (1984) insertaron una mutación artificial reemplazando la base 469 (T) por (A) ocasionando un desplazamiento de aminoácidos de Cys→Ser en la posición 17. Se informó de que el IFN-β resultante era tan activo como el IFN-β "nativo" y estable durante el almacenamiento a largo plazo (-70° C.).

Rebif® (Serono - interferón-β humano recombinante), el último avance en terapia con interferón para la esclerosis múltiple (EM), es interferón (IFN)-beta-1a, producido a partir de líneas celulares de mamífero. Su nombre no patentado internacional recomendado (INN por sus siglas en Inglés) es "Interferón beta-1a".

10 Como con todos los fármacos basados en proteínas, un obstáculo principal que debe ser superado en el uso del IFN-beta como agente terapéutico, es la pérdida de eficacia farmacéutica que puede resultar de su inestabilidad en formulaciones farmacéuticas.

15 Las inestabilidades físicas que amenazan la actividad y la eficacia de los polipéptidos en las formulaciones farmacéuticas incluyen la desnaturalización y la formación de agregados solubles e insolubles, si bien las inestabilidades químicas incluyen la hidrólisis, la formación de imidas, la oxidación, la racemización, y la desamidación. Se sabe que algunos de estos cambios conducen a la pérdida o reducción de la actividad farmacéutica de la proteína de interés. En otros casos, los efectos precisos de estos cambios son desconocidos, pero se considera que los productos resultantes de la degradación todavía son farmacéuticamente inaceptables debido al potencial de efectos secundarios indeseables.

20 La estabilización de polipéptidos en las composiciones farmacéuticas permanece en el área en la que la prueba y error juega un papel principal (revisado por Wang (1999) *Int. J. Pharm.* 185:129-188; Wang y Hanson (1988) *J. Parenteral Sci. Tech.* 42:S3-S26). Los excipientes que se añaden a las formulaciones farmacéuticas polipeptídicas para incrementar su estabilidad incluyen tampones, azúcares, tensioactivos, aminoácidos, polietilenglicoles, y polímeros, pero los efectos estabilizadores de estos aditivos químicos varían dependiendo de la proteína.

25 Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos. Las ciclodextrinas más comunes son la alfa-ciclodextrina, que está compuesta por un anillo de seis residuos de glucosa; la beta-ciclodextrina, que está compuesta por un anillo de siete residuos de glucosa; y la gamma-ciclodextrina, que está compuesta por un anillo de ocho unidades de glucosa. La cavidad interna de una ciclodextrina es lipófila, mientras el exterior de la ciclodextrina es hidrófilo; esta combinación de propiedades ha conducido a difundir el estudio de las ciclodextrinas, concretamente en relación con los fármacos, y se ha informado sobre muchos complejos de inclusión. La beta-ciclodextrina ha tenido un interés especial debido al tamaño de su cavidad, pero su solubilidad en agua relativamente baja (aproximadamente 1,8% p/v a 25°C) y la nefrotoxicidad que conlleva han limitado su uso en el campo farmacéutico. Los intentos para modificar las propiedades de las ciclodextrinas naturales han dado como resultado el desarrollo de hepta-(2,6-dimetil)-beta-ciclodextrina, hepta-(2,3,6-tri-O-metil)-beta-ciclodextrina, hidroxipropil-beta-ciclodextrina, polímero de beta-ciclodextrina-epiclorihidrina y otros. Para una revisión exhaustiva de las ciclodextrinas y su uso en la investigación farmacéutica, véase Pitha et al, en *Controlled Drug Deliver*, ed. S. D. Bruck, Vol. I, CRC Press, Boca Raton, Fla., págs. 125-148 (1983). Para una visión general aún más reciente, véase Uekama et al, en *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, Vol. 3 (1), 1-40 (1987); Uekama, en *Topics in Pharmaceutical Sciences* 1987, eds. D. D. Breimer y P. Speiser, Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division), 181-194 (1987); y Pagington, *Chemistry in Britain*, págs. 455-458 (Mayo 1987). El uso de ciclodextrinas específicamente en el campo de la liberación de péptidos y proteínas ha sido revisado por T. Ide et al en *Adv. Drug Deliv. Rev*, Vol 36, 101-123 (1999) y los ejemplos en el caso de la hormona del crecimiento ovina, la interleuquina 2 y la insulina bovina han sido descritos por Brewster et al., 1991, en *Pharmaceutical Research*, 8(6), 792-795.

45 En el documento WO 90/03784 y en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.997.856 se describe un método para la solubilización y/o estabilización de polipéptidos, especialmente proteínas, por medio de ciclodextrinas. No obstante, en este documento no se ha informado sobre datos de la estabilización de los interferones.

En la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.582.728 se describen composiciones de polvo seco para la administración pulmonar que contienen interferón-beta que también contienen albúmina de suero humano, que pueden contener adicionalmente ciclodextrinas. No obstante, incluso en este caso no se informa en el documento sobre datos de estabilización de la composición de interferón que también contiene ciclodextrinas.

50 En el documento WO 2003/002152 se describen composiciones estabilizadas que comprenden una molécula de interferón y un derivado específico de ciclodextrina, esto es, sulfoalquiléterciclodextrina.

Por consiguiente, existe la necesidad de composiciones de IFN-beta adicionales que comprendan estabilizadores fisiológicamente compatibles que mejoren la solubilidad de esta proteína y establezcan la proteína frente a la formación de agregados, aumentando de ese modo su utilidad farmacéutica.

55

Descripción de la Invención

- 5 La presente invención está dirigida a composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas que comprenden (IFN-beta) o una de sus sales donde dicha formulación es una disolución que comprende un tampón acetato, HPBCD, manitol y metionina, de acuerdo con la reivindicación 1 y a un método para preparar dicha composición farmacéutica. Además, se describe un recipiente que comprende dicha composición.
- La composición se prepara preferiblemente en ausencia de albúmina de suero humano (HSA), y de este modo está libre de este excipiente farmacéutico. Esta composición es referida en la presente memoria como composición farmacéutica de IFN "libre de HSA" y comprende un interferón (IFN-beta) o una de sus sales.
- 10 De acuerdo con una realización de la presente invención la composición también comprende un agente bacteriostático.
- Un "interferón-beta" o "IFN-beta", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un IFN- β disponible en el mercado, por ejemplo, como Rebif® (Serono), Avonex® (Biogen) o Betaferon® (Schering). También se prefiere el uso de interferón-beta de origen humano de acuerdo con la presente invención. Se pretende que el término interferón, según se utiliza en la presente memoria, incluya sus sales.
- 15 Se pretende que el término "Interferón-beta (IFN-beta o IFN- β)", según se utiliza en la presente memoria, incluya el interferón de fibroblastos, en particular de origen humano, obtenido mediante aislamiento a partir de fluidos biológicos u obtenido por medio de técnicas de ADN recombinante a partir de células anfitrionas procarionóticas o eucarióticas, así como sus sales, derivados funcionales, variantes, análogos y fragmentos activos. Preferiblemente se pretende que IFN-beta signifique Interferón beta-1a.
- 20 En la presente memoria, el término "sales" hace referencia tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de las proteínas descritas antes o sus análogos. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar mediante métodos conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc, y similares, y las sales con bases orgánicas son aquellas formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de tales sales debe conservar la actividad biológica de la proteína (IFN-beta) relevante para la presente invención, esto es, la capacidad para unirse al correspondiente receptor e iniciar la señalización del receptor.
- 25 De acuerdo con la presente invención, el uso del IFN-beta humano recombinante es más particularmente preferido.
- 30 La dosificación administrada, en forma de una única dosis o de múltiples dosis, a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, la ruta de administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), el grado de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado.
- Las dosificaciones convencionales de IFN-beta humano oscilan entre 80.000 UI/kg y 200.000 UI/kg por día o 6 MUI (millones de unidades internacionales) y 12 MUI por persona por día o de 22 a 44 μ g (microgramos) por persona. De acuerdo con la presente invención, el IFN se puede administrar preferiblemente a una dosificación de aproximadamente 1 a 50 μ g, más preferiblemente de aproximadamente 10 a 30 μ g o de aproximadamente 10 a 20 μ g por persona por día.
- 35 La administración de los ingredientes activos de acuerdo con la presente invención puede ser por medio de la ruta intravenosa, intramuscular o subcutánea. La ruta de administración preferida para el IFN-beta es la ruta subcutánea.
- El IFN también se puede administrar diariamente o en días alternos, o menos frecuentemente. Preferiblemente, el IFN se administra una, dos o tres veces por semana.
- 40 La ruta de administración preferida es la administración subcutánea, administrada, p. ej., tres veces a la semana. Una ruta de administración adicionalmente preferida es la administración intramuscular, que puede ser aplicada, p. ej., una vez a la semana.
- 45 La dosificación del IFN- β en el tratamiento de recaída-remisión de la EM de acuerdo con la invención depende del tipo de IFN- β utilizado.
- De acuerdo con la presente invención, en la que el IFN-beta es IFN- β 1b recombinante producido en *E. Coli*, disponible en el mercado con la marca registrada Betaseron®, éste se puede administrar preferiblemente subcutáneamente día por medio a una dosificación de aproximadamente 250 a 300 μ g o 8 MUI a 9,6 MUI por persona.
- 50 De acuerdo con la presente invención, en la que el IFN-beta es IFN- β 1a recombinante, producido en células de ovario de hámster Chino (células CHO), disponible en el mercado con el nombre de fábrica Avonex®, éste se puede

administrar preferiblemente intramuscularmente una vez a la semana a una dosificación de aproximadamente 30 µg a 33 µg o 6 MUI a 6,6 MUI por persona.

5 De acuerdo con la presente invención, cuando el IFN-beta es IFN-β1a recombinante, producido en células de Ovario de Hámster Chino (células CHO), disponible en el mercado con el nombre de fábrica Rebif®, éste puede ser administrado preferiblemente sub-cutáneamente tres veces a la semana (TVS) a una dosificación de 22 a 44 µg o 6 MUI a 12 MUI por persona.

10 El término "estabilidad" hace referencia a la estabilidad física, química, y conformacional de las formulaciones de interferón de la presente invención (incluyendo la conservación de la potencia biológica). La inestabilidad de una formulación de proteína puede estar ocasionada por la degradación química o la agregación de las moléculas de proteína para formar polímeros de mayor orden, la desglicosilación, la modificación de la glicosilación, la oxidación o cualquier otra modificación estructural que reduzca al menos una actividad biológica de un polipéptido de interferón incluido en la presente invención.

15 Una disolución o formulación "estable" o "estabilizada", es aquella en la que el grado de degradación, modificación, agregación, pérdida de actividad biológica y similares, de las proteínas de la misma está aceptablemente controlado, y no se incrementa de manera inaceptable con el tiempo. Preferiblemente la formulación conserva al menos 60% o aproximadamente 60%, más preferiblemente al menos 70% o aproximadamente 70%, muy preferiblemente al menos 80% o aproximadamente 80% de la actividad del interferón marcado a lo largo de un período de 24 meses. Las composiciones de IFN-beta estabilizadas de la invención tienen preferiblemente una vida útil de al menos aproximadamente 6 meses, 12 meses, 18 meses, más preferiblemente al menos 20 meses, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 22 meses, muy preferiblemente al menos aproximadamente 24 meses cuando se almacenan a 2-8°C

20 Los métodos para verificar la estabilidad de las composiciones farmacéuticas de IFN-beta de la invención se encuentran disponibles en la técnica, incluyendo aquellos métodos revelados en los ejemplos descritos en la presente memoria. De este modo, la formación de agregados de IFN-beta durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida de la invención se puede determinar fácilmente midiendo el cambio en el IFN-beta soluble en la disolución a lo largo del tiempo. La cantidad de polipéptido soluble en la disolución se puede cuantificar mediante numerosos ensayos analíticos adaptados para la detección del IFN-beta. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)-HPLC y la espectroscopía de absorción UV, como se describe en los Ejemplos más abajo.

