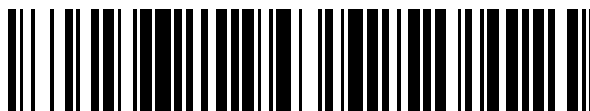


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 674**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/21** (2006.01)  
**A61K 47/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05749282 .9**  
96 Fecha de presentación: **27.05.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1750750**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

54 Título: **Método de estabilizar proteínas**

30 Prioridad:  
**01.06.2004 EP 04076627**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.05.2012**

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

72 Inventor/es:  
**JABER, Amer**

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

**ES 2 381 674 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

Método de estabilizar proteínas

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere de forma general a un procedimiento para preparar una solución estable a granel de una proteína monomérica mediante el proporcionamiento de un volumen de proteína monomérica en una solución amortiguadora y mediante la adición de excipiente(s) específico(s) a la solución a granel.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Los interferones son citocinas, es decir, proteínas solubles que transmiten mensajes entre las células y tienen un papel esencial en el sistema inmune promoviendo la destrucción de los microorganismos que causan infecciones y la reparación de cualquier daño resultante. Los interferones son secretados de forma natural por las células y se identificaron por primera vez en 1957. Su nombre deriva del hecho de que "interfieren" en la réplica y producción viral.

20 Los interferones muestran tanto actividad antiviral como antiproliferativa. En función de sus propiedades bioquímicas e inmunológicas, los interferones humanos producidos de forma natural se agrupan en tres clases fundamentales: interferón alfa (leucocito), interferón beta (fibroblasto) e interferón gama (inmune). El interferón alfa se encuentra actualmente aprobado en los Estados Unidos y otros países para el tratamiento de la tricoleucemia, verrugas venéreas, sarcoma de Kaposi (un tipo de cáncer que comúnmente afecta a pacientes que padecen el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)) y la hepatitis crónica que no es A, ni B.

25 Asimismo, los interferones (IFN) son glicoproteínas producidas por el cuerpo en respuesta a la infección viral. Estos inhiben la multiplicación de virus en las células protegidas. Los IFN, los cuales consisten en una proteína de bajo peso molecular, son extraordinariamente inespecíficos en su acción, es decir, el IFN inducido por un virus es eficaz contra un amplio rango de otros virus. Sin embargo, son específicos para cada especie, es decir, el IFN producido por una especie únicamente estimulará la actividad antiviral en las células de la misma especie o de especies estrechamente relacionadas. Los IFN fueron el primer grupo de citocinas en ser explotado por sus potenciales actividades antitumorales y antivirales.

35 Los tres IFN fundamentales se denominan IFN alfa, IFN beta e IFN gama. Tales tipos principales de IFN se clasificaron inicialmente de acuerdo con sus células de origen (leucocito, fibroblasto o célula T). No obstante, ha quedado claro que una célula puede producir varios tipos. Por lo tanto, los IFN de leucocitos actualmente se llaman IFN alfa, los IFN de fibroblastos son IFN beta y los IFN de células T son IFN gama. Existe asimismo un cuarto tipo de IFN, el IFN linfoblastoide, producido en la línea celular "Namalwa" (derivada del linfoma de Burkitt), que parece producir una mezcla de IFN de leucocitos y fibroblastos.

40 La unidad de interferón o la unidad internacional para el interferón (U o IU, para la unidad internacional) se presentó como la medición de la actividad de IFN definida como la cantidad necesaria para proteger un 50% de las células del daño viral. El ensayo que puede utilizarse para medir la bioactividad es el ensayo de la inhibición del efecto citopático como se describe en (Rubinstein, et al. 1981; Familletti, P. C., et al., 1981). En este ensayo de actividad antiviral para el interferón aproximadamente 1 unidad/ml de interferón es la cantidad necesaria para producir un efecto citopático del 50%. Las unidades se determinan con respecto al estándar internacional de referencia para el Hu-IFN-beta proporcionado por el organismo National Institute of Health (Pestka, S. 1986).

45 Todas las clases de IFN contienen varios tipos diferentes. El IFN beta y el IFN gama son cada uno el producto de un único gen.

50 Las proteínas clasificadas como IFN alfa constituyen el grupo más diverso que contiene aproximadamente 15 tipos. Existe un agrupamiento de genes de IFN alfa en el cromosoma 9, que contiene al menos 23 miembros, de los cuales 15 son activos y transcritos. Los IFN alfa maduros no son glicosilados.

55 Los IFN alfa e IFN beta tienen todos la misma longitud (165 o 166 aminoácidos) con actividades biológicas similares. Los IFN gamma tienen 146 aminoácidos en longitud y se parecen menos a las clases alfa y beta. Únicamente los IFN gama pueden activar los macrófagos o inducir la maduración de los linfocitos T citotóxicos. Estos nuevos tipos de agentes terapéuticos a veces se denominan modificadores de la respuesta biológica (BRM), debido a que tienen un efecto sobre la respuesta del organismo al tumor, lo que afecta el reconocimiento mediante inmunomodulación.

60 El interferón de fibroblasto humano (IFN beta) presenta actividad antiviral y puede además estimular las linfocitos citotóxicos naturales contra las células neoplásicas. Es un polipéptido de aproximadamente 20.000 Da inducido por virus y ARN bicatenario. A partir de la secuencia de nucleótidos del gen para el interferón de fibroblasto, clonado mediante tecnología de ADN recombinante (Derynk et al. 1980), se dedujo la secuencia de aminoácidos completa de la proteína. Tiene una longitud de 166 aminoácidos.

65

Shepard et al. (1981) describió una mutación en la base 842 (Cys → Tyr en la posición 141) que suprimía su actividad antiviral y una variante de clon con una supresión de nucleótidos 1119-1121.

5 Mark et al. (1984) insertó una mutación artificial mediante el reemplazo de la base 469 (T) con (A) lo que provocó que los aminoácidos se desviaran de Cys → Ser en la posición 17. Se informó que el IFN beta resultante era tan activo como el IFN beta 'nativo' y estable durante el almacenamiento a largo plazo (-70 °C).

10 Rebif® (interferón beta recombinante humano de Serono), el último desarrollo en la terapia de interferón para la esclerosis múltiple (EM), es interferón (IFN) beta 1a, producido a partir de líneas celulares de mamíferos. Se recomienda el Nombre Internacional No patentado (INN) "Interferón beta 1a".

15 Como con todos los productos farmacéuticos a base de proteínas, un enorme obstáculo que debe superarse en el uso de IFN beta como agente terapéutico es la pérdida de utilidad farmacéutica que puede resultar de su inestabilidad en las formulaciones farmacéuticas.

20 Las inestabilidades físicas que amenazan la actividad de los polipéptidos y la eficacia en las formulaciones farmacéuticas incluyen la desnaturalización y la formación de agregados solubles e insolubles, mientras que las inestabilidades químicas incluyen la hidrólisis, la formación de imidas, la oxidación, racemización y desaminación. Se sabe que algunos de estos cambios provocan 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 los productos degradativos resultantes aún se consideran farmacéuticamente inaceptables debido a la posibilidad de efectos secundarios indeseables.

25 La estabilización de los polipéptidos en las composiciones farmacéuticas continúa siendo un área en la cual el ensayo y error tiene un papel fundamental (reseñado por Wang (1999) Int. J. Pharm. 185:129-188; Wang y Hanson (1988) J. Parenteral Sci. Tech. 42:S3-S26). Los excipientes que se agregan a las formulaciones farmacéuticas de polipéptidos para aumentar su estabilidad incluyen azúcares, tensioactivos, aminoácidos, polietilenglicoles y polímeros, pero los efectos estabilizadores de estos aditivos químicos varían en función de la proteína.

30 Las formulaciones de proteínas actuales emplean el uso de excipientes para las preparaciones finales de proteínas. No obstante, estas formulaciones permanecen parcialmente inestables. Además, las proteínas que son biológicamente activas como monómeros, es decir, proteínas monoméricas, tienen una tendencia a polimerizarse y aglomerarse cuando se estresan (por ejemplo, estrés ante la temperatura).

35 Por consiguiente, existe la necesidad de un procedimiento que mejore la solubilidad de las proteínas y que mejore la estabilidad de las proteínas monoméricas particularmente respecto a la agregación y oligomerización para de ese modo mejorar su utilidad farmacéutica.

#### 40 SUMARIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para preparar una solución a granel estable de una proteína monomérica, donde dicha proteína es un interferón y el método comprende las siguientes etapas:

- 45 a) proporcionar una proteína monomérica a granel en una solución amortiguadora y  
 b) agregar un excipiente al volumen, donde el excipiente se selecciona del grupo que consiste en:  
 i) un agente bacteriostático,  
 ii) un tensioactivo,  
 iii) un agente de isotonicidad,  
 50 iv) un aminoácido,  
 v) un antioxidante,  
 vi) un agente de isotonicidad y un antioxidante,  
 vii) un agente de isotonicidad, un antioxidante y un aminoácido,  
 viii) un aminoácido y un antioxidante,  
 55 ix) un aminoácido, un antioxidante y un tensioactivo,  
 x) un agente bacteriostático y un antioxidante y  
 xi) un agente bacteriostático, un antioxidante y un tensioactivo, y

comprende además una etapa de incubación de dicha proteína a granel a una temperatura comprendida en el intervalo de 27°C a 31°C durante 3 a 40 horas.

60 En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para aumentar y/o mantener la estabilidad de una proteína monomérica, donde dicha proteína es un interferón, comprendiendo el método de pre-formulación del volumen de la proteína de conformidad con el primer aspecto de la invención.

#### 65 DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

**Figura 1 -** Disociación térmica, procedimiento a escala de laboratorio.

La figura 1 se refiere al procedimiento a escala de laboratorio pequeño de disociación térmica del ejemplo 1a relacionado con el efecto de la temperatura de incubación y el tiempo de incubación sobre la estabilización del interferón a granel. La figura 1 corresponde a la tabla 4.

5 Resultados de la SE-HPLC de muestras a granel de 0,9 ml después de 4 F/T.

La **figura 2** muestra los resultados de la disociación térmica a escala de laboratorio a 29 °C después de 4 ciclos de F/T del ejemplo 1b. El eje de las Y se refiere al porcentaje de área. El eje de las X se refiere a las formas detectadas de r-h IFN beta 1a, es decir, agregados, dímeros o monómeros. La primera columna de cada forma detectada es el control y corresponde a una pre-formulación a granel que se descongeló a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se almacenó a -4 °C. La segunda columna de cada forma detectada corresponde a una pre-formulación a granel que se descongeló a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se incubó a 29 °C durante 3 horas. La tercera columna de cada forma detectada corresponde a una pre-formulación a granel que se descongeló a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se incubó a 29 °C durante 15 horas. La última o cuarta columna de cada forma detectada corresponde a una pre-formulación a granel que se descongeló en un baño y luego se incubó a 29 °C durante 15 horas. La figura 2 corresponde a la tabla 11.

10

15

**Figura 3 -** Resultados de la SE-HPLC de 200 ml de muestras a granel después de 2 F/T.

La figura 3 muestra los resultados de la disociación térmica a escala de laboratorio a 29 °C después de 2 ciclos de F/T del ejemplo 1b. El eje de las Y se refiere al porcentaje de área. El eje de las X se refiere a las formas detectadas de r-h IFN beta 1a, es decir, agregados, dímeros o monómeros. La primera columna de cada forma detectada es el control y corresponde a una pre-formulación a granel que se descongeló a temperatura ambiente durante 7 horas y luego se almacenó a -4 °C. La segunda columna de cada forma detectada corresponde a una pre-formulación a granel que se descongeló a temperatura ambiente durante 7 horas y luego se incubó a 29 °C durante 15 horas. La figura 3 corresponde a la tabla 12.

20

25

**Figura 4 -** Cinética de la disociación térmica a escala de laboratorio F/TX1. Porcentaje de monómeros con el paso del tiempo.

La figura 4 muestra el porcentaje de monómeros de r-h IFN beta 1a con el paso del tiempo cuando se incuban a 29 °C y a continuación del ciclo 1 F/T. El eje de las Y se refiere al porcentaje de área. El eje de las X se refiere al tiempo en horas. Los resultados de la figura 4 se encuentran presentes en la tabla 14.

30

**Figura 5 -** Cinética de la disociación térmica a escala de laboratorio F/TX1. Porcentaje de dímeros con el paso del tiempo.

La figura 5 muestra el porcentaje de dímeros de r-h IFN beta 1a con el paso del tiempo cuando se incuban a 29 °C y a continuación del ciclo 1 F/T. El eje de las Y se refiere al porcentaje de área. El eje de las X se refiere al tiempo en horas. Los resultados de la figura 5 se encuentran en la tabla 14.

35

**Figura 6 -** Cinética de la disociación térmica a escala de laboratorio F/TX1. Porcentaje de agregados con el paso del tiempo.

La figura 6 muestra el porcentaje de agregados de r-h IFN beta 1a con el paso del tiempo cuando se incuban a 29 °C y a continuación del ciclo 1 F/T. El eje de las Y se refiere al porcentaje de área. El eje de las X se refiere al tiempo en horas. Los resultados de la figura 6 se encuentran presentes en la tabla 14.

40

**Figura 7 -** Esquema del estudio de pre-formulación para el ejemplo 2.

La figura 7 representa el esquema del estudio del ejemplo 2 que se enfoca en la minimización de la oligomerización de r-h IFN beta 1a durante las etapas de fabricación desde la fracción SEC-EL al almacenamiento de la forma de dosificación final (FDF) para proporcionar un interferón beta a granel estable. El esquema asimismo se describe en la sección 6.2 del ejemplo 2.

45

**Figura 8 -** Esquema del estudio de pre-formulación para el ejemplo 3.

La figura 8 representa el esquema del estudio del ejemplo 3 dirigido a minimizar la oligomerización de r-h IFN beta 1a y que emplea dos procedimientos diferentes, la ultracentrifugación de velocidad y la SE-HPLC para la medición del nivel de monómeros de r-h IFN beta 1a después de la estabilización del IFN beta a granel. El esquema se describe también en la sección 6.1 y 6.2 del ejemplo 3.

50

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55

La presente invención se refiere a un método para preparar una solución a granel estable de una proteína monomérica, donde dicha proteína es un interferón, comprendiendo el método las etapas de:

- a) proporcionar un volumen de proteína monomérica en una solución amortiguadora y
- b) agregar un excipiente al volumen, donde el excipiente se selecciona del grupo que consiste en:

60

- i. un agente bacteriostático,
- ii. un tensioactivo,
- iii. un agente de isotonicidad,
- iv. un aminoácido,
- v. un antioxidante,
- vi. un agente de isotonicidad y un antioxidante,

65

- vii. agente de isotonicidad, un antioxidante y un aminoácido,
- viii. un aminoácido y un antioxidante,
- ix. un aminoácido, un antioxidante y un tensioactivo,
- x. un agente bacteriostático y un antioxidante y
- xi. un agente bacteriostático, un antioxidante y un tensioactivo, y

que comprende además una etapa de incubación de dicha proteína a granel a una temperatura comprendida en el intervalo de 27°C a 31°C durante 3 a 40 horas.

De hecho, el solicitante halló que si la estabilización se realiza mediante la adición a la proteína a granel de uno o más excipientes como se describe en detalle en esta solicitud de patente, la estabilidad se confiere desde el momento en que uno o más excipientes se agregan a la proteína a granel hasta la eliminación final de la formulación que contiene la proteína, por ejemplo, el consumo final por el paciente. Por lo tanto, la estabilización no ocurre únicamente en la etapa de almacenamiento sino a lo largo de las varias etapas que la proteína puede enfrentar durante su vida hasta su eliminación, es decir, antes, durante y después del almacenamiento. Por consiguiente, el método de la presente invención es capaz de contrarrestar las varias tensiones que la proteína o la formulación de proteína pueden enfrentar durante su tiempo de vida. Por tanto, la estabilización ocurre no solamente durante la fabricación sino durante los procesos de transporte, almacenamiento y entrega.

Se describe además el volumen estabilizado obtenido mediante el procedimiento de la presente invención, también llamado volumen pre-formulado.

El término "pre-formulaciones" en la presente se refiere a formulaciones que contienen una proteína monomérica a granel. La estabilidad de estas pre-formulaciones no solamente se confiere en términos de disminución de la agregación y oligomerización, sino que incluye asimismo otros tipos de procesos nocivos como la oxidación, desamidación, etc. Como tal, la presente invención asimismo abarca cualquier otro tipo de procesos, mientras que estos procesos tengan un impacto en la estabilidad de la proteína monomérica.

El término "durante el almacenamiento" se refiere a una formulación o composición que, una vez preparada, no se administra de forma inmediata al sujeto. Por el contrario, después de la preparación, se envasa para almacenarse, ya sea en forma líquida u otra forma adecuada para la administración al individuo.

Mediante el término "forma seca" se pretende significar la formulación o composición que se seca mediante liofilización, secado por pulverización o secado con aire. La formación de agregados u oligómeros mediante una proteína monomérica o cualquier otro constituyentes de la formulación farmacéutica puede afectar de forma adversa la actividad biológica de la proteína monomérica, lo que resulta en la pérdida de la eficacia terapéutica de la formulación farmacéutica. Además, la formación de agregados u oligómeros puede causar otros problemas como el bloqueo de tuberías, membranas o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene proteínas monoméricas se administra mediante el uso de un sistema de infusión.

El término "estabilidad" se refiere a la constancia temporal relativa de la actividad de una proteína como la actividad antiviral y/o la estructura proteica y tiene por necesidad una definición funcional. El término "estabilidad" se refiere asimismo a la estabilidad física, química y conformacional de las pre-formulaciones de interferón de la presente invención (incluido el mantenimiento de la eficacia biológica). La inestabilidad de una pre-formulación proteica puede provocarse por degradación o agregación química de las moléculas de la proteína para formar polímeros de orden superior, por desglicosilación, modificación de glicosilación, oxidación o cualquier otra modificación estructural que reduzca al menos una actividad biológica de una proteína monomérica incluida en la presente invención.

Una pre-formulación "estable" es aquella donde el grado de degradación, modificación, agregación, pérdida de actividad biológica y similares, de las proteínas que allí se encuentran está bajo control de forma aceptable y no aumenta de forma inaceptable con el tiempo.

Los términos "estabilizado/a" se refieren a una proteína monomérica o una formulación que contiene una proteína monomérica de la presente invención que muestra un aumento y/o mantenimiento de la estabilidad relativa a las proteínas monoméricas o formulaciones preparadas en ausencia de un excipiente como se divulga en la presente agregadas a la proteína monomérica a granel o a una formulación que contiene la proteína monomérica.

Como se utiliza en la presente, el término "estabilizar" se utiliza de forma intercambiable con "que reduce y/o previene la agregación de proteínas" y/o "que reduce y/o previene la oligomerización de proteínas" y/o "que reduce y/o previene la formación de agregados" y/o "que reduce y/o previene la polimerización" y/o "que reduce y/o previene la oxidación" y/o "reduce y/o previene la formación de micela(s)" y/o "reduce y/o previene la desaminación" y/o "reduce y/o previene el efecto nocivo de cualquier tipo de proceso sobre una proteína monomérica o formulación que contiene la proteína monomérica".

Los términos "monómero" o "monomérico/a" se refieren a una molécula que tiene únicamente una cadena de péptidos simple.

5 Los términos "proteína a granel" o "volumen de proteína" o "proteína monomérica a granel" o "volumen de la proteína monomérica" se refieren en la presente al estado de una proteína o proteína monomérica que ya se sometió a las etapas de purificación del proceso de fabricación, pero que aún no se sometió a las etapas de formulación final, que permiten preparar la "forma de dosificación final" (FDF) o "composición farmacéutica" como finalmente se envasa y distribuye para la venta. Por tanto, la proteína recombinante a granel se considera en la presente como el producto que resulta al final del proceso de purificación pero antes de que este producto se someta a las etapas de formulación final. En otras palabras, puede considerarse que el procedimiento de la presente invención comprende una etapa de pre-formulación, que permite obtener un volumen preformulado, el cual mediante la adición siguiente de otros excipientes producirá la forma de dosificación final de la composición farmacéutica. Habitualmente, el volumen pre-formulado o no formulado se almacena antes de que se prepare la formulación final, pero no necesariamente. Si se almacena en un estado congelado, la proteína a granel generalmente se descongela y después se somete a las etapas de formulación fina, pero no necesariamente.

15 De conformidad con una realización específica de la presente invención, en el caso en que la proteína sea interferón beta 1a recombinante humano (r-h IFN beta 1a), se agrega un excipiente estabilizador al eluido de la etapa cromatográfica final, que puede ser por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), denominada en la presente como "SEC-EL" o "SEC-EL2", ya sea antes de someterse a una etapa de filtración o inmediatamente después a la etapa de filtración (ver los ejemplos). En este caso, la SEC representa la etapa final del procedimiento de purificación. En otros procedimientos de purificación, pueden utilizarse otras técnicas cromatográficas o procedimientos de separación en la etapa final, o pueden aplicarse otros procedimientos de purificación que no dependen de procedimientos de separación como una etapa de purificación final; esto no debería por ningún concepto limitar el alcance de la presente invención como se define en el término "proteína a granel". Siempre que el excipiente estabilizador se agregue después del procedimiento de purificación, cualquiera sea el procedimiento de purificación, se encuentra comprendido en la presente invención. Asimismo, los excipientes estabilizadores mencionados en la presente invención pueden agregarse además a la formulación final (FDF). Por tanto, los excipientes comprendidos en una FDF pueden corresponder a aquellos que se agregaron a la pre-formulación a granel pero no necesariamente.

30 Una "proteína oligomérica" u "oligómero" como se utiliza en la presente, se refiere a una proteína con múltiples subunidades que tiene dos o más cadenas de polipéptidos. El término "proteína oligomérica" a veces se refiere a una proteína donde dos o más de sus unidades son cadenas de polipéptidos idénticas. Pueden distinguirse al menos tres tipos de oligómeros:

- Los oligómeros pequeños no covalentes rápidamente reversibles (dímero, trímero, tetramero, etc.),
- Los oligómeros no covalentes irreversibles
- 35 • Los oligómeros covalentes (por ejemplo, disulfuros)

El término "proteína multimérica" describe una proteína compuesta por varias subunidades. Una "subunidad" se refiere a una de las moléculas de la proteína idénticas o no idénticas que componen una proteína multimérica.

40 La "oligomerización" se refiere al proceso químico para crear oligómeros a partir de moléculas más grandes o más pequeñas. El término "oligomerización" se refiere asimismo al proceso para convertir un monómero o una mezcla de monómeros en un oligómero. El término "oligomerización" se refiere asimismo a la formación de multímeros de moléculas de proteína individuales mediante interacción covalente o no covalente. La oligomerización puede ser reversible o irreversible.

45 El término "polimerización" describe las reacciones químicas que producen los polímeros mediante la combinación repetida de monómeros para crear moléculas largas o grandes o el proceso para convertir un monómero o una mezcla de monómeros en un polímero.

50 El término "agregación" se refiere a la formación de especies de mayor masa molecular principalmente debido a la adherencia no covalente de especies más pequeñas. Especialmente para las proteínas, la agregación es una forma de desnaturalización en la cual las superficies no polares de las estructuras secundarias, por ejemplo, aquellas de hélices alfa y láminas beta que normalmente forman interacciones intramoleculares y que se entierran en el interior de la proteína, se dejan interactuar intermolecularmente y formar formas multimoleculares que a veces son insolubles. Los términos "insoluble" en oposición a "soluble" a veces se denominan respectivamente como "reversible" en oposición a "irreversible". Los agregados asimismo pueden definirse como una gran asociación de proteínas oligoméricas (por ejemplo más de 10 mer). Los "agregados" pueden ser reversibles si no son covalentes.

60 La presente invención no debe limitarse por las definiciones de "agregación", "agregados(s)", "oligómero(s)", "multímero(s)", "oligomerización", "multimerización", "multimérico", "oligomérico", "polimerización" o la definición que sea. Por tanto, el alcance de la presente invención no debe limitarse por dichos términos o por ninguna teoría relacionada. Lo importante es que los "agregados" y "oligómeros" pueden distinguirse uno del otro mediante procedimientos de detección (por ejemplo, SE-HPLC), generalmente mediante señales distinguibles separadas, por ejemplo, mediante picos separados; cada pico corresponde o a agregados o a oligómeros. Del mismo modo, la forma monomérica de la proteína corresponde a un único pico determinado preciso.

65

El término “solución amortiguadora” o “solución amortiguadora farmacéuticamente aceptable” se refiere a soluciones de compuestos conocidas por ser seguras 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. Las soluciones amortiguadoras aceptables para controlar el pH de un pH moderadamente ácido a un pH moderadamente básico incluyen, a modo no taxativo, los compuestos como fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS e histidina. “TRIS” se refiere a 2-amino-2-hidroximetil-1,3,-propanodiol y a cualquiera de sus sales farmacológicamente aceptables. Preferentemente las soluciones amortiguadoras son soluciones amortiguadoras de acetato con solución salina o una sal farmacéuticamente aceptable.

El “agente de isotonicidad” es un compuesto que se tolera fisiológicamente e imparte una tonicidad adecuada a una formulación para prevenir el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que se encuentran en contacto con la formulación. Los compuestos como glicerina, se utilizan comúnmente a tales efectos en concentraciones conocidas. Otros agentes de isotonicidad adecuados incluyen, a modo no taxativo, aminoácidos o proteínas, (por ejemplo, glicina o albúmina), sales (por ejemplo, cloruro de sodio) y azúcares (por ejemplo, dextrosa, manitol, sacarina y lactosa). Preferentemente el agente de isotonicidad es manitol.

El término “antioxidante” se refiere a un compuesto que evita que el oxígeno o los radicales libres derivados de oxígeno interactúen con otras sustancias. Los antioxidantes se encuentran entre los varios excipientes comúnmente agregados a los sistemas farmacéuticos para mejorar la estabilidad física y química. Los antioxidantes se agregan para minimizar o retardar los procesos oxidativos que ocurren con algunos fármacos o excipientes tras la exposición a oxígeno o en la presencia de radicales libres. Estos procesos pueden a menudo catalizarse con luz, temperatura, hidrógeno en la concentración, presencia de metales de rastro o peróxidos. Los sulfitos, bisulfitos, tiourea, metionina, sales de ácido etilenediaminatetraacético (EDTA), hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA) se utilizan frecuentemente como antioxidantes en fármacos. Se halló que el EDTA sódico mejora la actividad de los antioxidantes mediante la quelación de los iones metálicos que de otro modo catalizarían la reacción de oxidación. El antioxidante más preferido es la metionina. Los antioxidantes asimismo se denominan en la presente como estabilizadores.