25 La determinación de agregados tanto solubles como insolubles durante el almacenamiento en las formulaciones líquidas se puede lograr, por ejemplo, utilizando la ultracentrifugación analítica como se observa en los Ejemplos más abajo para distinguir entre aquella porción del polipéptido soluble que está presente en forma de agregados solubles y aquella porción que está presente en la forma molecular biológicamente activa, no agregada.

30 Se pretende que la expresión "uso de múltiples dosis" incluya el uso de un único vial, ampolla o cartucho de una formulación de interferón para más de una inyección, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o más inyecciones. Las inyecciones se pueden aplicar preferiblemente lo largo de un período de al menos 12 horas, 24 horas, 48 horas o aproximadamente 12 horas, 24 horas, 48 horas, etc., preferiblemente hasta un período de 12 días o aproximadamente 12 días. Las inyecciones se pueden espaciar en el tiempo, por ejemplo, por un período de 6, 12, 24, 48 o 72 horas.

35 El término "tampón" o "tampón fisiológicamente aceptable" hace referencia a disoluciones de compuestos que son conocidos por ser seguros para el uso farmacéutico o veterinario en formulaciones y que tienen el efecto de mantener o controlar el pH de la formulación en el intervalo de pH deseado para la formulación. Los tampones aceptables para controlar el pH de un pH moderadamente ácido a un pH moderadamente alcalino incluyen, pero no están limitados a, compuestos tales como fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS, e histidina. "TRIS" hace referencia a 2-amino 2-hidroximetil-1,3-propanodiol, y a cualquier sal farmacológicamente aceptable del mismo. El tampón utilizado en la presente invención es un tampón de acetato.

40 Las "ciclodextrinas" hacen referencia a los derivados hidroxipropílicos, hidroxietílicos, glucosílicos, maltosílicos y maltotriosílicos de beta-ciclodextrina y los correspondientes derivados de gamma-ciclodextrina. Los agrupamientos hidroxialquílicos pueden contener uno o más grupos hidroxilo, p. ej. hidroxipropilo (2-hidroxipropilo, 3-hidroxipropilo), dihidroxipropilo y similares. Los derivados glucosílicos, maltosílicos y maltotriosílicos pueden contener uno o más residuos de azúcar, p. ej. glucosilo o diglucosilo, maltosilo o dimaltosilo, o diversas mezclas de los derivados de ciclodextrina, p. ej. una mezcla de derivados maltosílicos y dimaltosílicos. El derivado de ciclodextrina utilizado en la presente invención es 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPBCD)

45 El tampón utilizado se encuentra disponible en el mercado o se puede preparar mediante métodos conocidos, especialmente por medio del uso del procedimiento optimizado de Pitha et al, *International Journal of Pharmaceutics*, 29, 73-82 (1986).

Un "agente de isotonicidad" hace referencia a un compuesto que es tolerado fisiológicamente y confiere una tonicidad adecuada a una formulación para prevenir el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con la formulación. Los compuestos tales como la glicerina, son utilizados comúnmente para tales

finas a concentraciones conocidas. Otros agentes de isotonicidad adecuados incluyen, pero no están limitados a, aminoácidos o proteínas (p. ej., glicina o albúmina), sales (p. ej., cloruro de sodio), y azúcares (p. ej., dextrosa, manitol, sacarosa y lactosa). El agente de isotonicidad utilizado en la presente invención es el manitol.

5 El término "antioxidante" hace referencia a un compuesto que evita que el oxígeno y los radicales libres derivados del oxígeno interaccionen con otras sustancias. Los antioxidantes se encuentran entre un número de excipientes comúnmente añadidos a los sistemas farmacéuticos para aumentar la estabilidad física y química. Los antioxidantes se añaden para minimizar o retardar la aparición de procesos oxidativos con algunos fármacos o excipientes después de la exposición a oxígeno en presencia de radicales libres. Estos procesos pueden estar catalizados a menudo por la luz, la temperatura, la concentración de hidrógeno, la presencia de metales vestigiales o peróxidos.
10 Con frecuencia se utilizan sulfitos, bisulfitos, tiourea, metionina, sales de ácido etilenediaminotetraacético (EDTA), hidroxitolueno butilado (BHT), e hidroxianisol butilado (BHA) como antioxidantes en los fármacos. Se ha encontrado que el EDTA sódico intensifica la actividad de los antioxidantes quelando los iones metálicos que de otro modo catalizarían la reacción de oxidación. El antioxidante utilizado en la presente invención es la metionina.

15 El término "bacterostático" hace referencia a un compuesto o a composiciones añadidas a una formulación para que actúe como agente anti-bacteriano. Una formulación que contiene interferón conservado de la presente invención satisface preferiblemente las pautas establecidas por la ley o reguladoras para la eficacia del conservante para que sea un producto de múltiples usos viable comercialmente. Los ejemplos de los bacteriostáticos incluyen fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorcresol, alcohol bencílico, alquil-parabeno (metil-, etil-, propil-, butil- y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal. Preferiblemente el agente bacteriostático es el alcohol bencílico.
20

La invención proporciona una composición farmacéutica líquida estabilizada de acuerdo con la reivindicación 1.

En una realización adicionalmente preferida de la invención el IFN-beta es IFN-beta humano recombinante.

25 En otra realización preferida, la invención proporciona la composición farmacéutica líquida estabilizada en la que dicho tampón está presente en una cantidad suficiente para mantener el pH de dicha composición a más o menos 0,5 unidades de un pH especificado, donde el pH especificado es de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, tal como un valor de pH de 3,0 o aproximadamente 3,0 a aproximadamente 6,0, incluyendo un valor de pH de 3,8 o aproximadamente 3,8.

30 En otra realización preferida, la invención proporciona la composición farmacéutica líquida estabilizada donde dicho tampón está presente a una concentración de aproximadamente 5 mM a 500 mM tal como una concentración de 50 mM o aproximadamente 50 mM.

En otra realización preferida, la invención proporciona la composición farmacéutica líquida estabilizada donde dicho agente de isotonicidad está presente a una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, tal como una concentración de 50 mg/ml o aproximadamente 50 mg/ml.

35 En otra realización preferida, la invención proporciona la composición farmacéutica líquida estabilizada en la que dicha metionina está presente a una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/ml, incluyendo concentraciones de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5,0 mg/ml, tal como una concentración de 0,1 mg/ml o aproximadamente 0,1 mg/ml.

40 En otra realización preferida, la invención proporciona la composición farmacéutica líquida estabilizada en la que dicho interferón-beta está presente a una concentración de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 800 µg/ml, tal como una concentración de 44, 88 o 276 µg/ml o aproximadamente 44, 88 o 276 µg/ml.

En otra realización preferida, la invención proporciona la composición farmacéutica líquida estabilizada en la que dicha composición es una disolución acuosa.

45 En otra realización preferida, la invención proporciona una composición farmacéutica líquida estabilizada en la que la composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprende adicionalmente un agente bacteriostático tal como alcohol bencílico.

50 En otra realización preferida, la invención proporciona una composición farmacéutica líquida estabilizada en la que la composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprende adicionalmente un agente bacteriostático y en la que dicho agente bacteriostático está presente a una concentración de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2%, incluyendo concentraciones de 0,1% o aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2,0%, tal como concentraciones de 0,2 o aproximadamente 0,2 o aproximadamente 0,3%.

En otra realización adicionalmente preferida, la invención proporciona una composición farmacéutica líquida estabilizada en la que la composición tiene la siguiente formulación líquida:

Interferón beta-1a	44	µg/mL
HPBCD	1,9	mg/mL
Metionina	0,1	mg/mL
Manitol	50	mg/mL
tampón acetato hasta	1	mL

5 En otra realización, la invención proporciona un método para preparar una composición farmacéutica líquida estabilizada de acuerdo con la invención, donde dicho método comprende añadir cantidades calculadas de 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina, antioxidante y agente de isotonicidad a la disolución tamponada y después añadir el interferón (IFN-beta) o una de sus sales.

En otra realización, la invención proporciona un recipiente herméticamente sellado en condiciones estériles y apropiadas para el almacenamiento antes de su uso, que comprende la formulación farmacéutica líquida de acuerdo con la invención. Son ejemplos de semejante recipiente un vial o un cartucho para un autoinyector. Los recipientes de acuerdo con la invención son para la administración de mono-dosis o de múltiples dosis.

10 En una realización preferida, la invención proporciona un recipiente de acuerdo con la invención donde dicho recipiente es una jeringa precargada para la administración de monodosis.

15 En otra realización, la invención proporciona un kit para la administración de múltiples dosis de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, donde el kit comprende un primer recipiente cargado con una composición farmacéutica de acuerdo con la invención y un segundo cartucho cargado con una disolución de agente bacteriostático.

Preferiblemente la concentración de IFN beta en la formulación es de 10 µg/ml o aproximadamente 10 µg/ml a 800 µg/ml o aproximadamente 800 µg/ml, más preferiblemente de 20 µg/ml o aproximadamente 20 µg/ml a 500 µg/ml o aproximadamente 500 µg/ml, más concretamente preferiblemente de 30 o aproximadamente 30 a 300 o aproximadamente 300, muy preferiblemente a 44, 88 o 264 µg/ml o aproximadamente 44, 88 o 264 µg/ml.

20 Preferiblemente las formulaciones de la presente invención tienen un pH entre aproximadamente 3,0 y 4,5 o de aproximadamente 4,5, más preferiblemente 3,8 o aproximadamente 3,8. Un tampón preferido es acetato, siendo los contraiones preferidos los iones sodio o potasio. Los tampones salinos de acetato son bien conocidos en la técnica. Las concentraciones de tampón en la disolución total pueden variar entre 5 mM, 9,5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, y 500 mM o aproximadamente 5 mM, 9,5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, y 500 mM. Preferiblemente la concentración de tampón es 10 mM o aproximadamente 10 mM. Es particularmente preferido un tampón 50 mM en iones acetato con un pH de 3,8.

25 Preferiblemente en la composición de la invención, la metionina está presente a una concentración de 0,01 o aproximadamente 0,01 a 5 mg/ml o aproximadamente 5 mg/ml, más preferiblemente de 0,05 o aproximadamente 0,05 a 0,3 mg/ml o aproximadamente 0,3 mg/ml, muy preferiblemente a 0,1 mg/ml o aproximadamente 0,1 mg/ml.

30 Preferiblemente la concentración de manitol en las formulaciones líquidas es de 0,5 mg/ml o aproximadamente 0,5 mg/ml a 500 mg/ml o aproximadamente 500 mg/ml, más preferiblemente de 1 mg/ml o aproximadamente 1 mg/ml a 250 mg/ml o aproximadamente 250 mg/ml, más concretamente preferiblemente de 10 mg/ml o aproximadamente 10 mg/ml a 100 mg/ml o aproximadamente 100 mg/ml, muy preferiblemente de 50 mg/ml o aproximadamente 50 mg/ml.

35 En otra realización preferida, la invención proporciona una composición de acuerdo con la invención en la que la composición líquida es la siguiente:

Interferón beta-1a	44	µg/mL
HPBCD	1,9	mg/mL
Metionina	0,1	mg/mL
Manitol	50	mg/mL
tampón acetato hasta	1	mL

La invención incluye formulaciones líquidas. El disolvente preferido es agua para inyectables.

5 Las formulaciones líquidas pueden ser para monodosis o múltiples dosis. Aquellas formulaciones líquidas de interferón de la invención que están destinadas a un uso en múltiples dosis comprenden preferiblemente un agente bacteriostático, tal como fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquil-parabeno (metil-, etil-, propil-, butil- y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal. Son particularmente preferidos fenol, alcohol bencílico y m-cresol, es más preferido el alcohol bencílico. El agente bacteriostático se utiliza en una cantidad que produzca una concentración que sea eficaz para mantener la formulación esencialmente libre de bacterias (adecuada para inyectables) a lo largo del período de inyección de las múltiples dosis, que puede ser de 12 o 24 horas o aproximadamente 12 o 24 horas hasta 12 días o aproximadamente 12 días, preferiblemente de 6 o aproximadamente 6 a 12 o aproximadamente 12 días. El agente bacteriostático está presente preferiblemente a una concentración de 0,1% o aproximadamente 0,1% (masa de agente bacteriostático/masa de disolvente) a 2,0% o aproximadamente 2,0%, más preferiblemente de 0,2% o aproximadamente 0,2% a 1,0% o aproximadamente 1,0%. En el caso del alcohol bencílico, son particularmente preferidas concentraciones de 0,2 o 0,3%).