La metionina puede encontrarse presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Cualquier estereoisómero (es decir, isómero L, D o DL) de metionina puede utilizarse en el presente procedimiento o formulación de la invención siempre y cuando la metionina se encuentre presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Preferentemente, se utiliza el L-estereoisómero. Pueden utilizarse análogos de metionina en la presente formulación de la invención. El término “análogo de metionina” se refiere a un derivado de metionina natural. Los análogos de metionina pueden utilizarse en la presente formulación en su forma de base libre o en su forma de sal.

El aumento y/o mantenimiento de la estabilidad con la adición de antioxidantes (por ejemplo, metionina) depende de la concentración. Es decir, el aumento de las concentraciones de antioxidantes conduce al aumento y/o mantenimiento de la estabilidad de la formulación que contiene interferón beta de la presente invención cuando dicha formulación que contiene interferón beta normalmente muestra oxidación o formación de agregados/oligómeros en ausencia del antioxidante. La determinación de la cantidad de oxidante (por ejemplo, metionina) que debería utilizarse en la presente formulación de la invención, para disminuir la oxidación o la formación de oligómeros/agregados, puede determinarse fácilmente sin experimentación excesiva mediante el uso de procedimientos generalmente conocidos por el entendido en la técnica.

El término “bacteriostático” se refiere a un compuesto o composiciones agregadas a una formulación para actuar como agente antibacteriano. Una formulación conservada de la presente invención que contiene interferón preferentemente cumple con las directrices reglamentarias o reguladoras para la eficacia conservante para que sea un producto multiuso comercialmente viable. Los ejemplos de bacteriostáticos incluyen fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabén (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, dehidroacetato sódico y timerosal. Preferentemente el agente bacteriostático es alcohol bencílico. El alcohol bencílico es denominado estabilizador en la presente.

El término “tensioactivo” se refiere a un compuesto soluble que reduce la tensión de la superficie de los líquidos o reduce la tensión interfacial entre dos líquidos o un líquido y un sólido, la tensión superficial es la fuerza que actúa sobre la superficie de un líquido, lo que tiende a minimizar el área de superficie. Los tensioactivos se han utilizado a veces en las formulaciones farmacéuticas, incluida la producción de fármacos y polipéptidos de bajo peso molecular, para modificar la absorción del fármaco o su suministro a los tejidos diana. Preferentemente, el tensioactivo es TWEEN 20 o un poloxámero. Más preferentemente, el tensioactivo es Poloxamer 188. Incluso más preferentemente, el tensioactivo es TWEEN™ 20.

El término “aminoácido” se refiere a un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado se encuentra presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Cuando se utiliza una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden encontrarse presentes en sus formas de base libre, todos pueden encontrarse presentes en su forma de sal o algunos pueden encontrarse presentes en sus formas de base libre mien-

tras que otros se encuentran presentes en su forma de sal. Los aminoácidos preferidos para utilizar en el presente procedimiento o formulación de la presente invención son aquellos que tienen una cadena lateral cargada, como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Más preferentemente, los aminoácidos son lisina y arginina. Incluso más preferentemente, el aminoácido es lisina. Cualquier estereoisómero (es decir, isómero L, D o DL) de un aminoácido particular o combinaciones de estos estereoisómeros, puede utilizarse en el presente procedimiento o formulación de la invención siempre y cuando el aminoácido particular se encuentre presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Preferentemente, se utiliza el L-estereoisómero. Los análogos de estos aminoácidos preferidos pueden asimismo utilizarse en el presente procedimiento o formulación de la invención. El término "análogo de aminoácido" se refiere a un derivado del aminoácido natural. Los análogos de arginina adecuados incluyen por ejemplo, aminoguanidina y N-monoetil L-arginina. Como los aminoácidos preferidos, los análogos de aminoácidos se utilizan en el presente procedimiento o formulación en su forma de base libre o en su forma de sal. Los aminoácidos se llaman en la presente también estabilizadores.

Los aminoácidos utilizados en el presente procedimiento o formulación de la invención protegen al polipéptido terapéuticamente activo de varias tensiones, para de esa manera aumentar y/o mantener la estabilidad de la proteína monomérica o de la formulación que contiene la proteína monomérica durante el tiempo de vida de la proteína monomérica (antes, durante y después del almacenamiento). En la presente, el término "tensión" incluye a modo no taxativo, calentamiento, congelamiento, pH, luz, agitación, oxidación, deshidratación, superficies, cizallamiento, congelamiento/descongelamiento, presión, metales pesados, compuestos fenólicos, desnaturizantes, etc. El término tensión abarca cualquier factor que module (es decir, reduzca, mantenga o aumente) la estabilidad de una proteína (monomérica) o de una formulación que contenga la proteína (monomérica). El aumento y/o mantenimiento de la estabilidad con la adición de aminoácidos depende de la concentración. Es decir, el aumento de las concentraciones de aminoácidos conduce al aumento y/o mantenimiento de la estabilidad de una proteína monomérica o una formulación que contiene una proteína monomérica de la presente invención cuando dicha proteína monomérica o formulación que contiene la proteína monomérica normalmente muestra la formación de agregados u oligómeros en ausencia de aminoácidos. La determinación de la cantidad de un aminoácido particular que debería utilizarse en el presente procedimiento o formulación de la invención para disminuir la formación de oligómeros o agregados y de ese modo aumentar la estabilidad de la proteína monomérica, y así aumentar la estabilidad de la formulación durante el tiempo de vida de la proteína monomérica, puede determinarse fácilmente para cualquier proteína monomérica particular de interés sin experimentación excesiva mediante el uso de procedimientos generalmente conocidos por el entendido en la técnica.

"Almacenamiento congelado" se refiere al congelamiento y mantenimiento de una preparación de proteína monomérica previamente acuosa a una temperatura de 0 °C, preferentemente de -20 °C o menor, más preferentemente de -70 °C.

"Ciclos de congelamiento/descongelamiento" o "manipulaciones de congelamiento/descongelamiento" se refiere a técnicas para el uso de una muestra de proteína en almacenamiento congelado, donde la temperatura de la muestra se eleva a un nivel que restituirá la muestra a su estado acuoso durante un período de tiempo suficiente para permitir el uso de Rampie, seguido del congelamiento a una temperatura por debajo de los 0 °C para después devolver al estado de congelamiento, preferentemente a una temperatura de -20 °C o menor, más preferentemente de -70 °C.

El propósito de la presente invención es contrarrestar al menos los procesos de agregación y oligomerización (la invención no se limita solo a estos procesos) no solamente de la proteína monomérica sino también de otros agentes, ingredientes o compuestos que se agregan asimismo a la proteína a granel de conformidad con la presente invención. Por tanto, la presente invención es capaz de conferir estabilidad (por ejemplo, mediante la reducción y/o inhibición de la formación de oligómeros así como agregados) a todos los compuestos, agentes (por ejemplo, agentes bacteriostáticos, agentes de isotonicidad) proteínas, tensioactivos, excipientes, que se agregan al volumen de conformidad con la presente invención y que se incluirán en la forma de dosificación final o en la composición farmacéutica de la proteína en cuestión. En otras palabras, la estabilización se confiere no solamente a la proteína (monomérica) sino también a "la totalidad" de la formulación que contiene la proteína (monomérica). La agregación no solamente puede comprometer la actividad biológica sino también conducir a reacciones del sitio de inyección e inmunogenicidad a través del desarrollo de anticuerpos neutralizadores (NAb).

Los presentes ejemplos muestran claramente que la adición de excipientes particulares a una formulación de proteína monomérica a granel puede aumentar significativamente la estabilidad y solubilidad de la formulación de proteína monomérica mediante la prevención y/o inhibición de la formación de agregados u oligómeros de polipéptidos durante el almacenamiento congelado y/o ciclos de congelamiento/descongelamiento repetidos. Asimismo, la presente invención muestra que la disociación térmica es eficaz para conferir estabilidad a una proteína (monomérica) o a una formulación que contiene la proteína (monomérica).

El término "disociación térmica" se refiere en la presente al proceso por el cual las proteínas que se encuentran en la forma de multímeros se convierten o disocian en una forma multimérica reducida o en una forma monomérica por la acción de la temperatura (por ejemplo, los dímeros de una proteína se convierten en monómeros cuando se los somete a una temperatura específica). La proteína en la formulación se encuentra presente en formas multiméricas (diméricas, triméricas, etc.). La disociación térmica es por tanto eficaz para convertir o disociar todas las formas



multiméricas a formas multiméricas reducidas o a formas monoméricas. La presente invención muestra que existe una correlación entre la temperatura y la disociación de los multímeros. Cuando se somete a disociación térmica, la formulación comprenderá menos formas multiméricas y mayor cantidad de formas monoméricas en comparación con una que no se sometió a disociación térmica. Preferentemente, la disociación térmica convierte todas las formas multiméricas en formas monoméricas. La temperatura puede ajustarse inmediatamente a una temperatura fija o permitir el aumento gradual hasta alcanzar una temperatura específica. Asimismo, la presente invención demuestra que la duración de la disociación térmica es eficaz en la estabilización de la proteína (monomérica) o la formulación que contiene la proteína (monomérica). La presente invención muestra que existe una correlación entre la disociación térmica y la disociación de los -mers. Los ejemplos indican que la disociación térmica es más eficaz durante las primeras horas de la disociación térmica, hasta alcanzar cierto punto donde la duración se vuelve ineficaz. La disociación térmica es específica para cada proteína. El ajuste de los parámetros adecuados como la temperatura y la duración de una proteína particular para alcanzar una disociación térmica óptima puede realizarse fácilmente por el entendido en la técnica mediante el uso de técnicas convencionales.

Numerosos procedimientos analíticos son conocidos por el entendido en la técnica para determinar los productos de degradación como la agregación, oxidación, desamidación, escisión, absorción de superficie, desnaturalización de superficie, formación de imidas cíclicas, truncamiento, etc. Los procedimientos que indican la estabilidad incluyen, a modo no taxativo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), HPLC de exclusión por tamaño (SEC), con o sin desnaturalizantes como SDS, HCl de guanidinio o disolvente orgánico en la misma muestra o en la fase móvil), HPLC de fase inversa (RP), HPLC de intercambio de iones, electroforesis, cromatografía de interacción hidrofoba (HIC), cromatografía por afinidad, SDS-PAGE, reducción de disulfuro con agentes reductores, electroforesis nativa en gel, electroforesis capilar, ultracentrifugado analítico, dispersión de luz, ensayo de turbidez y ensayo de concentración de proteínas. Los estudios de estabilidad de estructura pueden realizarse por dicroísmo circular, fluorescencia (unión de sonda intrínseca e hidrofoba), UV, FTIR y/o calorimetría de barrido diferencial. Por tanto, el efecto de un excipiente particular sobre la agregación u oligomerización de proteínas monoméricas puede determinarse por ejemplo mediante el cambio en las proteínas monoméricas solubles en la solución con el paso del tiempo.

En la HPLC de exclusión por tamaño o SEC, también conocida como cromatografía de filtración en gel o cromatografía de cribado molecular, las columnas se diseñan con una matriz porosa que retiene moléculas más pequeñas que el tamaño del poro mientras que las moléculas más grandes se excluyen y se eluden previamente. Se utiliza un gradiente isocrático para la mayoría de las aplicaciones.

La presente invención se describirá a continuación en sus diferentes aspectos.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para preparar una solución a granel estable de una proteína monomérica, donde dicha proteína es un interferón y el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una proteína monomérica a granel en una solución amortiguadora, y
  - b) agregar un excipiente al volumen, donde el excipiente se selecciona del grupo que consiste en:
    - i) un agente bacteriostático,
    - ii) un tensioactivo,
    - iii) un agente de isotonicidad,
    - iv) un aminoácido,
    - v) un antioxidante,
    - vi) un agente de isotonicidad y un antioxidante,
    - vii) un agente de isotonicidad, un antioxidante y un aminoácido,
    - viii) un aminoácido y un antioxidante,
    - ix) un aminoácido, un antioxidante y un tensioactivo,
    - x) un agente bacteriostático y un antioxidante, y
    - xi) un agente bacteriostático, un antioxidante y un tensioactivo, y
- comprende además una etapa de incubación de dicha proteína a granel a una temperatura comprendida en el intervalo de 27°C a 31°C durante 3 a 40 horas.

Los excipientes o sus combinaciones pueden agregarse además a la formulación final (FDF) y no solamente al volumen de proteína monomérica. En otras palabras, los excipientes pueden agregarse en varias etapas de un volumen de una proteína monomérica y asimismo en las etapas de formulación final del proceso de fabricación, pero al menos una vez al volumen de proteína monomérica. Preferentemente, la proteína monomérica es un interferón. Más preferentemente, el interferón es IFN beta. Incluso más preferentemente, el IFN beta es IFN beta recombinante humano.

Preferentemente, la proteína se estabiliza contra la agregación u oligomerización.

Preferentemente, el agente bacteriostático es alcohol bencílico, el tensioactivo es Tween 20, el agente de isotonicidad es manitol, el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en lisina o arginina y el antioxidante es metionina. Las combinaciones preferidas de excipientes son:

1. el agente de isotonicidad es manitol y el antioxidante es metionina,

2. el agente de isotonicidad es manitol, el antioxidante es metionina y el aminoácido es lisina,
3. el aminoácido es lisina y el antioxidante es metionina,
4. el aminoácido es lisina, el antioxidante metionina y el tensioactivo es Tween 20,
5. el agente bacteriostático es alcohol bencílico y el antioxidante es metionina o
6. el agente bacteriostático es alcohol bencílico, el antioxidante es metionina y el tensioactivo es Tween 20.

La proteína a granel puede incubarse a temperaturas específicas para favorecer la disociación de la proteína monomérica a granel. El intervalo de temperatura es de 27 °C a 31 °C. Más preferentemente, la temperatura se ajusta a 29 °C. De forma alternativa, se permite un aumento gradual de temperatura, hasta alcanzar las temperaturas específicas mencionadas anteriormente. Preferentemente, la incubación se realiza durante al menos 3 horas o durante el intervalo de 6 horas a 40 horas. Más preferentemente, la incubación se realiza durante un intervalo de 15 horas a 30 horas o durante 10 horas, 16 horas, 18,5 horas o 24 horas. Incluso más preferentemente, la incubación se realiza durante 24 horas. La incubación puede llevarse a cabo antes o después de la etapa de pre-formulación de conformidad con el primer aspecto de la invención, pero sin limitarse a este. La proteína monomérica que se estabilizó conforme al primer aspecto de la invención puede incubarse en cualquier etapa del proceso de fabricación, es decir, asimismo en las etapas de formulación final.

Asimismo, se describe una proteína a granel pre-formulada mediante el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para aumentar y/o mantener la estabilidad de una proteína monomérica, donde dicha proteína es un interferón, y que comprende un procedimiento para la pre-formulación del volumen de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La invención se describirá a continuación por su realización preferida a la luz de una proteína monomérica e interferón específicos y más preferentemente un IFN beta.

Un "interferón" o "IFN", como se utiliza en la presente, pretende incluir cualquier molécula definida como tal en la bibliografía, que comprende por ejemplo cualesquiera tipos de los IFN mencionados en la sección anterior "Antecedentes de la invención". En particular los IFN alfa., IFN beta e IFN gama se encuentran incluidos en la definición anterior. El IFN beta es el IFN preferido de acuerdo con la presente invención. El IFN beta adecuado de acuerdo con la presente invención se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo, como Rebif<sup>®</sup> (Serono), Avonex<sup>®</sup> (Biogen) o Betaferon<sup>®</sup> (Schering). El uso de interferones de origen humano es asimismo preferido de acuerdo con la presente invención. El término interferón, como se utiliza en la presente, pretende abarcar las sales, derivados funcionales, variantes, análogos y sus fragmentos activos.

El término "interferón beta (o IFN beta)", como se utiliza en la presente, pretende incluir interferón de fibroblastos en particular de origen humano, obtenido mediante el aislamiento de fluidos biológicos o mediante técnicas de recombinación de ADN a partir de células huésped procariotas o eucariotas, así como sus sales, derivados funcionales, variantes, análogos y fragmentos activos. Preferentemente el IFN beta pretende significar interferón beta 1a.

Como se utiliza en la presente el término "muteínas" se refiere a análogos de IFN en los cuales uno o más de los residuos de aminoácidos de un IFN natural se reemplazan con diferentes residuos de aminoácidos o se eliminan o se agregan uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia natural del IFN, sin cambiar de manera significativa la actividad de los productos resultantes en comparación con el IFN original. Estas muteínas se preparan mediante la síntesis conocida y/o técnicas de mutagénesis dirigidas por el sitio o cualquier otra técnica conocida adecuada para ello. Las muteínas preferidas incluyen por ejemplo, aquellas descritas por Shepard et al. (1981) o Mark et al. (1984).

Cualquiera de dichas muteínas tiene preferentemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa como la del IFN, de forma tal de tener una actividad sustancialmente similar o incluso mejor que la del IFN. La función biológica del interferón es bien conocida por el entendido en la técnica y los estándares biológicos se encuentran establecidos y disponibles por ejemplo, en el Instituto Nacional de Estándares Biológicos y Control (<http://immunology.org/links/NIBSC>).

Se han descrito los bioensayos para la determinación de la actividad del IFN. El ensayo de IFN puede llevarse a cabo, por ejemplo, en la forma descrita por Rubinstein et al., 1981. Por tanto, puede determinarse si cualquier muteína dada tiene una actividad sustancialmente similar o incluso mejor que el IFN por medio de experimentos de rutina.

Las muteínas de IFN, que pueden utilizarse de conformidad con la presente invención, o la codificación de ácidos nucleicos para ello, incluyen un grupo finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden obtenerse de forma rutinaria por el entendido en la técnica, sin experimentación excesiva, con base en las demostraciones e instrucciones presentadas en la presente.

Los cambios preferidos para las muteínas de conformidad con la presente invención son los que se conocen como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de polipéptidos o proteínas de la invención, pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo, que tienen propiedades físicoquímicas suficientemente similares, de forma tal que la sustitución entre miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula. Está claro que las inserciones y eliminaciones de aminoácidos pueden realizarse asimismo en las secuencias definidas anteriormente sin alterar su función, particularmente si las inserciones o eliminaciones implican únicamente unos pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta y preferentemente menos de diez y no extraen o desplazan aminoácidos que son críticos para la conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas por tales eliminaciones y/o inserciones se encuentran comprendidas en el ámbito de la presente invención.

Preferentemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la tabla 1. Más preferentemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la tabla II; e incluso más preferentemente los grupos de aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la tabla III.

#### **TABLA I**

##### **Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos:**

20	<b>Aminoácido</b>	<b>Grupo sinónimo</b>
	Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
	Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
	Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
	Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
25	Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
	Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
	Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
	Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
	Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
30	Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
	Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
	Cys	Ser, Thr, Cys
	His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
	Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
35	Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
	Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
	Asp	Glu, Asn, Asp
	Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
40	Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
	Trp	Trp

#### **TABLA II**

##### **Grupos de aminoácidos sinónimos más preferidos:**

45	<b>Aminoácido</b>	<b>Grupo sinónimo</b>
	Ser	Ser
	Arg	His, Lys, Arg
	Leu	Leu, Ile, Phe, Met
	Pro	Ala, Pro
50	Thr	Thr
	Ala	Pro, Ala
	Val	Val, Met, Ile
	Gly	Gly
	Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
55	Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
	Tyr	Phe, Tyr
	Cys	Cys, Ser
	His	His, Gln, Arg
	Gln	Glu, Gln, His
60	Asn	Asp, Asn
	Lys	Lys, Arg
	Asp	Asp, Asn
	Glu	Glu, Gln
	Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
65	Trp	Trp

**TABLA III****Grupos de aminoácidos sinónimos incluso más preferidos**

<b>Aminoácido</b>	<b>Grupo sinónimo</b>
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gin	Gin
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

5

Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden utilizarse para obtener muteínas de IFN, para su uso en la presente invención incluyen cualquier etapa de procedimiento conocida, como las presentadas en las patentes de los EE.UU. No. 4,959,314, 4,588,585 y 4,737,462, de Mark et al; 5,116,943 de Kothe et al., 4,965,195 de Namen et al; 4,879,111 de Chong et al; y 5,017,691 de Lee et al; y las proteínas sustituidas por lisina presentadas en la patente de los EE.UU. No. 4,904,584 (Shaw et al). Las muteínas específicas de IFN beta las describieron, por ejemplo, Mark et al., 1984.

10

El término "proteína fusionada" se refiere a un polipéptido que comprende un IFN, o su muteína, fusionado a otra proteína, que por ejemplo, presenta un tiempo de residencia extendido en los fluidos corporales. Un IFN puede por tanto fusionarse a otra proteína, polipéptido o similar, por ejemplo, una inmunoglobulina o su fragmento.

15

Los "derivados funcionales" como se utiliza en la presente abarcan derivados de IFN y sus muteínas y proteínas fusionadas, que pueden prepararse a partir de grupos funcionales que ocurren como cadenas laterales sobre los residuos o los grupos terminales N o C, por medios conocidos en la técnica y se incluyen en la invención siempre y cuando continúen siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, que no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad del IFN y no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen. Estos derivados pueden, por ejemplo, incluir cadenas laterales de polietilenglicol que pueden ocultar sitios antigénicos y extender la residencia del IFN en fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de grupos carboxilo, amidas de grupos carboxilo mediante la reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos amino libres de residuos de aminoácidos formados con porciones acilo (por ejemplo, grupos alcanóilo o aroílo carboxílico) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, aquellos de residuos de serilo o treonilo) formados con porciones acilo.

20

25

Como "fracciones activas" de IFN o muteínas y proteínas fusionadas, la presente invención abarca cualquier fragmento o precursores de cadena de polipéptidos de la molécula de proteína sola o junto con moléculas asociadas o residuos unidos a esta, por ejemplo, residuos de azúcar o fosfato o agregados de la molécula de proteína o de los residuos de azúcar solos, siempre que dicha fracción no presente una actividad significativamente reducida en comparación con el IFN correspondiente.

30

El término "sales" en la presente se refiere a las sales de grupos carboxilo y a las sales de adición de ácido de grupos amino de las proteínas descritas anteriormente o sus análogos. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amoníaco, férricas o de zinc y similares y sales con bases orgánicas como aquellas formadas por ejemplo, con aminas, como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido, por ejemplo, sales con ácidos minerales, como por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y las sales con ácidos orgánicos como por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de dichas sales debe retener la actividad biológica de las proteínas (IFN) importante para la presente invención, es decir, la habilidad de unirse al receptor correspondiente y comenzar la señalización por receptor.

De conformidad con la presente invención, es además particularmente preferido el uso de IFN beta recombinante humano y los compuestos de la invención.

Recientemente se ha descrito un tipo especial de variante de interferón. Los llamados "interferones de consenso" son variantes de IFN que no son naturales (patente de los EE.UU. No. 6.013.253). De acuerdo con una realización preferida de la invención, los compuestos de la invención se utilizan en combinación con un interferón de consenso. Como se utiliza en la presente, el interferón de consenso humano (IFN con) significará un polipéptido que no es natural, que predominantemente incluye aquellos residuos de aminoácidos que son comunes a un subgrupo de representantes de IFN alfa de la mayoría de las secuencias de subtipos de interferón de leucocitos humanos naturales y que incluye, en una o más de esas posiciones donde no hay ningún aminoácido común a todos los subtipos, un aminoácido que ocurre predominantemente en dicha posición y en ningún caso incluye cualquier residuo de aminoácido que no existe en dicha posición en al menos un subtipo natural. El IFN con abarca, a modo no taxativo, las secuencias de aminoácidos designadas como IFN con1, IFN con2 e IFN con3 que se divulgan en las patentes de los EE.UU. No. 4,695,623, 4,897,471 y 5,541,293. Las secuencias de ADN que codifican el IFN con pueden producirse como se describe en las patentes mencionadas anteriormente mediante otros procedimientos estándar.

En otra realización preferida, la proteína fusionada comprende una fusión Ig. La fusión puede ser directa o a través de un péptido ligador corto que puede ser tan corto como de 1 a 3 residuos de aminoácidos de longitud o más largo, por ejemplo, 13 residuos de aminoácidos de longitud. Dicho ligador puede ser un tripéptido de la secuencia E-F-M (Glu-Fe-Met), por ejemplo, o una secuencia ligadora de 13 aminoácidos que comprende Glu-Fe-Gli-Ala-Gli-Leu-Val-Leu-Gli-Gli-Gln-Fe-Met introducida entre la secuencia de IFN y la secuencia de inmunoglobulina. La proteína de fusión resultante puede tener propiedades mejoradas, como un tiempo de residencia en los fluidos corporales extendido (semivida de eliminación), un aumento en la actividad específica, un aumento en el nivel de expresión o se facilita la purificación de la proteína de fusión.

En otra realización preferida, el IFN se encuentra fusionado a la región constante de una molécula de Ig. Preferentemente, se fusiona a regiones de cadena pesada, como los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 humana, por ejemplo. Otras isoformas de moléculas de Ig son asimismo adecuadas para la generación de proteínas de fusión de conformidad con la presente invención, como isoformas IgG sub2, IgG sub3 o IgG sub4 u otras clases de Ig como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monoméricas o multiméricas, hetero u homomultiméricas.

En otra realización preferida, el derivado funcional comprende al menos una porción ligada a uno o más grupos funcionales, que ocurren como una o más cadenas laterales sobre los residuos de aminoácidos. Preferentemente, la porción es una porción de polietileno (PEG). La PEGilación puede llevarse a cabo a través de procedimientos conocidos, como los descritos en WO99/55377, por ejemplo.

La presente invención puede aplicarse de forma general a todos los tipos de interferón, a los mencionados anteriormente así como los interferones naturales, interferones producidos mediante tecnología de ADN recombinante e interferones producidos mediante síntesis o modificación química. El término interferón, también pretende abarcar interferón bruto, semipurificado y purificado de fibroblastos, leucocitos, linfocitos o cualquier otro tejido humano o de cualquier otra especie que contenga o produzca interferón. Más preferentemente, la presente invención es aplicable al interferón de fibroblasto humano (interferón beta).