15 El agente bacteriostático también puede estar presente en formulaciones para monodosis.

El intervalo de interferón en la formulaciones de la invención incluye cantidades que producen, tras la reconstitución, concentraciones de aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, aunque son operables concentraciones más bajas y más altas y dependen del vehículo de liberación pretendido, p. ej., las formulaciones en disolución diferirán del parche transdérmico, pulmonar, transmucosal, u osmótico o de los métodos con microbombas. La concentración de interferón es preferiblemente de 5 µg/ml o aproximadamente 5 µg/ml a 2 mg/ml o aproximadamente 2 mg/ml, más preferiblemente de 10 µg/ml o aproximadamente 10 µg/ml a 1 mg/ml o aproximadamente 1 mg/ml, muy preferiblemente de 30 µg/ml o aproximadamente 30 µg/ml a 100 µg/ml o aproximadamente 100 µg/ml.

25 Preferiblemente las formulaciones de la invención conservan al menos 60% o aproximadamente 60%, más preferiblemente al menos 70% o aproximadamente 70%, muy preferiblemente al menos 80% o aproximadamente 80% de la actividad del interferón en el momento del envasado a lo largo de un período de 24 meses.

En una realización adicionalmente preferida, la invención proporciona un método para preparar una composición farmacéutica líquida como se ha descrito antes.

30 En un caso de la presente descripción, se describe un método para manufacturar una composición farmacéutica empaquetada que comprende colocar una disolución que comprende el ingrediente activo y los excipientes como se ha descrito antes.

En otro caso de la presente descripción, se describe un artículo de manufactura para uso farmacéutico humano, que comprende un vial que incluye las composiciones farmacéuticas descritas antes, material escrito que establezca que dicha disolución se puede conservar durante un período de tiempo de veinticuatro horas o aproximadamente veinticuatro horas o más después del primer uso. Preferiblemente el material escrito establece que la disolución se puede conservar hasta 12 días o aproximadamente 12 días.

40 Después del primer uso de una formulación de múltiples dosis, ésta se puede guardar y utilizar durante al menos 24 horas o aproximadamente 24 horas, preferiblemente al menos 4, 5 o 6 días o aproximadamente 4, 5 o 6 días, más preferiblemente hasta 12 días. Después del primer uso la formulación se almacena preferiblemente por debajo de la temperatura ambiente (esto es, por debajo de 25°C o aproximadamente 25°C), más preferiblemente por debajo de 10°C o aproximadamente 10°C, más preferiblemente a 2-8°C o aproximadamente 2-8°C, muy preferiblemente a 5°C o aproximadamente 5°C

Las formulaciones de la presente invención se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende añadir las cantidades calculadas de los excipientes a la disolución tamponada y después añadir el interferón-beta.

45 La disolución resultante se coloca después en viales, ampollas o cartuchos. Las variaciones de este procedimiento serán reconocidas por un experto normal en la técnica. Por ejemplo, el orden en el que los componentes son añadidos, que se utilicen otros aditivos, la temperatura y el pH a los cuales se prepara la formulación, son todos factores que pueden ser optimizados para la concentración y los medios de administración utilizados.

50 En el caso de una formulación para uso en múltiples dosis, el agente bacteriostático se puede añadir a la disolución que contiene el ingrediente activo (interferón-beta) o alternativamente se puede mantener en un vial o cartucho separado y mezclarlo con posterioridad con la disolución que contiene el ingrediente activo en el momento de su uso.

55 Las formulaciones de la invención se pueden administrar utilizando dispositivos reconocidos. Los ejemplos que comprenden estos sistemas de viales individuales incluyen dispositivos autoinyectores o inyectores de bolígrafo para la liberación de una disolución tal como Rebiject®.

Los productos reivindicados ahora incluyen el material de envasado. El material de envasado proporciona, además de la información requerida por las agencias reguladoras, las condiciones en las cuales se puede utilizar el producto. El material de envasado de la presente invención proporciona instrucciones para el paciente, si fuera necesario, para preparar la disolución final y para utilizar dicha disolución final a lo largo de un período de veinticuatro horas o más para el producto húmedo/seco, de dos viales. Para el producto de disolución de un solo vial, la etiqueta indica que dicha disolución se puede utilizar a lo largo de un período de veinticuatro horas o más. Los productos reivindicados ahora son útiles para su uso en productos farmacéuticos humanos.

Las formulaciones conservadas estables se pueden proporcionar a los pacientes en forma de soluciones claras. La disolución puede ser para un solo uso o se puede reutilizar múltiples veces y puede bastar para un solo ciclo o para múltiples ciclos de tratamiento del paciente y de ese modo proporciona un régimen de tratamiento más conveniente que el disponible en la actualidad.

El interferón, en cualquiera de las formulaciones o soluciones estables o conservadas descritas en la presente memoria, puede ser administrado a un paciente de acuerdo con la presente invención a través de una variedad de métodos de liberación incluyendo la inyección SC o IM; transdérmica, pulmonar, transmucosal, implante, bomba osmótica, cartucho, micro-bomba, oral, u otros medios apreciados por el experto en la técnica, como es bien sabido en la técnica.

El término "vial" hace referencia en sentido amplio a un reservorio utilizado para retener el interferón en forma sólida o líquida en un estado estéril contenido. Los ejemplos de viales según se utiliza en la presente memoria incluyen ampollas, cartuchos, envases de tipo burbuja, u otros reservorios semejantes adecuados para la liberación del interferón al paciente por medio de una jeringa, bomba (incluyendo osmótica), catéter, parche transdérmico, pulverización pulmonar o transmucosal. Los viales adecuados para los productos envasados para la administración parenteral, pulmonar, transmucosal, o transdérmica son bien conocidos y admitidos en la técnica.

Descripción de las Figuras (Ejemplos Comparativos)

Figura 1: muestra la cinética de agregación del interferón beta-1 a 0,116 mg/mL (5,16 μ M) en PEG/PBS, después de la incubación a 62+/-2°C 10 min., en presencia de diferentes concentraciones de HPBCD: 1,19 mg/mL (exceso molar de 150 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a), 3,97 mg/mL (exceso molar de 500 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a), 5,56 mg/mL (exceso molar de 700 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a) y 7,94 mg/mL (exceso molar de 1000 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a). En el eje de las Y se informa sobre la densidad óptica medida a 360 nm que es directamente proporcional a la turbidimetría (Cancellieri et al, *BIOPOLYMERS*, VOL 13, 735-743,1974).

Figura 2: muestra el efecto de un exceso molar de 10.000, 20.000 y 40.000 de manitol sobre la agregación de 0,116 mg/mL (5,1 μ M) de interferón beta-1a en PBS/PEG 10000 (después de la incubación a 62 \pm 3°C 10 min).

Figura 3: muestra la cinética de agregación del interferón beta-1a en presencia de diferentes concentraciones de L-metionina: 0,077 mg/mL (exceso molar de 100 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a), 0,158 mg/mL (exceso molar de 205 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a), 0,308 mg/mL (exceso molar de 400 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a), 0,769 mg/mL (exceso molar de 1000 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a) y 7,69 mg/mL (exceso molar de 10000 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a).

Figura 4: muestra la cinética de agregación del interferón beta-1a solo y en presencia de un exceso molar de 400 veces de metionina con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a (0,308 mg/mL) y/o un exceso molar de 700 veces de HPBCD con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a (5,56 mg/mL).

Figura 5: muestra el efecto de un exceso molar de 50 veces de L-ascorbato con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a (0,045 mg/mL), un exceso molar de 150 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a (0,136 mg/mL), un exceso molar de 500 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a (0,453 mg/mL) y un exceso molar de 10000 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a (9,07 mg/mL) sobre la agregación del interferón beta-1a 0,116 mg/mL (5,16 μ M) en PEG/PBS, después de la incubación a 62+/-2°C, 10 minutos.

Figura 6: informa sobre la desnaturalización térmica del interferón beta-1a en masa (aproximadamente 44 μ g/mL) (esto es, el efecto de la temperatura sobre la señal DC a 222 nm) en la porción superior de la figura y el espectro de DC relativo antes (línea continua) y después (línea discontinua) la transición de fusión en la porción inferior de la figura. En adelante se informa de las respectivas desconvoluciones de CDNN (Red Neural de Dicroismo Circular) (media de cuatro análisis).

N.B.: La curva de transición de fusión o desnaturalización térmica representa el efecto de la temperatura sobre la señal de DC a 222 nm. Todos los gráficos de DC tienen en el eje de la Y la elipticidad molar en forma de grados $M^{-1} cm^{-1}$ (eje Y)

En la tabla se ha considerado la hélice alfa residual en el intervalo de 200-260 nm para la comparación de la estabilidad conformacional de IFN en las desconvoluciones CDNN pre/post fusión (media de cuatro análisis).

5 Figura 7: se informa sobre la curva de desnaturalización térmica para una disolución que contiene interferón beta-1a aproximadamente 44 µg/mL y HPBCD 2,11 mg/mL (exceso molar de 700 veces con respecto a la cantidad molar del interferón beta-1a), esto es, el efecto de la temperatura sobre la señal de DC a 222 nm, expresado como la elipticidad molar, grados $M^{-1} cm^{-1}$. En la parte superior de la figura (línea continua), comparado con la proteína sola (línea discontinua) y el espectro de DC relativo antes (línea continua) y después (línea discontinua) de la transición de fusión en la parte inferior de la figura. En adelante se informa sobre las respectivas desconvoluciones de CDNN (Red Neural de Dicroísmo Circular) (media de tres análisis).

10 Figura 8: muestra la desnaturalización térmica del interferón beta-1a solo (curva discontinua) y en presencia de un exceso molar de 500 veces de L-ascorbato de Na con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a (curva continua).

Figura 9: muestra el espectro de DC [interferón beta-1a/ascorbato 500×] antes (curva continua) y después (curva discontinua) de la transición de fusión y las respectivas desconvoluciones CDNN (véase más arriba).

15 Figura 10: muestra la cinética de agregación del interferón beta-1a 0,116 mg/mL (5,16 µM) en PEG/PBS (pH final = 4,7) después de la incubación a 62 +/- 2°C 10 min. y el efecto de un exceso M de 700× de HPBCD (5,56 mg/mL). En el eje de la Y se informa sobre la densidad óptica medida a 360 nm que es directamente proporcional a la turbidimetría.

20 Figura 11: muestra la cinética de agregación del interferón beta-1a 0,116 mg/mL (5,16 µM) en PEG/PBS (pH final = 5,1) después de la incubación a 62 +/- 2°C 10 min. y el efecto de un exceso M de 700× de HPBCD (5,56 mg/mL) y un exceso M de 500× de RMBCD (3,38 mg/mL).

Figura 12: muestra la cinética de agregación del interferón beta-1a 0,116 mg/mL (5,16 µM) en PEG/PBS (pH final = 5,7) después de la incubación a 62 +/- 2°C 10 min. y el efecto de un exceso M de 700× de HPBCD (5,56 mg/mL).

Ejemplos Comparativos:

25 Las siguientes abreviaturas hacen referencia respectivamente a las definiciones de más abajo:

30 cm (centímetro), mg (miligramo), µg (microgramo), min (minuto), mM (milimolar), mL (mililitro), nm (nanómetro), BHT (hidroxitolueno butilado), DC (Dicroísmo Circular), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), HPBCD (Hidroxipropil-beta-ciclodextrina), HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución), IFN (interferón), IM (intra-muscular), DO (Densidad Óptica), PBS (Solución Salina tamponada con Fosfato), PEG (Polietilenglicol), RMBCD (metil-beta-ciclodextrina sustituida al azar), SC (subcutáneo), TFA (ácido trifluoro-acético), TRIS (2-amino 2-hidroximetil-1,3 propanodiol, UV (Ultravioleta), WFI (Agua para Inyectables).