Preferentemente, la concentración de IFN beta en la pre-formulación es de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 2000 µg/ml, más preferentemente de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 1000 µg/ml, más preferentemente de aproximadamente 500 o de aproximadamente 810 µg/ml.

Preferentemente, la solución amortiguadora se encuentra presente en una cantidad suficiente para mantener el pH de dicha composición dentro de más o menos 0,5 unidades de un pH especificado, donde el pH especificado es de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 5,5. Más preferentemente, el pH es 3,8, 4,2 o 4,7. Incluso más preferentemente, el pH es 4,7. Preferentemente, la solución amortiguadora se encuentra presente en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 500 mM. Las concentraciones de las soluciones amortiguadores en la solución total pueden variar entre aproximadamente 5 mM, 9,5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM y 500 mM. Preferentemente la concentración de la solución amortiguadora es de aproximadamente 10 mM o de aproximadamente 50 mM. Es particularmente preferida la solución amortiguadora de aproximadamente 50 mM en

iones de acetato a un pH de 4,7. Preferentemente, la solución amortiguadora es una solución amortiguadora de acetato con contraiones preferidos que son iones de sodio o potasio. Las soluciones amortiguadoras salinas de acetato son bien conocidas en la técnica.

5 Preferentemente, la concentración del agente de isotonicidad (por ejemplo manitol) se encuentra presente en aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. Más preferentemente, la concentración del agente de isotonicidad es de aproximadamente 55 mg/ml. Incluso más preferentemente, la concentración del agente de isotonicidad es de aproximadamente 150 mM o de aproximadamente 300 mM o de aproximadamente 600 mM.

10 Preferentemente, la concentración del tensioactivo (es decir, Tween 20) es de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml. Más preferentemente, la concentración del tensioactivo es de aproximadamente 0,05 mg/ml.

15 Preferentemente, la concentración del antioxidante (es decir, metionina) se encuentra presente en aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 5,0 mg/ml. Más preferentemente, la concentración del antioxidante es de aproximadamente 0,12 mg/ml o de aproximadamente 0,24 mg/ml.

20 Preferentemente, el aminoácido es lisina o arginina. Incluso más preferentemente, el aminoácido es lisina. Preferentemente, la concentración del aminoácido (por ejemplo lisina o arginina) se encuentra presente en aproximadamente 20 a aproximadamente en 200 mg/ml. Preferentemente, la concentración de lisina es de aproximadamente 27 mg/ml o de aproximadamente 55 mg/ml o de aproximadamente 82 mg/ml o de aproximadamente 164 mg/ml. Más preferentemente, la concentración de arginina es de aproximadamente 32 mg/ml o de aproximadamente 63 mg/ml.

25 Preferentemente, la concentración del agente bacteriostático (por ejemplo alcohol bencílico) es de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml. Más preferentemente, la concentración del agente bacteriostático es de aproximadamente 5 mg/ml o de aproximadamente 10 mg/ml.

#### EJEMPLOS

30 Los métodos analíticos utilizados en los siguientes ejemplos se describen en el ejemplo 6.

#### Ejemplo 1 - Efecto de la temperatura de incubación y del tiempo de incubación sobre la estabilización del interferón a granel (disociación térmica)

35 Los siguientes experimentos se realizaron para evaluar el efecto de la temperatura de descongelamiento, la temperatura de incubación y el tiempo de incubación (duración) sobre la estabilización de un interferón beta a granel. El objetivo fue reducir de forma eficaz y coherente la formación de oligómeros de interferón y/o agregados de interferón durante el proceso de fabricación. Los siguientes experimentos se aplican principalmente a las preparaciones de interferón a granel de almacenamiento congelado (preparaciones almacenadas por debajo de los 0 °C a -20 °C o -70 °C que en principio se descongelará y a continuación oportunamente se incubarán o almacenarán a una temperatura dada y durante un tiempo dado para el procesamiento de fabricación adicional. Las consideraciones que se desprenden de estos experimentos pueden aplicarse asimismo a preparaciones que se almacenan por encima de los 0 °C (por ejemplo, 2-8 °C) y que por tanto no se someten a la etapa de descongelamiento (o a variaciones de temperatura) pero que pueden sufrir otro tipo de tensiones. En la presente, el término "reposo" se refiere a una preparación congelada que se descongeló (por ejemplo en una incubadora, un baño u otra ubicación) y después se almacenó (por ejemplo, una incubadora, un baño u otra ubicación) a una temperatura dada durante un tiempo dado; el término "temperatura de reposo" se refiere tanto a la temperatura de descongelamiento como a la temperatura de incubación; si la preparación congelada se coloca directamente en una incubadora, los términos "temperatura de incubación" y "temperatura de reposo" pueden utilizarse de forma intercambiable; el término "tiempo de reposo" se refiere al tiempo total de la duración del descongelamiento y la duración del almacenamiento (por ejemplo duración de la incubación) a una temperatura específica; si la preparación congelada se coloca directamente en una incubadora, los términos "tiempo de incubación" y "tiempo de reposo" pueden utilizarse de forma intercambiable.

#### 1.a Disociación térmica - experimento a escala de laboratorio a varias temperaturas

55 En un primer experimento, se probaron los efectos de la temperatura de descongelamiento a temperatura ambiente (RT), 25 °C, 27 °C o 29 °C, seguido por la incubación a 25 °C, 27 °C o 29 °C, durante un total de 16 horas o 24 horas. El experimento se programa de forma tal que no interfiere con los ajustes de temperatura que se mantienen estables durante todo el procedimiento. La tabla 4 así como la figura 1 resumen el procedimiento. Los niveles de oligómeros de interferón y agregados de interferón se midieron mediante un nuevo procedimiento de SEC-HPLC, que se denomina en la presente como NUEVA SEC. El procedimiento de NUEVA SEC es capaz de detectar los oligómeros covalentes y no covalentes de forma cuantitativa y cualitativa.

60

El objetivo fue optimizar la disociación térmica (TD) del interferón a granel, para reducir la oligomerización y/o agregación al mínimo antes de la preparación del producto de fármaco (reparación de daños) mediante los siguientes parámetros o variables:

- 1) Efecto de la temperatura de incubación (25 °C, 27 °C y 29 °C) sobre la eficacia de la disociación térmica,
- 2) Efecto de la duración de la incubación sobre la eficacia de la disociación térmica,
- 3) Acortamiento de la duración del descongelamiento mediante el descongelamiento en una incubadora.

**Tabla 4**

EXP.	Grupo 1			Grupo 2			Control
	RT	RT	RT	25	27	29	
Temp. de descongelamiento °C				25	27	29	RT
*Temp. de incubación °C	25	27	29	25	27	29	RT

\*El tiempo total de descongelamiento e incubación fue de 16 y de 24 horas, respectivamente

El control a temperatura ambiente se realizó una vez. El EXP del grupo 1 se realizó dos veces y el EXP del grupo 2 se realizó tres veces. Para cada condición, se utilizó un tubo de 250 ml equipado con un modelo a pequeña escala (tubo nunc de 2ml con 1,8ml de interferón a granel "fresco", el "modelo de tubo insertado"). La incubadora es con camisa de agua o con circulación de aire.

**GLOSARIO/ ABREVIATURAS**

- Ag** agregados
- COA** certificado de análisis
- Dim** dímeros
- Deg** degradantes
- FDF** forma de dosificación final
- F/T** congelamiento y descongelamiento
- r-h IFN-beta 1a** interferón beta recombinante humano 1a (r-h IFN beta 1a) de células CHO.
- r-h IFNA-beta FDF** forma de dosificación final de r-h INF-beta 1a (r-h INF-beta FDF)
- SE-HPLC** cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaños
- SAB** acetato sódico 50 mM, pH-3.8
- Temp.** Temperatura

1. Equipos y materiales del nuevo procedimiento de SEC-HPLC:

Sistema de HPLC: Waters Alliance  
 Detector UV: Waters 996 PDA longitud de onda 214 nm  
 Ajuste de temperatura de automuestreo: 4 °C.

Columna TosoHaas TSK G2000 SW<sub>XL</sub>

Temperatura de columna: temperatura ambiente  
 Fase móvil: acetato sódico 50 mM, pH 3,8 con 50 mM NaCl.  
 Preparada mediante la disolución de 5,84 g de NaCl en 2 litros de acetato sódico 50 mM, pH 3,8, solución amortiguadora. La solución amortiguadora de acetato se preparó en una unidad de solución estéril mediante la adición de ácido acético a WFI y la valoración con una solución de NaOH 10M hasta el pH 3,8.  
 Velocidad de flujo: 0,5 mL/min.  
 Volumen de inyección: 200 µL de r-h IFN beta 1a, volumen 0,34-0,36 mg/mL.

Reactivos:

Acido acético, código Merck K31358056  
 NaOH, Merck B197582  
 Solución de NaOH 10M  
 WFI  
 NaCl, JT BAKER código 3627-07 2.

2. Procedimiento - el procedimiento se ilustra en la figura 1:

- 1) Se insertaron 1,8 ml de r-h IFN beta 1a a granel fresco en tubos nunc de 2 ml y se congelaron a -70 °C dentro de los tubos de 250 ml que contenían 200 ml de agua.
- 2) Los tres tubos se descongelaron a temperatura ambiente y se incubaron de forma separada a 25 °C, 27 °C y 29 °C en incubadoras validadas (temperaturas estables o fijas en el tiempo) durante un total de 16 horas. Los tubos se muestrearon para la prueba de la NUEVA SEC después del descongelamiento y después de 16 horas (descongelamiento + incubación).
- 3) Los tres tubos se descongelaron a temperatura ambiente y se incubaron de forma separada a 25 °C, 27 °C y 29 °C en incubadoras validadas durante un total de 24 horas. Los tubos se muestrearon para la prueba de la NUEVA SEC y después del descongelamiento y después de 24 horas (descongelamiento + incubación).

- 4) Los tres tubos se descongelaron y se incubaron de forma separada a 25 °C, 27 °C y 29 °C en incubadoras validadas durante un total de 16 horas. Los tubos se muestrearon para la prueba de la NUEVA SEC después del descongelamiento y después de 16 horas (descongelamiento + incubación).
- 5) Los tres tubos se descongelaron y se incubaron de forma separada a 25 °C, 27 °C y 29 °C en incubadoras validadas durante un total de 16 horas. Los tubos se muestrearon para la prueba de la NUEVA SEC después de 16 horas (descongelamiento + incubación), no se realizó el muestreo después del descongelamiento.
- 6) Los tres tubos se descongelaron y se incubaron de forma separada a 25 °C, 27 °C y 29 °C en incubadoras por un total de 24 horas. Los tubos se muestrearon para la prueba de la NUEVA SEC después de 24 horas (descongelamiento + incubación), no se realizó el muestreo después del descongelamiento en la incubadora.
- 7) Se descongeló un tubo a temperatura ambiente durante 16 horas y se almacenó a 2-8 °C por un período de hasta 72 horas, el tubo se muestreó para NUEVA SEC para servir como control para este experimento.
- 8) Para evaluar el efecto sobre la molécula, el experimento se repitió en las condiciones seleccionadas. Las muestras incubadas se probaron por NUEVA SEC, IEF, HPLC Cuant., ES-MS, BIOENSAYO, DEG/OX HPLC, CZE. Los resultados se compararon con una muestra de control descongelada a temperatura ambiente durante 16 horas y almacenada a 2-8 °C.

3. **Resultados:** % Mon o % Monómero = % de monómeros de r-h IFN beta 1a  
 % Ag= % de agregados de r-h IFN beta 1a

• Descongelamiento a temperatura ambiente e incubación durante un total de 16 horas

Se congelaron 3 tubos de 250 ml con inserciones a -70 °C y se descongelaron a temperatura ambiente, los tubos se invirtieron de forma delicada veinte veces, se muestrearon y se transfirieron inmediatamente a tres incubadoras (25 °C, 27°C y 29 °C.) durante un total de 16 horas (descongelamiento + incubación). Las muestras se almacenaron a 2-8 °C hasta el análisis mediante la NUEVA SEC-HPLC. Los resultados se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5 \*\*Duración de la incubación - 10 horas**

Condición **	% Monómero	% Ag	% Dímero	Duración del descongelamiento
25°C	88,05	0,64	11,3	6 horas 21-22,3°C
27°C	92,58	0,70	6,7	
29°C	95,7	0,56	3,7	

• Descongelamiento a temperatura ambiente e incubación durante un total de 24 horas

Se congelaron 3 tubos de 250 ml con inserciones a -70 °C y se descongelaron a temperatura ambiente, los tubos se invirtieron de forma delicada veinte veces, se muestrearon y se transfirieron inmediatamente a tres incubadoras (25 °C, 27°C y 29 °C.) durante un total de 24 horas (descongelamiento + incubación). Las muestras se almacenaron a 2-8 °C hasta el análisis mediante la NUEVA SEC-HPLC. Los resultados se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6\*\* Duración de la incubación 18,5 horas**

Condición **	% Monómero	% Ag	% Dímero	Duración del descongelamiento
25°C	92,25	0,58	7,1	5 horas y 30 minutos 21,6-22,2°C
27°C	96,4	0,5	3,1	
29°C	97,31	0,44	2,2	

• Descongelamiento en incubadora e incubación durante un total de 16 horas



Se congelaron 3 tubos de 250 ml con inserciones a -70 °C y se descongelaron de forma separada dentro de tres incubadoras (25 °C, 27°C y 29 °C.), los tubos se invirtieron de forma delicada veinte veces después del descongelamiento y se incubaron durante un total de 16 horas (descongelamiento + incubación). Las muestras se almacenaron a 2-8 °C hasta el análisis mediante la NUEVA SEC-HPLC. Los resultados se muestran en la tabla 7.

5

**\*\*Duración de la incubación - 16 horas**

Condición **	% Monómero	% Ag	% Dímero	Duración del descongelamiento
25 °C Circulación de aire	90,22	0,52	9,2	3 horas y 9 minutos
27 °C En chaqueta de agua	93,53	0,56	5,9	5 horas
29 °C En chaqueta de agua	95,95	0,47	3,6	3 horas y 32 minutos

• Descongelamiento en incubadora e incubación durante un total de 24 horas

Se congelaron 3 tubos de 250 ml con inserciones a -70 °C y se descongelaron de forma separada dentro de tres incubadoras (25 °C, 27°C y 29 °C.), los tubos se invirtieron de forma delicada veinte veces, se muestrearon para la nueva SEC HPLC y se incubaron durante un total de 24 horas (descongelamiento + incubación). Las muestras se almacenaron a 2-8 °C hasta el análisis mediante la NUEVA SEC-HPLC. El experimento se repitió en un día diferente - sin muestreo de los tubos después del descongelamiento. Los resultados se muestran en la tabla 8a y 8b.

10

15

**Tabla 8a \*\*Duración de la incubación 24 horas**

Condición **	% Monómero	% Ag	% Dímero	Duración del descongelamiento
Inmediatamente después del descongelamiento a 25 °C	77,48	1,63	20,89	3 horas y 21 minutos
Inmediatamente después del descongelamiento a 27 °C	77,2	1,73	21,07	5 horas
Inmediatamente después del descongelamiento a 29 °C	78,56	1,64	19,8	3 horas y 30 minutos
Inmediatamente condición RT	77,42	1,65	20,92	6 horas

Condición **	% Monómero	% Ag	% Dímero	Duración del descongelamiento
25°C-A	93,42	0,42	6,1	3 horas y 8 min
25°C-B	93,15	0,51	6,3	
27°C-A	96,32	0,54	3,1	5 horas
27°C-B	96,22	0,57	3,2	
29°C-A	97,85	0,53	1,6	3 horas y 30 min
29°C-B	97,58	0,51	1,9	

#### 4. Conclusión:

- 5 Los siguientes puntos pueden establecerse a partir de los experimentos anteriores:
- El aumento de la temperatura y duración de incubación aumenta la eficiencia de la disociación térmica.
  - La duración del descongelamiento disminuye cuando el descongelamiento dentro de la incubadora en comparación con el descongelamiento a temperatura ambiente aumenta el nivel de monómeros.
  - El descongelamiento y la incubación a 25 °C, 27 °C, y 29 °C por hasta 24 horas no tuvo ningún efecto negativo sobre la molécula de r-h IFN beta 1a de conformidad con: Rutina SEC HPLC, Deg/Ox HPLC, HPLC Cuant., ES-MS, bioensayo y GZE.

10

15 Los experimentos anteriores demuestran que se obtienen resultados significativos en cuanto a la disminución de la oligomerización mediante el ajuste de la temperatura de reposo y el tiempo de reposo de un interferón a granel almacenado previamente congelado.

15

Independientemente de cómo se descongele la preparación (por ejemplo, descongelamiento a temperatura ambiente o en una incubadora), el aumento de la temperatura de reposo tiene hasta un cierto punto un resultado beneficioso sobre el nivel de monómeros de interferón. Por tanto, existe una correlación entre la temperatura de reposo y el nivel de monómero de las proteínas; el aumento de la temperatura de reposo, de 25 °C a 29 °C conduce al aumento en el nivel de monómero de las proteínas. Los mejores resultados se obtienen cuando la solución a granel se ajusta a una temperatura de 29 °C. Preferentemente, la solución a granel se coloca en una incubadora a una temperatura de incubación de 29 °C. Al comparar las temperaturas de incubación, se observa un aumento de aproximadamente un 5-6% de monómeros de 25 °C a 29 °C. Preferentemente, la preparación congelada se coloca directamente en una incubadora y no se descongela a temperatura ambiente antes de la incubación (por lo que el descongelamiento ocurre en la incubadora). Los resultados también muestran que la incubación de un interferón a granel descongelado durante 10 horas ya proporciona un porcentaje de monómeros mayor al 95%. Con el descongelamiento a temperatura ambiente, las duraciones de incubación son de 10 o 18,5 horas. Con el descongelamiento en una incubadora, las duraciones de incubación fueron de 16 o 24 horas.

20

25

Del mismo modo, el tiempo de reposo es asimismo un factor que influye la oligomerización. Independientemente de las condiciones de reposo (por ejemplo, descongelamiento a temperatura ambiente seguido por incubación o incubación directamente), existe una correlación entre el tiempo de reposo y el nivel de monómeros; tiempos de reposo mayores aumentan el nivel de monómero de proteínas. Los mejores resultados se obtienen en un tiempo de reposo de 24 horas. Al comparar los tiempos de reposo, se logró aumentar aproximadamente un 3% la cantidad de monómeros al pasar de un tiempo de reposo de 16 horas a 24 horas. Preferentemente, el tiempo de reposo para la preparación congelada es de 24 horas. Más preferentemente, la preparación congelada se coloca directamente en una incubadora (el descongelamiento ocurre en la incubadora) para un tiempo de incubación (tiempo de reposo) de 24 horas.

30

Mediante la combinación de las dos variables (tiempo de reposo y temperatura de reposo), puede alcanzarse un aumento de aproximadamente un 9% de monómeros. Los resultados son incluso más sorprendentes cuando se compara las formulaciones incubadas con las que no lo están. Se obtiene un 77,48% de monómeros si la preparación se analiza directamente después del descongelamiento (sin incubación) mientras que se obtiene un 97,9% de monómeros cuando la preparación congelada se incuba directamente por un tiempo de incubación de 24 horas a una temperatura de incubación de 29°C. Por tanto, se obtiene una diferencia del 20% en el nivel de monómeros mediante la optimización de las dos variables. Preferentemente, el interferón a granel se coloca a una temperatura de 29°C durante un tiempo de reposo de 24 horas. Más preferentemente, el interferón a granel se incuba directamente a 29°C (el descongelamiento ocurre en la incubadora) durante un tiempo de incubación de 24 horas (los mejores resultados proporcionan un 97,9% de monómeros).

40

45

50

En conclusión, el tiempo de reposo y las temperaturas de reposo y preferentemente la temperatura de incubación y el tiempo de incubación son factores importantes que contribuyen de manera significativa con el mantenimiento y/o el aumento de la estabilización de una pre-formulación o formulación de interferón a granel.

1.b Experimentos de disociación térmica a escala de laboratorio a 29 °C con varios ciclos de F/T Este informe evalúa el efecto de la incubación a 29 °C sobre el nivel de dímeros y agregados en la sustancia de fármaco r-h IFN-beta 1a.

1. Procedimiento:

a. El procedimiento de NUEVA SEC se utilizó para analizar las muestras a granel de r-h IFN-beta 1a que se incubaron a 29 °C durante 15 horas o 3 horas después del descongelamiento y que se sometieron a varios ciclos de F/T como se indica en la tabla 9. El R-h IFN-beta 1a a granel se transfirió a siete tubos Corning de 15 ml (0,9ml en cada tubo). Los tubos se congelaron a -70 °C. El volumen de IFN beta 1a (previamente congelado y descongelado) asimismo se transfirió a dos tubos Corning de 250ml (200ml en cada tubo), los tubos se congelaron a -70 °C.

**Tabla 9 - Tratamiento de muestra para el experimento de disociación térmica a escala de laboratorio**

Muestra	Ciclos F/T	Descongelamiento	Almacenamiento antes del análisis mediante SEC-HPLC
1	1	2 horas a temperatura ambiente	Almacenado a 4 °C
2	1	2 horas a temperatura ambiente	a 29° en una incubadora seca durante 15 horas
3	1	en un baño con circulación de agua a 29°C durante 4 min	a 29° en una incubadora seca durante 15 horas
4	4	2 horas a temperatura ambiente	Almacenado a 4 °C
5	4	2 horas a temperatura ambiente	a 29° en una incubadora seca durante 15 horas
6	4	2 horas a temperatura ambiente	a 29° en una incubadora seca durante 3 horas
7	4	en un baño con circulación de agua a 29°C durante 4 min	a 29° en una incubadora seca durante 15 horas
8 (tubo de 250ml)	2	7 horas a temperatura ambiente	a 29° en una incubadora seca durante 15 horas
9 (tubo de 250ml)	2	7 horas a temperatura ambiente	almacenado a 4 °C

b. Para evaluar el efecto de la incubación del volumen de IFN beta 1a sobre la molécula, el volumen incubado (después de 1 F/T) se probó mediante los siguientes procedimientos: Deg/Ox-HPLC, IEF, ES-MS, HPLC Cuant., CZE.

c. Asimismo, se realizó la cinética de la disociación térmica a escala de laboratorio F/TX1. Después del F/TX1 se colocaron alícuotas del volumen de r-h IFN beta 1a en el tubo de 250 ml, en un tubo de 15 ml y se incubaron a 29 °C en una incubadora.

2. Resultados:

1) La incubación del volumen de r-h IFN-beta 1a (1 F/T) después del descongelamiento a temperatura ambiente aumentó el nivel de monómeros de un 82,8% a un 97,57% y disminuyó el nivel de agregados de un 0,7% a un 0,2% (ver la tabla 10). La incubación a 29°C (incubadora) durante 15 horas es eficaz para la disociación de dímeros.

2) La incubación del volumen de r-h IFN-beta 1a después del descongelamiento en un baño aumentó el nivel de monómeros de un 82,8% a un 96,7% pero aumentó el nivel de agregados de un 0,7% a un 1,97% (ver la tabla 10).

Tabla 10 - Resultados de SEC-HPLC de las muestras a granel de 0,9 ml después de 1 F/T

	AG	DÍMEROS	MONÓMEROS
Nombre de la muestra	% AREA	% AREA	% AREA
F/TX1 descongelada a RT 2 hrs. Almacenada a 4°C – control	0,72	17,01	82,27
	0,69	15,88	83,43
PROMEDIO	0,70	16,4	82,85
F/TX1 descongelada a TA 2 hrs. Incubada a 29°C - durante 15 hrs.	0,23	2,3	97,47
	0,19	2,14	97,67
PROMEDIO	0,21	2,22	97,57
F/TX1 descongelada en un baño (29°C, 4 min.), incubada a 29°C - durante 15 hrs.	1,97	1,43	96,6
	1,97	1,18	96,85
PROMEDIO	1,97	1,30	96,72

- 5 3) La incubación del volumen de r-h IFN-beta 1a (4 F/T) durante 3 horas después del descongelamiento a temperatura ambiente aumentó el nivel de monómeros de un 82,3% a un 89,5% debido a la disminución en el nivel de dímeros (ver la tabla 11 y la figura 2).
- 4) La incubación del volumen de r-h IFN-beta 1a durante 15 horas (4 F/T) después del descongelamiento a temperatura ambiente aumentó incluso más el nivel de monómeros (en comparación con las 3 horas de incubación) de un 82,3% a un 93,7% debido a la disminución en el nivel de dímeros (ver la tabla 11 y la figura 2).
- 10 5) La incubación del volumen de r-h IFN-beta 1a después del descongelamiento en un baño aumentó el nivel de monómeros de un 82,3% a un 94,7% debido a la disminución en el nivel de dímeros (ver la tabla 11 y la figura 2).

Tabla 11 - Resultados de SEC-HPLC de las muestras a granel de 0,9 ml después de 4 F/T

15

	AG	DÍMEROS	MONÓMEROS
Nombre de la muestra	% ÁREA	% ÁREA	% ÁREA
F/TX4 descongelada a RT 2 hrs. Almacenada a 4°C - Control	2,89	14,16	82,95
	3,03	15,26	81,97
PROMEDIO	2,96	14,71	82,33
F/TX4 descongelada a RT 2 hrs. Incubada a 29°C - 3 horas.	2,98	7,66	89,36
	2,92	7,42	89,66
PROMEDIO	2,95	7,54	89,51
F/TX4 descongelada a RT 2 hrs. Incubada a 29°C - 15 hrs.	2,97	3,45	93,58
	2,91	3,27	93,82
PROMEDIO	2,94	3,36	93,7
F/TX4 descongelada en un baño. Incubada a 29°C - 15 hrs.	2,89	2,38	94,73
	2,83	2,31	94,86
PROMEDIO	2,86	2,34	94,79

- 6) La incubación de una muestra a granel de r-h IFN-beta 1a de 200ml después del descongelamiento a temperatura ambiente aumentó el nivel de monómeros de un 73% a un 91,2% y disminuyó el nivel de agregados de un 3,9% a un 2,9% (ver la tabla 12 y la figura 3).