Métodos

Medidas de la Turbidimetría

35 La agregación de proteínas se controló durante 30 minutos a 360 nm utilizando un sistema espectrofotométrico UV-visible (Perkin Elmer Lambda 40).

Los estudios preliminares establecieron las condiciones operativas en las cuales la proteína presenta un comportamiento de agregación apropiado, esto es dilución del interferón beta-1a en masa 1:2 con una disolución de PEG 10.000 30 mg/mL en PBS (filtrado con 0,2 µm Ø), en un vial de polipropileno, seguido de incubación en un baño de agua termostático a T= 62 ± 2°C durante 10 min.

40 Se utilizaron el calentamiento y el PEG con el fin de intensificar el proceso de asociación de proteínas a través de la desnaturalización térmica y el efecto del volumen de exclusión, respectivamente. El análisis de UV visible se realizó en una célula que contenía un volumen de muestra de 3 mL (concentración final de interferón beta-1a = 0,116 mg/mL).

45 Cada análisis de la turbidez se repitió al menos por triplicado y se informó sobre la densidad óptica (DO)_{360nm} frente a la curva de tiempo medio. Se comparó la agregación de la proteína sola con la del interferón beta-1a en presencia de excipientes a diferentes concentraciones.

Medidas del Dicroísmo Circular

50 Se realizaron las medidas del DC con un espectropolarímetro Jasco J810 equipado con un controlador de la temperatura Peltier. Las muestras estaban contenidas en una célula de cuarzo de 1 cm tapada y, para los barridos térmicos, la tasa de agitación magnética fue de aproximadamente 150 rpm.

Para el espectro de UV lejano (260-185 nm), se emplearon una concentración de proteína de aproximadamente 44 µg/mL, una resolución de 0,2 nm y una velocidad de barrido de 2 nm/min con un tiempo de respuesta de 2 segundos y 3 acumulaciones.

- 5 Con el fin de controlar la perturbación térmica de la estructura secundaria del interferón beta-1a, se realizó un seguimiento de la señal de DC a 222 nm como una función de la temperatura entre 25°C y 85°C a intervalos de 0,2°C, utilizando una tasa de aumento de la temperatura de 1°C/min y un tiempo de demora de 60 segundos.

Cada medida se realizó al menos por triplicado sobre interferón beta-1a en masa, como control, y sobre disoluciones de interferón beta-1a que contenían diferentes concentraciones de excipientes.

Análisis de Cromatografía de Exclusión por Tamaños (Sec)

- 10 Se analizaron formulaciones líquidas de interferón beta-1a en momentos puntuales previamente fijados de los estudios de estabilidad, mediante SE-HPLC con el fin de determinar la pureza del interferón beta-1a y analizarla (expresada como % de recuperación).

Las condiciones operativas utilizadas fueron:

- columna cromatográfica: TSK G2000 SW_{XL} (7,8 mm DI × 30 cm, 5 µ, 125);
- 15 - volumen de la inyección: 100 µL;
- temperatura de la columna: temperatura ambiente;
- temperatura de la muestra: temperatura ambiente;
- velocidad de flujo: 0,5 mL/min;
- fase móvil: agua purificada al 70% v/v (MILLIQ-Millipore) – acetonitrilo al 30% v/v – TFA al 0,2% v/v;
- 20 - tiempo de proceso: 27 min;
- tiempo de equilibrado: 3 min;
- longitud de onda: 214 nm;
- Se empleó una curva de calibración, que oscilaba de 25 µg a 10 µg, para cuantificar el análisis del interferón beta-1a

25

Materiales

- Interferón beta-1a en masa (Serono S. A., lote G4D024)
- PEG 10000 (polietilenglicol)
- Lutrol F68 (copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno)
- 30 - L-Metionina
- D-Manitol
- Ácido L-ascórbico
- Solución Salina Tamponada con Fosfato pH del tampón 7,4 ± 0,1 (composición: KH₂PO₄ 0,19 g/L, Na₂HPO₄.12H₂O 2,38 g/L, NaCl 8 g/L)
- 35 - Hidroxipropil-beta-ciclodextrina

Equipo

- Sistemas de HPLC (Waters y PE) equipado con una columna TSK G2000.
- Sistema espectrofotométrico UV-visible (Perkin Elmer Lambda 40)
- Espectropolarímetro Jasco J810 equipado con un controlador de la temperatura Peltier
- 40 - Osmómetro (OSMOMAT 030D, Gonotech)

- Medidor de la conductividad con el pH MPC 227-Mettler Toledo
 - Equilibrio analítico AG 245 y AG 285 (Mettler Toledo)
 - Pipetas calibradas (Gilson)
 - Placa caliente con agitador magnético (Stuart Scientific)
- 5 - Baño ultrasónico, Falc
- Termómetros

Resultados y Discusión

10 Análisis de Turbidimetría

Más abajo se informa sobre el efecto de la agregación de la HPBCD, el manitol y la L-metionina en el interferón beta-1a, detectado mediante un método de turbidez. También se incluye sal ascorbato de sodio como ejemplo de excipiente que tiene un efecto de intensificación de la agregación.

15 La Figura 1 muestra la cinética de agregación del interferón beta-1a en presencia de diferentes concentraciones de HPBCD: 1,9 mg/mL (exceso molar de 150 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a), 3,97 mg/mL (exceso molar de 500 veces), 5,56 mg/mL (exceso molar de 700 veces) y 7,94 mg/mL (exceso molar de 1.000 veces). Se puede observar que en el intervalo de concentración investigado este excipiente no evita completamente la desestabilización del interferón beta-1a y que las razones molares intermedias muestran el mejor efecto inhibitor.

20

Se eligió un exceso molar de 700 veces como concentración de referencia para la preparación de la formulación de interferón beta-1a y posterior caracterización físico-química (p. ej. dicroísmo circular). La concentración de ciclodextrina se expresa mejor en forma de una razón molar frente al interferón beta-1a (exceso molar en veces) a medida que la concentración varía dependiendo de la cantidad de interferón beta-1a utilizada en la preparación y por consiguiente se puede calcular.

25

La influencia del manitol sobre la agregación de interferón beta-1a se controló después pero no se encontró un efecto significativo ni siquiera a un exceso molar de 40.000 veces (correspondiente a 37,35 mg/mL) en las condiciones utilizadas (62°C en PEG/PBS), como se muestra en la Figura 2.

30 No obstante se añadió manitol a formulaciones líquidas de interferón beta-1a con el fin de alcanzar la isotonicidad necesaria para la administración parenteral.

Finalmente, se sometió a ensayo la L-Metionina en un experimento de turbidimetría. La Figura 3 muestra la cinética de agregación del interferón beta-1a (0,116 mg/mL, en PEG/PBS, después de la incubación a 62 +/- 2°C, 10') en presencia de diferentes concentraciones de L-metionina.

35 Se puede observar que la L-metionina tiene menos efecto inhibitor sobre la agregación de proteínas que la HPBCD: incluso a la máxima concentración investigada no evita completamente la desestabilización del interferón beta-1a y la curva alcanza una "meseta" similar a la de control de interferón beta-1a.

En la Figura 4, se informa sobre la cinética de agregación del interferón beta-1a solo en presencia de un exceso molar de 400 veces de metionina (0,308 mg/mL) y/o un exceso molar de 700 veces de HPBCD (5,56 mg/mL).

40 Este experimento se llevó a cabo con el fin de evaluar eventualmente un efecto sinérgico o la interferencia de estos dos excipientes. Esta claro que la metionina no ejerce un efecto protector frente a la agregación de proteínas además de la actividad de la ciclodextrina.

Después de las consideraciones anteriores se confirmó que la HPBCD estaba jugando un papel principal en la estabilización del interferón beta-1a hacia la agregación y se investigó adicionalmente la interacción entre la proteína y la ciclodextrina por medio del dicroísmo circular

45 Como ejemplo de excipiente que tiene un "efecto negativo" sobre la agregación de proteínas en la Figura 5 se informa sobre la cinética de turbidez del interferón beta-1a en presencia de diferentes concentraciones de sal ascorbato.

El efecto de un exceso molar de 50 veces de L-ascorbato (0,045 mg/mL), un exceso molar de 150 veces (0,136 mg/mL), un exceso molar de 500 veces (0,453 mg/mL) y un exceso molar de 10.000 veces (9,07 mg/mL) sobre la agregación del interferón beta-1a 0,116 mg/mL (5,16 μ M) en PEG/PBS, después de una incubación a 62 \pm 2°C., 10 min. se muestra en la Figura 5.

- 5 Resulta interesante observar que el efecto sobre la agregación de proteínas varía de una manera dependiente de la concentración: a una elevada concentración las cargas negativas parecen presentar un efecto desestabilizador, mientras a razones molares más bajas este excipiente parece tener una influencia inhibitoria.

No obstante fue posible identificar una concentración (0,453 mg/mL correspondiente a una razón molar de excipiente/interferón beta-1a igual a 500) que parece impedir la agregación de proteínas.

- 10 Después se seleccionó el ascorbato como posible excipiente para las formulaciones con interferón beta-1a, con el propósito de combinar su acción antioxidante con un efecto anti-agregación específico.

Dicroísmo Circular

- 15 En la Figura 6 se informa sobre el desplegamiento inducido térmicamente, entre 25°C y 85°C, y el espectro UV lejano de una muestra de interferón beta-1a en masa (aproximadamente 44 μ g/mL). Se puede observar que el valor de T_m estimado es de 64,97 \pm 0,31 °C, mientras la desconvolución del espectro muestra una diferencia notable en el contenido de hélice α antes y después de la desnaturalización, tal como 48,0 frente a 41,2%, respectivamente.

- 20 Como comparación, se analizó una muestra análoga que contenía hidroxipropil-beta-ciclodextrina mediante dicroísmo circular a un exceso molar de 700 veces con respecto a la cantidad molar de interferón beta-1a, que es la concentración a la que la agregación de la proteína resulta parcialmente inhibida en el experimento de turbidimetría. En la Figura 7 se informa sobre la desnaturalización térmica para una disolución que contiene interferón beta-1a aproximadamente 44 μ g/mL y HPBCD 2,11 mg/mL (exceso molar de 700 veces). El valor de la temperatura de fusión estimada fue de 65,46 \pm 0,50°C, idéntico al referente a la proteína sola (64,97°C) en las mismas condiciones operativas (véase la Figura 5).

- 25 Aunque la temperatura de fusión de la proteína es constante en presencia del aditivo sometido a ensayo, la reversibilidad del desplegamiento término es muy diferente. Se puede observar que en presencia de HPBCD existe un espacio en la hélice α del interferón claramente más pequeño entre la situación de pre- y post-desnaturalización (aproximadamente una diferencia de 4% frente a aproximadamente 7% para la proteína sola), sugiriendo que la ciclodextrina podría evitar reacciones irreversibles del interferón beta-1a, tales como la agregación inducida por calor después del desplegamiento, o ayudar al replegamiento de la proteína. Estas observaciones son muy interesantes porque encontrar composiciones de formulación que hagan irreversible el desplegamiento puede ser realmente más importante para la estabilidad a largo plazo (vida útil) que elevar la temperatura de fusión (véase también Arakawa et al, en *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46(1-3):307-326 (2001)).

- 35 Con el fin de caracterizar mejor la interacción del interferón beta-1a con la sal ascorbato de sodio se realizó un análisis de DC sobre una muestra de interferón beta-1a que contenía un exceso molar de 550 veces de sal ascorbato. En efecto los estudios cinéticos de turbidez revelaron que una disolución de ascorbato-interferón beta-1a, a una razón molar igual a 500, no presenta agregación de proteínas.

- 40 En la Figura 8 se muestran el efecto de la temperatura sobre la señal de DC (222 nm) del interferón beta-1a (aproximadamente 44 μ g/mL) solo y en presencia de un exceso molar de 500 veces de ascorbato (0,194 mg/mL). En el caso de la muestra que contiene ascorbato no fue posible ajustar la curva del experimento con el fin de estimar el valor de T_m , sugiriendo un efecto desnaturalizante del excipiente hacia la proteína.