20

**Tabla 12 - Resultados de SEC-HPLC de las muestras a granel de 200ml después de 2 F/T**

	AG	DÍMEROS	MONÓMEROS
Nombre de la muestra	% ÁREA	% ÁREA	% ÁREA
200 ml descongelada a RT 7 hrs. almacenada a 4 °C control	4,06	23,3	72,64
	3,85	22,71	73,44
PROMEDIO	3,9	23	73,04
200ml descongelada a RT 7 hrs. Incubada a 29°C 15 horas	2,98	5,65	91,37
	2,95	6,05	91
PROMEDIO	2,9	5,8	91,18

- 5 7) Las muestras a granel incubadas de r-h IFN-beta 1a (0,9 ml, 1 F/T) se analizaron mediante las siguientes pruebas junto con la muestra de control descongelada a temperatura ambiente y almacenada a 4°C (ver la tabla 13): Deg/Ox-HPLC - no se observó ningún aumento en el nivel de oxidación en las muestras incubadas en comparación con la muestra de control (almacenada a 4 °C).  
ES-MS - no se observó diferencia en el nivel de carbohidratos en las muestras incubadas en comparación con la muestra de control.  
10 HPLC Cuant. - no se observaron diferencias significativas en la concentración.  
CZE - Se obtuvieron perfiles de electroferograma idénticos.  
IEF - La muestra a granel de r-h IFN-beta 1a F que se descongeló en un baño de agua circulante mostró una banda adicional de aproximadamente pI -7.  
15 La muestra de control y la muestra descongelada a temperatura ambiente e incubada durante 15 horas se ajustaron a las especificaciones.

**Tabla 13 - EFECTO DE LA DISOCIACIÓN TÉRMICA SOBRE EL IFN**

Muestra	Deg-OX	ES-MS				IEF			Q HPLC	CZE
	%	SIN	MONO	DI	TRI	8,9-9	8,5	7,9-8,0	µg/ml	
F/TX11 Descong. RT, 4C	99,3	1	15	72	12	19	58	23	334	conf.
F/TX11 Descong. RT, 29C 15 hr	99,4	1	15	71	12	20	55	24	338	conf.
F/TX11 Descong. 29C, 29C, 15 hr	99,4	2	16	70	12	15	56	28	363	conf.

- 20 Permanecer 15 horas después del descongelamiento a temperatura ambiente no afecta los parámetros de la molécula de IFN-beta-1a como se determina mediante Deg/ox HPLC, ES-MS, HPLC Cuant. CZE e IEF.

8) Los resultados de la disociación térmica a F/TX1 se muestran en la tabla 14 y en las figuras 4 a 6.

25 **Tabla 14 - Cinética de la disociación térmica a escala de laboratorio F/TX1**

Tiempo h	Monómero	Dímero	Agregado
0	73,4	24,7	1,94
3	90,04	8,54	1,42
6	94,13	7,7	1,19
9	95,09	3,79	1,12
12	95,92	3,09	0,99
15	95,56	2,54	0,97
24	97,2	1,9	0,87

3. Conclusiones:

- 1) La incubación de muestras de r-h IFN-beta 1a a 29°C durante 15 horas después del descongelamiento a temperatura ambiente disminuyó de manera significativa el nivel de oligomerización (principalmente dímeros).
- 2) La incubación de muestras de r-h IFN beta 1a a 29 °C durante 15 horas después del descongelamiento a 29 °C en un baño disminuyó de manera significativa el nivel de oligomerización.
- 3) En base a los procedimientos analíticos utilizados, la incubación del r-h IFN beta 1a durante 15 horas a 29°C a granel después del descongelamiento a temperatura ambiente no tuvo un efecto negativo sobre los parámetros de la molécula de IFN beta 1a como se determina en Deg/ox HPLC, ES-MS, HPLC Cuant. CZE e IEF. Eficaz en la disociación de oligómeros no covalentes, aunque no todos los oligómeros no covalentes se disocian (un 4% de los oligómeros no covalentes no se disocian en los tubos de 250ml) el % de monómeros en los tubos de 250 ml alcanzó el 94% (9 horas de incubación a 29 °C) y el 97,7% en los tubos pequeños (15 horas de incubación a 29 °C). Se alcanzó el equilibrio de oligómeros inmediatamente después de la disociación térmica (ver las tablas y las figuras). La disociación térmica a 29 °C en los tubos de 15ml se completó después de 15 horas. En resumen, los presentes experimentos (1a y 1b) demuestran que la disociación térmica, que consiste en una temperatura y duración específica (es decir, la temperatura de reposo y el tiempo de reposo o el tiempo de incubación y la temperatura de incubación), es crucial para el mantenimiento y/o aumento de la estabilidad de una proteína (monomérica) o de una formulación que contiene la proteína (monomérica). La cinética de la disociación térmica para el interferón beta mostró además que la disociación térmica en un ciclo de F/T proporcionó un 90% de monómeros después de solamente 3 horas, se encontraba casi completa después de 6 horas y finalmente alcanzó una "meseta" a las 15 horas. Preferentemente, la disociación térmica se realizó durante al menos 3 horas. Más preferentemente, la duración (tiempo de reposo o tiempo de incubación) de la disociación térmica para el interferón beta se ajustó en el intervalo de 6 horas a 40 horas. Incluso más preferentemente, la duración de la disociación térmica para el interferón beta se ajustó en el intervalo de 15 horas a 30 horas, o durante 10 horas, 16 horas, 18,5 horas o 24 horas. Incluso más preferentemente, la duración de la disociación térmica para el interferón beta fue de 24 horas. La incubación o temperatura de reposo se ajustó preferentemente en el intervalo de 27 °C a 31 °C. Más preferentemente, la temperatura se ajustó a 29°C. A pesar de que los resultados de la cinética de la disociación térmica se realizaron después de 1 F/T, el entendido en la técnica, mediante el uso de técnicas convencionales, podrá determinar fácilmente la cinética de la disociación térmica después de muchos ciclos de F/T (por ejemplo, 2 F/T, 4 F/T o 11 F/T; o después de cualquier otro tipo de tensión) o incluso para la totalidad del proceso de fabricación o cualquiera de sus partes de cualquier interferón beta (por ejemplo el r-h interferón beta 1a) o de cualquier proteína monomérica. Como tal, la presente invención no debería limitarse a un tiempo o duración de incubación particular (o tiempo de reposo). Del mismo modo, el entendido en la técnica, mediante el uso de técnicas convencionales, podrá determinar fácilmente la temperatura de incubación más adecuada (o temperatura de reposo) después de uno o más ciclos de F/T (o después de cualquier otro tipo de tensión) o incluso para la totalidad del proceso de fabricación o cualquiera de sus partes de cualquier interferón beta (por ejemplo el r-h interferón beta 1a) o de cualquier proteína monomérica. Como tal, la presente invención no debería limitarse a una temperatura de incubación (o temperatura de reposo) particular.

Ejemplo 2: Estabilización de interferón beta mediante la adición de un excipiente al interferón a granel

Estos experimentos se realizaron para verificar el efecto protector que exhiben algunos excipientes como los aminoácidos, los agentes bacteriostáticos, los tensioactivos y los agentes de isotonicidad sobre un r-h IFN beta 1a a granel en términos de oligomerización y agregación. Los estudios que se describen a continuación se llevaron a cabo sin la adición de albúmina de suero humana (HSA) a las pre-formulaciones a granel de r-h IFN-beta 1a.

1.0 GLOSARIO/ ABREVIATURAS

45	<b>Ag</b>	agregados
	<b>COA</b>	certificado de análisis
	<b>Dim</b>	dímeros
	<b>Deg</b>	degradantes
	<b>FDF</b>	forma de dosificación final
50	<b>F/T</b>	congelamiento y descongelamiento
	<b>r-h IFN-beta 1a</b>	interferón beta recombinante humano 1a (r-h IFN beta 1a) de células CHO.
	<b>r-h IFNA-beta FDF</b>	forma de dosificación final de r-h INF-beta 1a (r-h INF-beta FDF)
	<b>SE-HPLC</b>	cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaños
	<b>SAB</b>	acetato sódico 50 mM, pH-3.8
55	<b>Temp.</b>	Temperatura

2.0 INTRODUCCIÓN

El estudio se enfocó en la minimización de la oligomerización del r-h IFN-beta 1a durante las etapas de fabricación desde la fracción de SEC-EL al almacenamiento de la FDF para proporcionar un interferón beta a granel estable.

La minimización de la oligomerización generada por las tensiones (por ejemplo, F/T) se realizó mediante:

1. La pre-formulación del volumen con excipientes y/u otros agentes estabilizadores y sin HSA.
2. La evaluación del efecto de las temperaturas de almacenamiento (-20°C, -70°C & 2-8°C) sobre la oligomerización en el volumen pre-formulado.

Las muestras a granel pre-formuladas se analizaron mediante el uso de SE-HPLC.

65

3.0 OBJETIVO/ ALCANCE

Minimizar la oligomerización del r-h IFN beta 1a durante el procesamiento a granel.

4.0 EQUIPOS Y MATERIALES

4.1 **EQUIPOS**

Unidad de filtro de 0,2 μ P/N MPGL025 Millipore  
 Jeringa Millex dirigida por filtro de 0,2μ - P/N SLGV025LS Millipore  
 Tubos de centrifugación cónicos de 250ml - Corning  
 Criotubos de 1,8ml – Nunc

4.2 **MATERIALES**

- a. Fracción SEC el2
- b. D-Manitol DAB, F Eur, BP, USP, FCC, E421 (código 1.05980, Merck)
- c. Ácido acético glacial al 100% (código 1.00063, Merck)
- d. Hidróxido de sodio 10 M
- e. Poloxamer 188 (Lutrol F 68 DAC, USP/NF, Basf), 5163315
- f. L-Metionina (1.05707, Merck)
- g. Alcohol bencílico Ph Eur, BP, NF (código 1.00987, Merck)
- h. Monoclorhidrato de L-Arginina (código 1.01544, Merck)
- i. Tween™ 20 Ph Eur, NF (código 8.17072, Merck)
- j. Lisina (código 1.05701, Merck)
- k. r-h IFN beta 1a 0,48-0,5 mg/ml o 0,088 mg/ml
- l. Solución amortiguadora de acetato pH 3,8, 50 mM o 10 mM

ESTABILIZADORES:

**Aminoácidos:**

- 1. Arginina 31,6 mg/ml
- 2. Lisina 27,4 mg/ml
- 3. Metionina 0,12 mg/ml (Antioxidante)

**Tensioactivos:**

- 1. Tween 20 0,05 mg/ml
- 2. Poloxamer 188 (ácido plurónico) 0,5 mg/ml

**Agente bacteriostático:**

- 1. Alcohol bencílico 5 mg/ml

**Agente de isotonicidad:**

- 1. Manitol 54,6 mg/ml

5.0 PROCEDIMIENTO

El estudio se llevó a cabo en fracciones de SEC-EL2.

El esquema del estudio se muestra en la figura 7.

Las diferentes condiciones de pre-formulación se muestran en las tablas 15 y 16.

**Tabla 15 - Esquema experimental**

			4C	-20C	-20C	-70C	-70C
Estabilizador	Tensioactivo	Antioxidante	tubo de 2ml	tubo de 250ml	tubo de 2 ml	tubo de 250ml	tubo de 2 ml
+	-	-	+	+	+	+	+
+	-	L-Metionina	+	-	+	-	+
+	Tween 20	L-Metionina	+	-	+	-	+
+	Poloxamer 188	L-Metionina	+		+	-	+
-	-	-	+	+	+	+	+

Estabilizador: Alcohol bencílico/L-arginina/Manitol/Lisina

Tabla 16 - Condiciones de pre-formulación probadas

Cond.	Acetato pH	Alcohol bencílico mg/ml	L-Arg HCl mg/ml	Manitol mg/ml	Lisina mg/ml	Poloxamer 188 mg/ml	Tween 20 mg/ml	L-Met mg/ml	N° de tubos
1	50 mM pH- 3,8	5	-	-	-	-	-	-	4x250ml 6x2ml
2		5	-	-	-	-	-	0,12	6x2ml
3		5	-	-	-	-	0,5	0,12	6x2ml
4		5	-	-	-	0,5	-	0,12	6x2ml
5		-	31,6	-	-	-	-	-	4x250ml 6x2ml
6		-	31,6	-	-	-	-	0,12	6x2ml
7		-	31,6	-	-	-	0,5	0,12	6x2ml
8		-	31,6	-	-	0,5	-	0,12	6x2ml
9		-	-	54,6	-	-	-	-	4x250ml 6x2ml
10		-	-	54,6	-	-	-	0,12	6x2ml
11		-	-	54,6	-	-	0,5	0,12	6x2ml
12		-	-	54,6	-	0,5	-	0,12	6x2ml
13 Control	-	-	-	-	-	-	-	-	2x250ml 6x2ml
14 Control	10mM pH-3,8	-	-	-	-	-	-	-	6x2ml
15	50mM pH-3,8	-	-	-	24,7	-	-	-	4x250ml 6x2ml
16		-	-	-	24,7	-	-	0,12	6x2ml
17		-	-	-	24,7	-	0,05	0,12	6x2ml
18		-	-	-	24,7	0,5	-	0,12	6x2ml

## 6.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

5

## 6.1.1 Preparación de 1 litro de acetato sódico 50 mM, pH-3,8 (SAB)

Se agregaron 3,003 g de ácido acético glacial a 1000 ml de WFI y se mezcló durante 5 minutos.