- 45 En efecto la comparación de la estructura secundaria de la muestra anterior, antes y después de la transición de fusión confirmó un residuo muy bajo de hélice alfa ya en la situación de pre-fusión, tal como 35,0 (frente a 48,0 del interferón beta-1a en masa en las mismas condiciones). La estructura secundaria del interferón beta-1a estaba incluso más alterada por la presencia del ascorbato después de la transición de fusión, disminuyendo hasta 28,8% (véase la Figura 9).

Este resultado contrasta con el efecto protector mostrado en la turbidimetría y sugiere que el ascorbato podría inducir cambios conformacionales en el interferón beta-1a que podrían desestabilizar la proteína con el tiempo. Por esta razón se preparó una formulación líquida que contenía ascorbato de sodio, se mantuvo estable a 25°C y se analizó en los momentos puntuales previamente fijados por medio de SE-HPLC.

- 50 *Estudio de Estabilidad*

A continuación de los resultados anteriores, se prepararon dos formulaciones líquidas de interferón beta-1a, que tenían las composiciones mostradas en la Tabla 1 y en la Tabla 2, y se mantuvieron a 25°C y 50°C a lo largo del tiempo en el caso de FORM 1 y a 25°C en el caso de FORM 2.

ES 2 374 530 T3

Como control, también se sometió a ensayo interferón beta-1a en masa (50 mM en tampón acetato a la misma concentración).

Tabla 1: Composición de la formulación líquida de interferón beta-1a que contiene HPBCD (FORM 1)

Inteferón beta-1a	44	µg/mL
HPBCD	1,9	mg/mL
Metionina	0,1	mg/mL
Manitol	50	mg/mL
tampón acetato (50 mM; pH 3,8) hasta	1	mL

5 Tabla 2: Composición de la formulación líquida de interferón beta-1a que contiene ascorbato de sodio (FORM 2)

Inteferón beta-1a	44	µg/mL
Ascorbato de sodio	0,2	mg/mL
Lutrol F68	0,8	mg/mL
Manitol	50	mg/mL
tampón acetato (50 mM; pH 3,8) hasta	hasta 1	mL

Las muestras del estudio de estabilidad se analizaron mediante SE-HPLC como se ha descrito en la sección Método y los resultados son referidos en la Tabla 3 (FORM 1), la Tabla 4 (FORM 2) y la Tabla 5 (interferón beta-1a en masa/Control).

ES 2 374 530 T3

Tabla 3: Resultados de la SE-HPLC del estudio de estabilidad sobre la formulación FORM 1 a 25°C y 50°C

FORM 1			
Tiempo	Inspección visual	pureza % área mediante HPLC	% recuperación análisis (P/P)
T = 0	clara	96,96	102,9
t = 1 semana/25°C	clara	96,86	100,29
t = 1 mes/25°C	clara	97,06	100,43
FORM 1			
Tiempo	Inspección visual	pureza % área mediante HPLC	% recuperación análisis (P/P)
t = 0	Clara	96,96	102,9
t = 24 h/50°C	Clara	97,56	99,29
t = 48 h/50°C	Clara	97,3	98,79
t = 1 semana/50°C	Clara	95,63	94,31

Tabla 4 Resultados de la SE-HPLC del estudio de estabilidad sobre la formulación FORM 2 a 25°C

FORM 2			
Tiempo	Inspección visual	pureza % área mediante HPLC	% recuperación análisis (P/P)
T = 0	clara	97,49	116,2
t = 24 h	clara	NA	NA
t = 1 semana/25°C	clara	97,84	70,27
t = 1 mes/25°C	clara	60,305*	36,54
* pico de degradación con rrt: 1,13: área 5,37%			

5 Tabla 5: Resultados de la SE-HPLC del estudio de estabilidad sobre la formulación de control de interferón beta-1a a 25°C y 50°C

Inteferón beta 1a en masa			
Tiempo	Inspección visual	pureza % área mediante HPLC	% recuperación análisis (P/P)
t = 0	clara	97,95	102,7
t = 24 h/25°C	clara	N/A	N/A
t = 1 semana/25°C	clara	97,41	95,73
t = 1 mes/25°C	clara	97,65	93,12
Inteferón beta 1a en masa			
Tiempo	Inspección visual	pureza % área mediante HPLC	% recuperación análisis (P/P)
t = 24 h/50°C	Clara	93,94	95,90
t = 48 h/50°C	Clara	91,19	94,60

t = 72 h/50°C	Clara	89,32	91,69
t = 1 semana/50°C	Clara	83,42	73,26

5 A partir de los resultados de la Tabla 3 se puede observar claramente que las formulaciones líquidas de interferón beta-1a que contienen HPBCD son estables a 25°C y 50°C a lo largo de un mes: el nivel de agregación es muy bajo, siendo el contenido de monómero superior al 90% incluso después de 1 semana a 50°C. Por añadidura, la recuperación de masa es superior al 90% sugiriendo que también la formación de agregados insolubles podría ser minimizada por la presencia de la ciclodextrina.

10 En comparación el interferón beta-1a en masa solo tiende a la agregación a ambas temperaturas consideradas (véase la Tabla 5): a 50°C después de 1 semana el contenido de monómero disminuyó hasta 83% y en paralelo la recuperación de masa fue solamente de aproximadamente 73%.

Los últimos resultados concuerdan con las medidas de la turbidimetría y dicroísmo circular que han sugerido un efecto beneficioso de la HPBCD sobre la agregación y la estabilidad conformacional del interferón beta-1a.

15 Finalmente, los resultados mostrados en la Tabla 4 relacionados con la FORM 2 (que contiene la sal ascorbato) indican que la formulación no es estable a 25°C: se registró un incremento significativo de los dímeros y agregados y un descenso paralelo de la recuperación de masa después de 1 mes a 25°C. Además, apareció un pico desconocido en el cromatograma que sugería la presencia una conformación posiblemente cambiada, como también sugerían los resultados del DC. Esta fue la razón por la cual la estabilidad de la formulación que contenía ascorbato no se observó a temperaturas superiores (p. ej. 50°C).

20 En el último caso fue importante verificar el resultado inicial prometedor obtenido por medio del análisis de turbidimetría con métodos alternativos tales como el dicroísmo circular que es capaz de controlar el efecto de un excipiente conocido sobre la estabilidad de conformación de la proteína.

Análisis de Turbidimetría a un pH Superior

25 Se investigó el efecto sobre la agregación del interferón beta-1a de la HPBCD en un intervalo de pH más amplio de la formulación líquida (esto es, un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 4,0).

30 El método consistió en el análisis turbidimétrico descrito previamente: se diluyó interferón beta-1a en masa 1:2 con una disolución de PEG 10.000 30 mg/mL en PBS (filtrado a través de 0-2 µm de Ø y alcalinizado apropiadamente añadiendo un pequeño volumen de NaOH 1N) y después se incubó en un baño de agua termostático a T = 62 ± 2°C durante 10 min. La agregación de proteínas se controló durante 30 min a 360 nm utilizando un sistema espectrofotométrico UV visible (Perkin Elmer Lambda 40). Cada análisis de turbidez se repitió por duplicado y se informó sobre la densidad óptica (DO)_{380 min} frente a la curva media del tiempo. La agregación de la proteína sola se comparó con el interferón beta-1a en presencia de ciclodextrina.

35 La dilución del tampón acetato 50 mM (esto es, medio con IFN en masa) 1:1 mediante PBS conduce a un pH de la disolución final de 4,4. El propósito fue por lo tanto investigar la agregación de la proteína para un pH final más elevado.

La Figura 10 muestra la cinética de agregación del interferón beta-1a en ausencia y en presencia de un exceso molar de 700× de HPBCD (5,56 mg/mL), con un pH de la disolución analizada igual a 4,7 a la temperatura ambiente.

40 Se puede observar que un incremento del pH aumenta el grado de agregación del IFN, pero la presencia de ciclodextrina todavía inhibe parcialmente la desestabilización de la proteína. El porcentaje de DO relativa (esto es, la razón en porcentaje entre la DO a 96 nm después de 30 minutos en presencia y en ausencia del excipiente) calculado para este experimento es del 66%, no muy lejos del observado en las condiciones operativas habituales a un pH más bajo (52,7%).

45 El estudio se amplió a un pH más elevado, esto es, 5,1, como se muestra en la Figura 11: se investigó el efecto de la HPBCD a un exceso molar de 700 (5,56 mg/mL) y de RMBCD a un exceso molar de 500 (3,38 mg/mL) sobre la agregación del IFN. Se puede observar una desestabilización de la proteína más marcada debido al incremento del pH y la casi total ausencia de una pauta cinética (esto es, región meseta al principio del análisis). El descubrimiento interesante es que la agregación del IFN todavía es parcialmente inhibida por las ciclodextrinas, con un porcentaje de DO relativa igual a 69,7% en el caso de la HPBCD (no se puede observar ninguna ventaja debida al uso del derivado metilado en este caso).

50 Se investigó un tercer valor de pH. La Figura 12 muestra la cinética de agregación del IFN en PEG/PBS a un pH de 5,7 y el efecto de la adición de un exceso molar de 700× de HPBCD. El excipiente no evita la desestabilización de la proteína, pero reduce significativamente su grado con respecto al control de IFN (porcentaje de DO relativa 62,5%).

Las consideraciones anteriores indican que el uso de la HPBCD como excipiente estabilizador se podría ampliar a la formulación líquida a un pH superior al valor característico de la proteína en masa (esto es, pH $3,8 \pm 0,5$).

Conclusiones

- 5 - Se prepararon algunas formulaciones líquidas de interferón beta-1a y se mantuvieron en condiciones de estabilidad a la temperatura ambiente (25°C) y en condiciones aceleradas (50°C).
- La formulación más estable contiene L-metionina, HPBCD y manitol. Los resultados de la SE-HPLC muestran un contenido de monómero por encima del 90% después de 1 semana a 50°C o 1 mes a 25°C.
- 10 - El resultado positivo de la HPBCD fue anticipado y confirmado por la medida de la turbidimetría que mostraba un efecto de inhibición dependiente de la concentración de este excipiente, (y parcialmente también de la L-metionina), hacia la agregación del interferón beta-1a. Además el análisis de DC demostró que en presencia de HP-beta-ciclodextrina existe una pérdida de la hélice α del interferón beta-1a claramente más pequeña después de la transición de fusión.
- El interferón beta-1a en masa, mantenido en las mismas condiciones de almacenamiento, presenta un perfil de estabilidad diferente; el contenido de monómero disminuyó hasta el 83% después de 1 semana a 50°C.
- 15 Es digno de observar que a 25°C el contenido de monómero después de 1 mes todavía es igual a 97%, lo que es sorprendentemente elevado. Este resultado podría ser explicado por el hecho de que el grueso contiene tampón acetato a pH 3,8. Esta condición tiene a su vez un cierto grado de efecto estabilizador para el interferón beta-1a.
- Se encontró un resultado negativo claro en el estudio de estabilidad con la formulación que contenía sal ascorbato. La SEC muestra una pérdida de monómero notable (por debajo de 60%) a 25°C al cabo de 1 mes. Paralelamente también se mostró un efecto negativo sobre la conformación del interferón beta-1a por medio del DC.
- 20

Manufacturación Farmacéutica

Preparación de Solución de Hidróxido de Sodio 1M

Se preparó una disolución de hidróxido de sodio 1 M en WFI.

Preparación de Tampón Acetato de Sodio 0,05 M pH 3,8 (100 mL)

- 25 En un matraz volumétrico que contenía 80 mL agua MilliQ, se añadieron 0,286 mL de ácido acético (Glacial), y, después de sacudir, se añadieron 0,500 mL de NaOH 1M y agua hasta 100 mL; pH = $3,8 \pm 0,05$.

Preparación de la Solución de Excipiente

Se prepara una disolución concentrada (10 veces) de HPBCD y L-Metionina en tampón acetato en un matraz volumétrico de polipropileno.

- 30 En el matraz de polipropileno se añade la cantidad adecuada de tampón acetato 50 mM que contiene 5 g de manitol. La disolución se lleva a la homogeneidad volteando arriba y abajo tres veces.

Elaboración de la Solución de la Sustancia Fármaco

Se añade la cantidad requerida B (g) de la sustancia fármaco interferón beta-1a a la cantidad requerida de disolución de excipiente V (g) y se agitan suavemente hasta su homogeneidad.

- 35 *Llenado de Jeringas*

Se pueden cargar asépticamente jeringas de 1 ml con 0,5 ml de la disolución final.

REFERENCIAS

1. Arakawa, Prestrelski, Kenney y Carpenter (2001), "Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins", Adv. Drug Deliv. Rev. 46(1-3):307-326;
- 40 2. Brewster et al., 1991, Pharmaceutical research, New York, 8(6), 792-795;
3. Cancellieri et al., Biopolymers, VOL 13, 735-743, 1974;
4. Clegg Y Bryant, Exp. Opin. Pharmacother 2001; 2(4): 623-639;
5. Derynk R. et al., Nature 1980; 285, 542-547;

6. Familletti, P. C., Rubinstein, S., y Pestka, S. 1981 "A Convenient and Rapid Cytopathic Effect Inhibition Assay for Interferon," In *Methods In Enzymology*, Vol. 78 (S. Pestka, ed.), Academic Press, New York, 387-394;
- 5 7. Hultgren C, Milich D R, Weiland O, Sallberg M. (1998). The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* 1998; 79:2381-2391;
8. T. Irie et al., 1999, *Adv. Drug Deliv. Rev*, Vol 36, 101-123;
9. McCormick J B, King I J, Webb P A, Scribner C L, Craven R B, Johnson K M, Elliott L H, Belmont-Williams R. Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N Engl J Med*. 1986 Jan. 2; 314(1):20-6;
- 10 10. Mark D. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81 (18) 5662-5666 (1984);
11. Pagington, *Chemistry in Britain*, págs. 455-458 (1987);
12. Pestka, S. (1986) "Interferon Standards and General Abbreviations, in *Methods In Enzymology* (S. Pestka, ed.), Academic Press, New York 119, 14-23;
13. Pitha et al, *International Journal of Pharmaceutics*, 29, 73-82 (1986);
- 15 14. Pitha et al, in *Controlled Drug Deliver*, ed. S. D. Bruck, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, Fla., págs. 125-148 (1983);
15. Rubinstein, S., Familletti, P. C., y Pestka, S. Convenient Assay for Interferons. *J. Virol* 1981; 37, 755-758;
16. Shepard H. M. et al., *Nature* 1981; 294, 563-565;
- 20 17. T. Irie et al., *Cyclodextrins in peptide and protein delivery*, *Adv. Drug Deliv. Rev*, Vol 36, 101-123 (1999);
18. Study Group. *The Lancet* 1998; 352, 1498-1504;
19. Uekama et al, In *CRC Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems*, Vol. 3 (1), 140 (1987);
20. Uekama, in *Topics in Pharmaceutical Sciences 1987*, eds. Breimer and Speiser, Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division), 181-194 (1987);
- 25 21. Wang et al., *Int. J. Pharm*, 185:129-188;
22. Wang et a., *J. Parenteral Sci. Tech.*, 1998, 42:S3-S26;
23. Documento WO 03 00/2152;
24. Documento WO 99/55377;
25. Documento WO 90/03784;
- 30 26. Patente de los Estados Unidos Núm. 6.582.728;
27. Patente de los Estados Unidos Núm. 6.013.253;
28. Patente de los Estados Unidos Núm. 5.997.856;
29. Patente de los Estados Unidos Núm. 5.541.293;
30. Patente de los Estados Unidos Núm. 5.116.943;
- 35 31. Patente de los Estados Unidos Núm. 5.017.691;
32. Patente de los Estados Unidos Núm. 4.965.195;
33. Patente de los Estados Unidos Núm. 4.959.314;
34. Patente de los Estados Unidos Núm. 4.904.584;
35. Patente de los Estados Unidos Núm. 4.897.471;
- 40 36. Patente de los Estados Unidos Núm. 4.879.111;
37. Patente de los Estados Unidos Núm. 4.737.462;

38. Patente de los Estados Unidos Núm. 4.695.623;

39. Patente de los Estados Unidos Núm. 4.588.585.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica líquida estabilizada que comprende un interferón beta (IFN-beta) o una de sus sales, donde dicha formulación es una disolución que comprende un tampón acetato, 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina ("HPBCD"), manitol y metionina y donde dicha HPBCD está presente a una razón molar frente a dicho IFN-beta de un exceso molar de 500 a un exceso molar de 700 veces.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho IFN-beta es IFN-beta humano recombinante.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicho tampón acetato está presente en una cantidad suficiente para mantener el pH de dicha composición a más o menos 0,5 unidades de un pH especificado, donde el pH especificado es de 3 a 6.
- 10 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho pH es de 3,8.
5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho tampón acetato está presente a una concentración de 5 mM a 500 mM.
6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho tampón acetato está presente a una concentración de 50 mM.
- 15 7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho manitol está presente a una concentración de 0,5 mg/ml a 500 mg/ml.
8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho manitol está presente a una concentración de 50 mg/ml.
9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha metionina está presente a una concentración de 0,01 mg/ml a 5 mg/ml.
- 20 10. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha metionina está presente a una concentración de 0,1 mg/ml.
11. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho IFN-beta está presente a una concentración de 10 µg/ml a 800 µg/ml.
- 25 12. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho IFN-beta está presente a una concentración de 44, 88 o 276 µg/ml.
13. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición es una disolución acuosa.
14. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un agente bacteriostático.
- 30 15. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho agente bacteriostático es alcohol bencílico.
16. La composición de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, donde dicho agente bacteriostático está presente a una concentración de 0,1% a 2%.
17. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicho agente bacteriostático está presente a una concentración de 0,2 o 0,3%.
- 35 18. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición es la siguiente formulación líquida:

Interferón beta-1a	44	µg/mL
HPBCD	1,9	mg/mL
Metionina	0,1	mg/mL
Manitol	50	mg/mL

tampón acetato hasta	1	mL

- 5 19. Un método para preparar una composición farmacéutica líquida estabilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, donde dicho método comprende añadir cantidades calculadas de 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, metionina y manitol a la disolución tamponada y después añadir el interferón beta (IFN-beta) o una de sus sales.
20. Un recipiente sellado herméticamente en condiciones estériles y apropiadas para el almacenamiento antes de su uso, que comprende la formulación farmacéutica líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
21. El recipiente de acuerdo con la reivindicación 20, donde dicho recipiente es una jeringa pre-cargada para la administración de mono-dosis.
- 10 22. El recipiente de acuerdo con la reivindicación 20, donde dicho recipiente es un vial.
23. El recipiente de acuerdo con la reivindicación 20, donde dicho recipiente es un cartucho para un autoinyector.
24. El recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, donde dicho recipiente es para la administración de una sola dosis o de múltiples dosis.

Figura 1

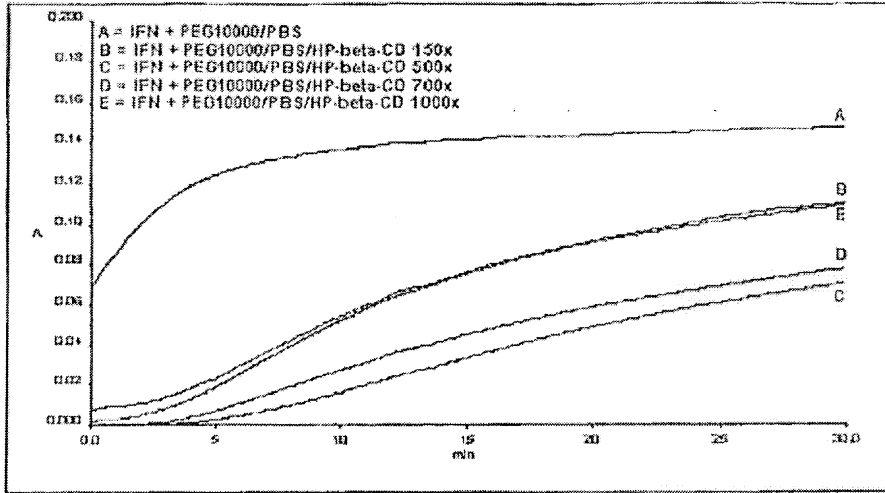


Figura 2

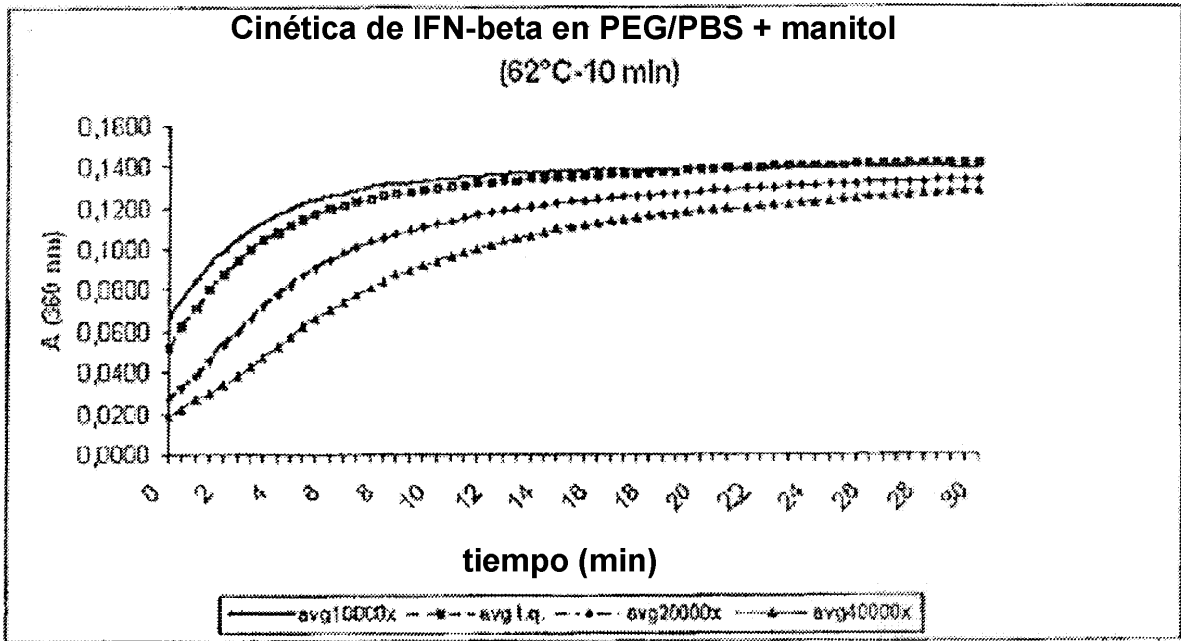


Figura 3

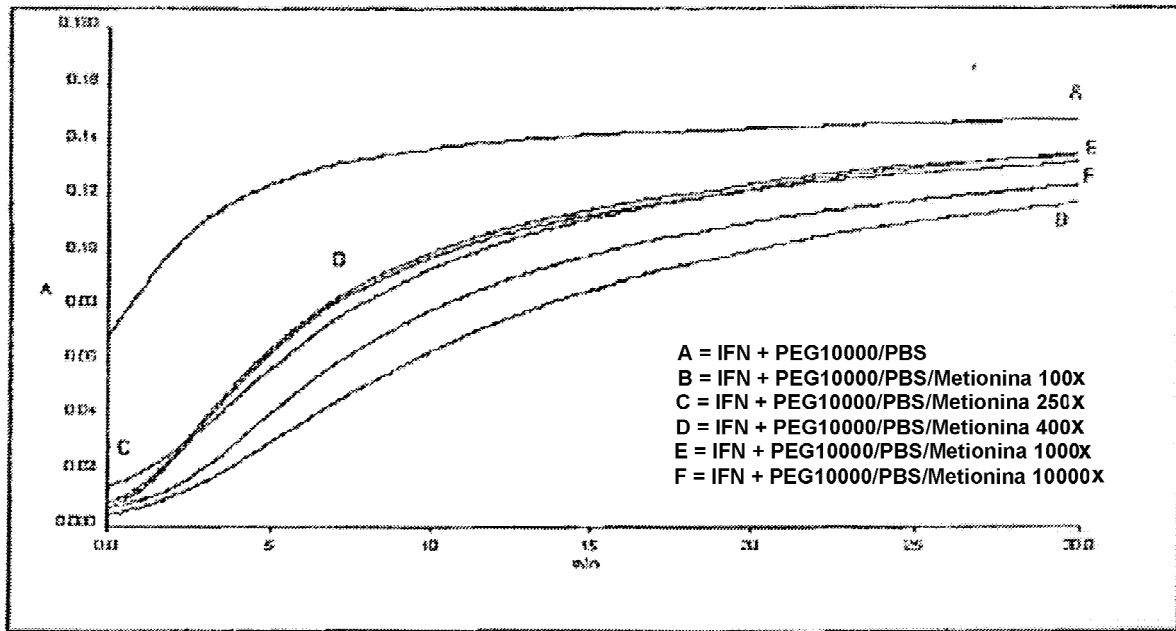


Figura 4

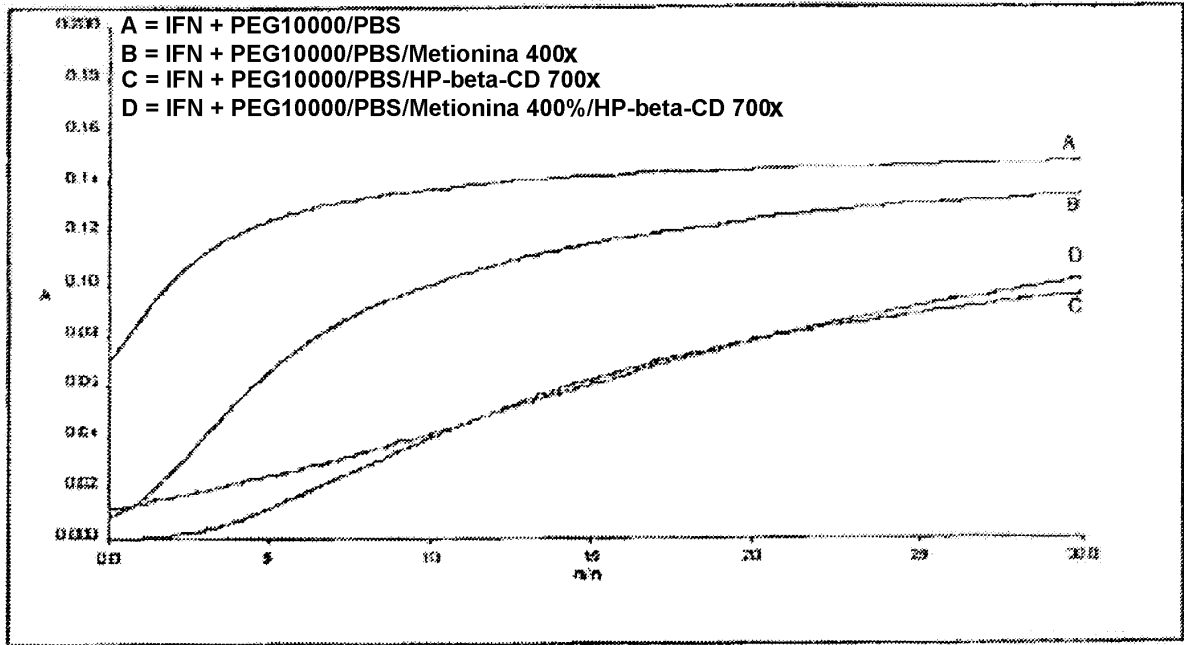


Figura 5

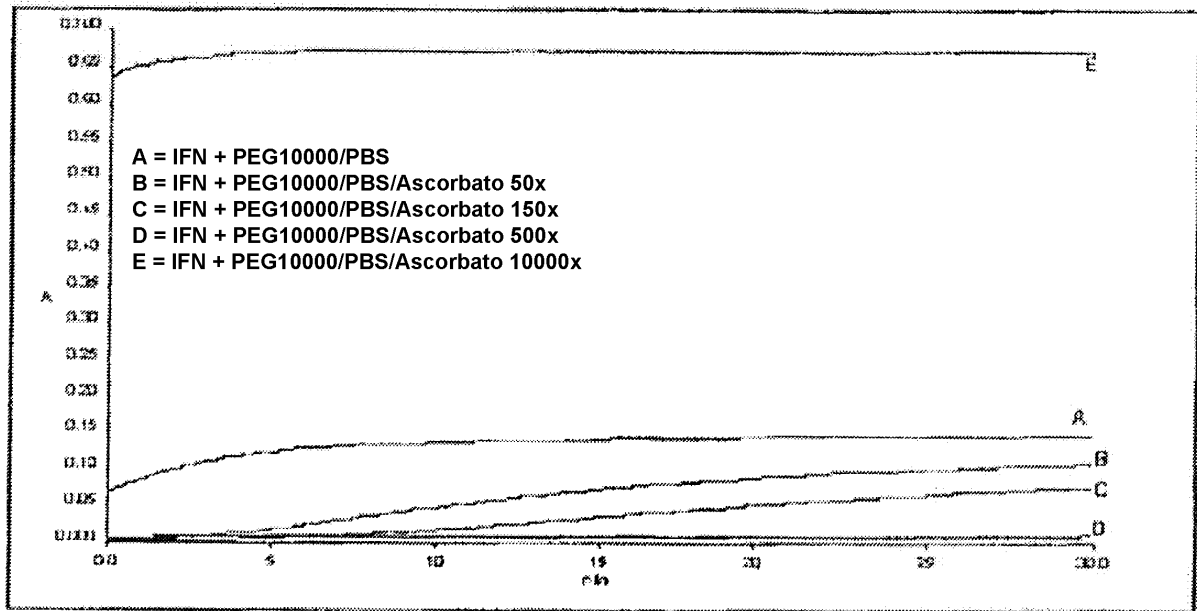
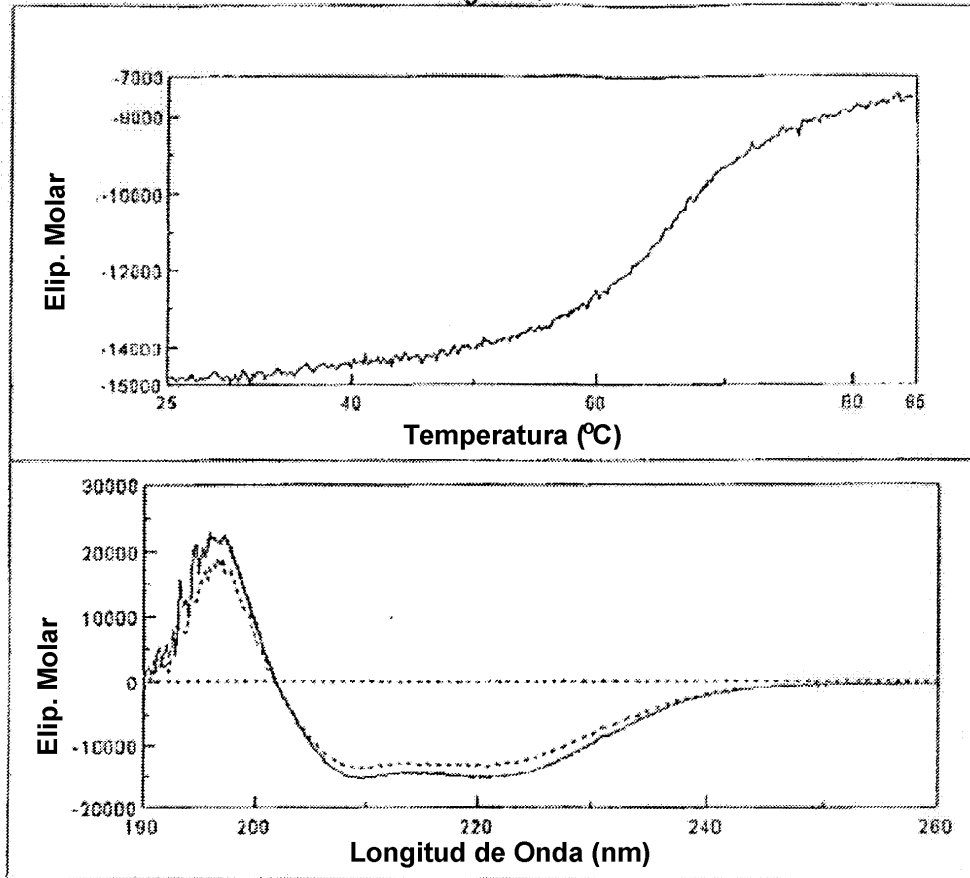


Figura 6



Contenido estructura secundaria pre-fusión:

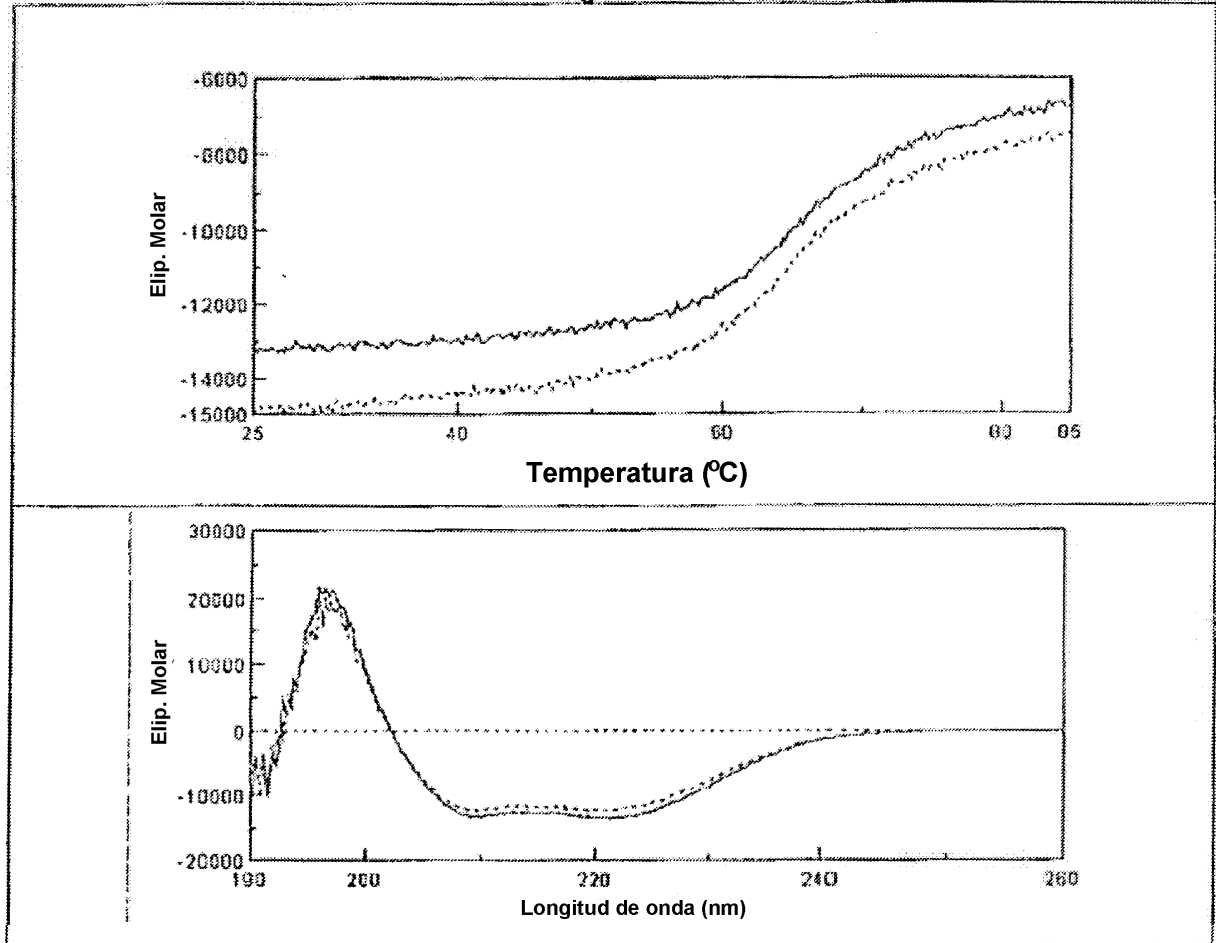
	190-200 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
5 Hélice	37,88%	45,33%	47,95%	48,63%	47,78%
Antiparalela	5,95%	4,78%	5,30%	5,28%	5,28%
Paralela	7,73%	6,28%	5,85%	5,73%	6,03%
Giro beta	16,33%	14,80%	14,45%	14,50%	14,50%
Enroll. al azar	29,55%	24,18%	24,18%	24,08%	24,80%

10

Contenido estructura secundaria post-fusión:

	190-200 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Hélice	33,58%	39,38%	41,18%	41,98%	41,03%
Antiparalela	8,95%	6,58%	6,58%	6,26%	6,45%
15 Paralela	8,45%	7,28%	7,28%	6,95%	7,13%
Giro beta	17,15%	15,75%	15,75%	15,38%	15,58%
Enroll. al azar	31,40%	28,40%	28,40%	27,70%	28,43%

Figura 7



Contenido estructura secundaria pre-fusión:

	190-200 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
5					
Hélice	32,87%	41,13%	42,97%	42,83%	42,27%
Antiparalela	8,90%	5,70%	6,13%	6,10%	6,20%
Paralela	8,83%	7,10%	8,73%	8,73%	6,90%
Giro beta	17,20%	15,37%	15,13%	15,23%	15,30%
10					
Enroll. al azar	33,23%	28,57%	27,20%	27,23%	27,63%

Contenido estructura secundaria post-fusión:

	190-200 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Hélice	30,03%	37,40%	39,03%	39,10%	38,37%
15					
Antiparalela	11,93%	7,07%	7,00%	6,73%	7,00%
Paralela	9,37%	7,77%	7,50%	7,63%	7,60%
Giro beta	17,83%	16,03%	15,83%	15,77%	15,93%
Enroll. al azar	34,37%	30,30%	29,27%	29,47%	29,90%

Figura 8

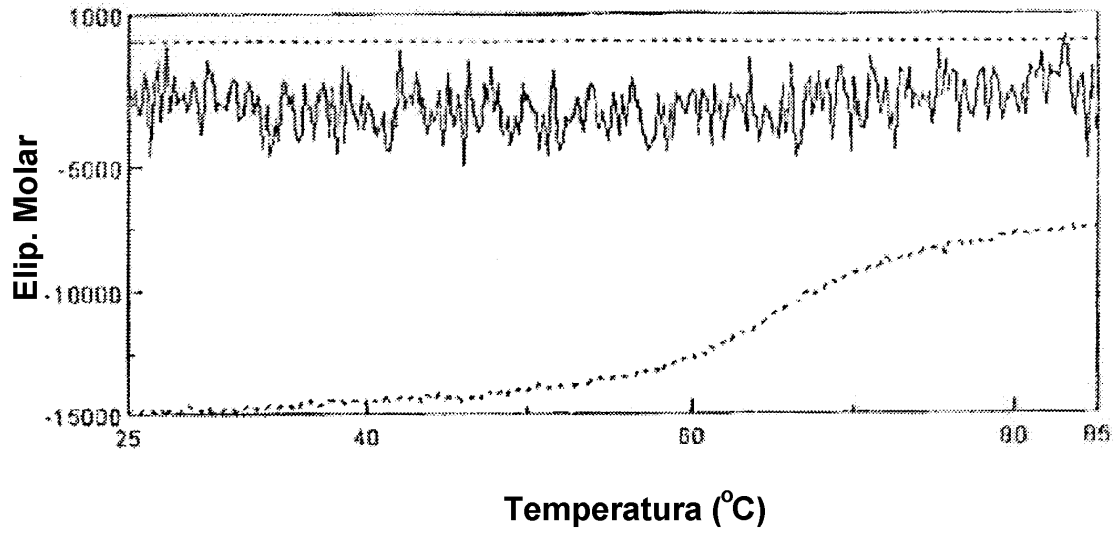
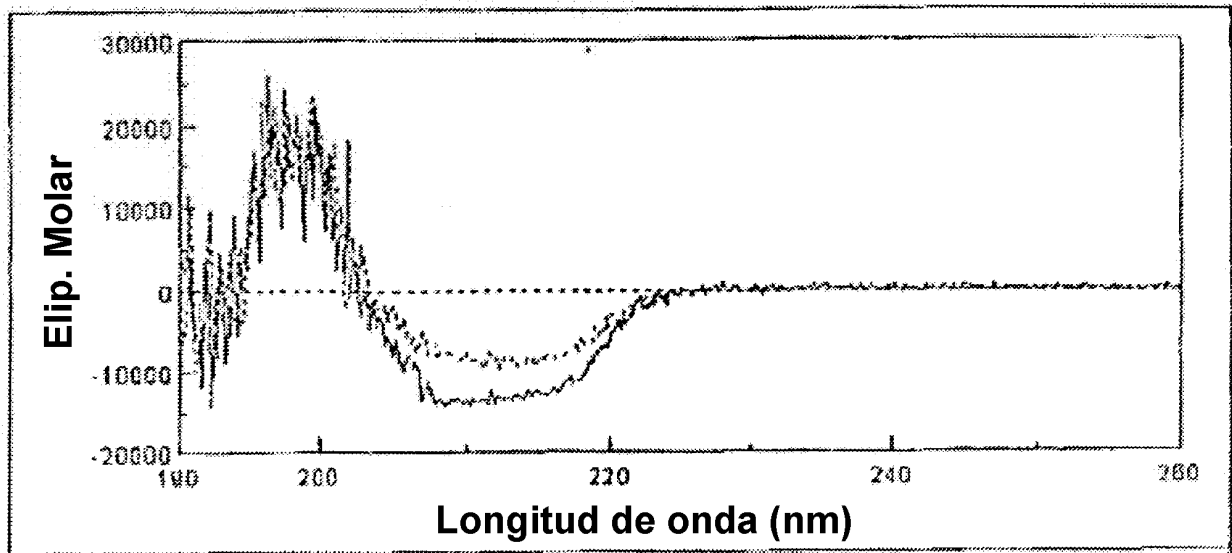


Figura 9



Contenido estructura secundaria pre-fusión:

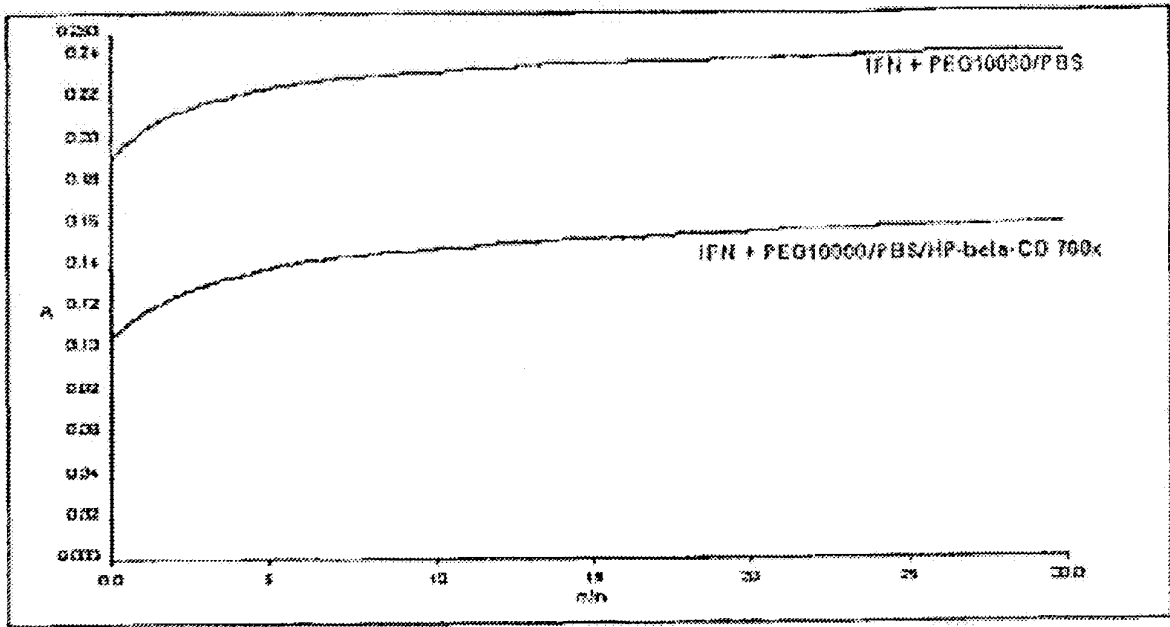
	190-200 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
5 Hélice	25,50%	30,30%	35,00%	30,60%	28,70%
Antiparalela	21,70%	11,40%	8,70%	8,80%	9,80%
Paralela	9,80%	9,20%	8,40%	9,90%	10,00%
Giro beta	19,30%	17,60%	17,20%	17,50%	17,90%
Enroll. al azar	33,70%	32,60%	30,00%	34,80%	36,30%

10

Contenido estructura secundaria post-fusión:

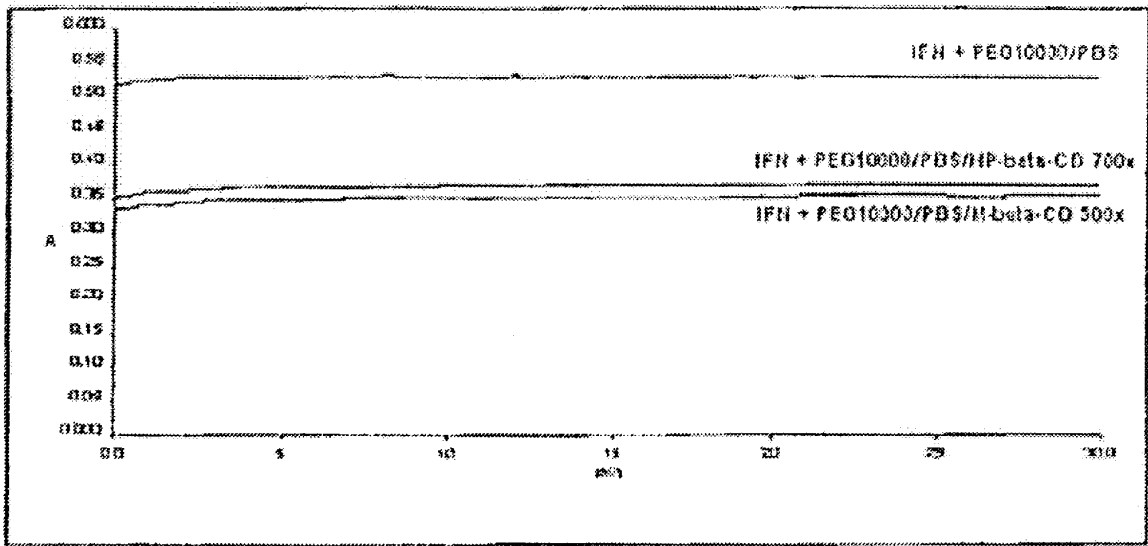
	190-200 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
Hélice	24,20%	25,60%	28,80%	21,70%	20,70%
Antiparalela	18,70%	13,20%	10,30%	11,50%	13,20%
15 Paralela	11,20%	11,50%	10,70%	13,60%	12,80%
Giro beta	18,50%	18,20%	18,00%	19,10%	19,80%
Enroll. al azar	40,50%	40,00%	37,40%	43,00%	43,40%

Figura 10



pH 4.7

Figura 11



pH 5,1

Figura 12