10 Se agregaron aproximadamente 0,56 ml de hidróxido de sodio 10M para ajustar el pH a 3,8, la solución se mezcló durante 5 minutos, se muestreó para verificar la conductividad y se filtró en un filtro de 0,2µ. El Poloxamer 188 (o F-68 plurónico) se incluyó en la pre-formulación a un nivel de un 0,1% (concentración micelar crítica) para prevenir la adsorción de la sustancia del fármaco por la superficie de los recipientes durante el proceso de fabricación; las concentraciones más altas pueden afectar de forma negativa la estabilidad del producto (oxidación superior); las concentraciones más bajas pueden ser menos eficaces en la limitación de la adsorción.

## 15 6.1.2 Se preparó un litro de las siguientes soluciones:

1. Acetato 50 mM pH-3,8, 10 mg/ml de alcohol bencílico.

Como en 6.1.1 con la adición de 10 g de alcohol bencílico antes de agregar hidróxido de sodio.

2. Acetato 50 mM, pH-3,8, 5 mg/ml de alcohol bencílico.

20 Como en 6.1.1 con la adición de 5 g de alcohol bencílico antes de agregar hidróxido de sodio.

3. Acetato 50 mM, pH-3,8, 63,2 mg/ml de arginina.

Como en 6.1.1 con la adición de 63,2 g de arginina antes de agregar hidróxido de sodio.

4. Acetato 50 mM, pH-3,8, 31,6 mg/ml de arginina.

Como en 6.1.1 con la adición de 31,6 g de arginina antes de agregar hidróxido de sodio.

25 5. Acetato 50 mM, pH-3,8, 54,8 mg/ml de lisina.

Como en 6.1.1 con la adición de 54,8 g de lisina antes de agregar hidróxido de sodio.



6. Acetato 50 mM, pH-3,8, 27,4 mg/ml de lisina.  
Como en 6.1.1 con la adición de 27,4 mg/l de lisina antes de agregar hidróxido de sodio.
7. Acetato 50 mM, pH-3,8, manitol 600 Mm  
Se agregaron 3,003 g de ácido acético glacial a 0,926 kg de WFI y la solución se mezcló durante 5 minutos. Se agregaron 100,3 g de manitol a la solución y esta se mezcló durante 5 minutos. Se agregaron aproximadamente 0,56 ml de hidróxido de sodio 10M para ajustar el pH a 3,8, la solución se mezcló durante 5 minutos, se muestreó para verificar la conductividad y se filtró en una membrana de 0,2µ.
8. Acetato 50 mM, pH-3,8, manitol 300 mM  
Se agregaron 3,003 g de ácido acético glacial a 0,966 kg de WFI y se mezcló durante 5 minutos. Se agregaron 55,1 g de manitol y se mezcló durante 5 minutos. Se agregaron aproximadamente 0,56 ml de hidróxido de sodio 10M para ajustar el pH a 3,8, la solución se mezcló durante 5 minutos, se muestreó para verificar la conductividad y se filtró en un filtro de 2µ.
- 6.1.3 Se preparó un litro de las siguientes soluciones:
1. Acetato 50 mM, pH-3,8, 5 mg/ml de alcohol bencílico, 12 mg/ml de Metionina  
Como en 6.1.2 con la adición de 12 g de metionina.
2. Acetato 50 mM, pH-3,8, 5 mg/ml de alcohol bencílico, 12 mg/ml de metionina, 50 mg/ml de Poloxamer 188  
Como en 6.1.2 con la adición de 12 g de metionina y 50 g de Poloxamer 188.
3. Acetato 50 mM, pH-3,8, 5 mg/ml de alcohol bencílico, 12 mg/ml de metionina, 5 mg/ml de Tween 20  
Como en 6.1.2 con la adición de 12 g de metionina y 5 g de TWEEN 20.
4. Acetato 50 mM, pH-3,8, 31,6 mg/ml de arginina, 12 mg/ml de metionina  
Como en 6.1.2 con la adición de 12 g de metionina.
5. Acetato 50 mM, pH-3,8, 31,6 mg/ml de arginina, 12 mg/ml de metionina, 50 mg/ml de Poloxamer 188  
Como en 6.1.2 con la adición de 12 g de metionina y 50 g de Poloxamer 188.
6. Acetato 50 mM, pH-3,8, 31,6 mg/ml de arginina, 12 mg/ml de metionina, 5 mg/ml de Tween 20  
Como en 6.1.2 con la adición de 12 g de metionina y 5 g de Tween 20.
7. Acetato 50 mM, pH-3,8, manitol 300 mM 12 mg/ml de metionina  
Como en 6.1.2 con la adición de 12 g de metionina.
8. Acetato 50 mM, pH-3,8, manitol 300 mM, 12 mg/ml de metionina, 5 mg/ml de Poloxamer 188  
Como en 6.1.2 con la adición de 12 g de metionina y 5 g de Poloxamer 188.
9. Acetato 50 mM, pH-3,8, manitol 300 mM, 12 mg/ml de metionina, 5 mg/ml de Tween 20  
Como en 6.1.2 con la adición de 12 g de metionina y 5 g de Tween 20.
10. Acetato 50 mM, pH-3,8, 27,4 mg/ml de lisina, 12 mg/ml de metionina  
Como en 6.1.2 con la adición de 12 g de metionina.
11. Acetato 50 mM, pH-3,8, 27,4 mg/ml de lisina, 12 mg/ml de metionina, 5 mg/ml de Poloxamer 188  
Como en 6.1.2 con la adición de 12 g de metionina y 5 g de Poloxamer 188.
12. Acetato 50 mM, pH-3,8, 27,4 mg/ml de lisina, 12 mg/ml de metionina, 5 mg/ml de Tween 20  
Como en 6.1.2 con la adición de 12 g de metionina y 5 g de Tween 20.
- 6.2 PRE-FORMULACIÓN A GRANDEL  
El esquema de la preparación y composición a granel se muestra en la figura 7 y en la tabla 15.
- 1ª etapa**
- 6.2.1 Se diluyeron 1:1 p/p 197 g de SEC-EL con SAB, 10 mg/ml de alcohol bencílico.
- 6.2.2 Se diluyeron 1:1 p/p 197 g de SEC-EL con SAB, 63,2 mg/ml de arginina.
- 6.2.3 Se diluyeron 1:1 p/p 197 g de SEC-EL con SAB, 600 mM de manitol.
- 6.2.4 Se diluyeron 1:1 p/p 197 g de SEC-EL con SAB, 54,8 mg/ml de lisina.
- 6.2.5 Se diluyeron 92gr. de SEC-EL con 208 g de SAB para preparar una solución que contenía 0,5 mg/ml de r-h IFN beta 1a. Después de la filtración las soluciones se dividieron en dos tubos de 250ml que contenían 130gr. del volumen) y seis tubos de 2ml (que contenían 0,5ml del volumen).  
Un tubo de 250ml y dos tubos de 2ml se congelaron y se almacenaron a -70 °C.  
Un tubo de 250 ml y dos tubos de 2 ml se congelaron a -70 °C. y a continuación se transfirieron a un segundo congelador para el almacenamiento a -20 °C. Dos tubos de 2 ml se almacenaron a 2-8 °C.
- El SEC-EL se diluyó con agua para preparar 6 ml de una solución que contenía 0,088 mg/ml r-h IFN beta 1a en acetato 10 mM, pH-3,8.
- 2ª etapa**
- Las siguientes soluciones se prepararon a una concentración de 0,5 mg/ml de r-h IFN beta 1a.
- 6.2.6 La solución preparada en 6.2.1 se diluyó con SAB, 5 mg/ml de alcohol bencílico.
- 6.2.7 La solución preparada en 6.2.2 se diluyó con SAB, 31,6 mg/ml de arginina.
- 6.2.8 La solución preparada en 6.2.3 se diluyó con SAB, manitol 300 mM.
- 6.2.9 La solución preparada en 6.2.4 se diluyó con SAB, 27,4 mg/ml de lisina.

6.2.10 Después de la filtración estas 4 soluciones (6.2.6 a 6.2.9) se dividieron en cuatro tubos de 250ml (que contenían 130 g del volumen) y seis tubos de 2ml (que contenían 2ml del volumen). Total - catorce tubos de 250ml y dieciocho tubos de 2ml. El volumen restante de estas tres soluciones se procesó de forma adicional (tercera etapa).

6.2.11 Dos tubos de 250ml y dos tubos de 2ml de cada solución se congelaron y almacenaron a -70°C.

5 Dos tubos de 250ml y dos tubos de 2ml de cada solución se congelaron a -70°C y a continuación se transfirieron a un segundo congelador para el almacenamiento a -20 °C. Dos tubos de 2ml de cada solución se almacenaron a 2-8°C.

### 3ª etapa (dilución 1:100)

10 6.2.12 Se diluyeron 29,7ml de la solución preparada en 6.2.6 con 0,3 ml de SAB, 5 mg/ml de alcohol bencílico, 12mg/ml de metionina.

6.2.13 Se diluyeron 29,7ml de la solución preparada en 6.2.6 con 0,3 ml de SAB, 5 mg/ml de alcohol bencílico, 12mg/ml de metionina, 50 mg/ml de plurónico.

15 6.2.14 Se diluyeron 29,7ml de la solución preparada en 6.2.6 con 0,3 ml de SAB, 5 mg/ml de alcohol bencílico, 12 mg/ml de metionina, 5 mg/ml de Tween 20.

6.2.15 Se diluyeron 29,7 ml de la solución preparada en 6.2.7 con 0,3 ml de SAB, 31,6 mg/ml de arginina, 12 mg/ml de metionina.

20 6.2.16 Se diluyeron 29,7 ml de la solución preparada en 6.2.7 con 0,3 ml de SAB, 31,6 mg/ml de arginina, 12 mg/ml de metionina, 50 mg/ml de plurónico.

6.2.17 Se diluyeron 29,7 ml de la solución preparada en 6.2.7 con 0,3 ml de SAB, 31,6 mg/ml de arginina, 12 mg/ml de metionina, 5 mg/ml de Tween 20.

6.2.18 Se diluyeron 29,7 ml de la solución preparada en 6.2.8 con 0,3 ml de SAB, manitol 300 mM, 12 mg/ml de metionina.

25 6.2.19 Se diluyeron 29,7 ml de la solución preparada en 6.2.8 con 0,3 ml de SAB, manitol 300 mM, 12 mg/ml de metionina, 50 mg/ml de plurónico.

6.2.20 Se diluyeron 29,7 ml de la solución preparada en 6.2.8 con 0,3 ml de SAB, manitol 300 mM, 12 mg/ml de metionina, 5 mg/ml de Tween 20.

30 6.2.21 Se diluyeron 29,7 ml de la solución preparada en 6.2.9 con 0,3 ml de SAB, 27,4 mg/ml de lisina, 12 mg/ml de metionina.

6.2.22 Se diluyeron 29,7 ml de la solución preparada en 6.2.9 con 0,3 ml de SAB, 27,4 mg/ml de lisina, 12 mg/ml de metionina, 50 mg/ml de plurónico.

6.2.23 Se diluyeron 29,7 ml de la solución preparada en 6.2.9 con 0,3 ml de SAB, 27,4 mg/ml de lisina, 12 mg/ml de metionina, 5 mg/ml de Tween 20.

35 6.2.24 Todas las soluciones (6.2.12 a 6.2.23) se filtraron de forma separada en una jeringa Millex conducida por un filtro de 0,2µ.

6.2.25 Las soluciones se dividieron en tubos de 2ml (al menos 6 tubos para cada solución).

40 6.2.26 Dos tubos de 2 ml de cada solución se congelaron y almacenaron a -70 °C. Dos tubos de 2 ml de cada solución se congelaron a -70 °C. y a continuación se transfirieron a un segundo congelador para el almacenamiento a -20 °C.

Dos tubos de 2 ml de cada solución se almacenaron a 2-8 °C.

### 6.3 ANÁLISIS A GRANUL

45 Se analizó un tubo de 2ml almacenado a 2-8°C, -70°C y -20°C de cada condición de pre-formulación mediante SE-HPLC después del descongelamiento a temperatura ambiente durante 2 horas. Las muestras almacenadas a -20°C se volvieron a transferir a -70°C durante 4 horas antes del descongelamiento. Los resultados se muestran en la tabla 17. Se analizó un tubo de 250ml almacenado a -70°C de las condiciones 1, 5, 9, 13 y 15 (ver la tabla 1) mediante SE-HPLC después del descongelamiento a temperatura ambiente durante 6 horas. Los resultados se muestran en la tabla 18.

50 Asimismo, los estudios de disociación térmica se realizaron con las muestras en los tubos de 15 ml después de 1 ciclo de F/T a una temperatura de incubación de 29 °C durante 8 horas (muestras de 1ml de los tubos de 250ml después de un ciclo de F/T) y se analizaron mediante SE-HPLC (ver los resultados de la tabla 19).

### 7.0 RESULTADOS

55

Tabla 17 - Resultados de pre-formulación para los tubos Nunc (0,5ml) almacenados a -70°C, -20°C y 2-8°C.

CONDICIÓN	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO					
	2-8°C *		-20°C **		-70°C	
	%MONO	%AGG	%MONO	%AGG	%MONO	%AGG
1 BA	98,8	1,1	97,3	0,83	97,8	0,89
2 BA, MET	99	0,94	97,7	0,84	98,1	0,78
3 BA, MET, TW	98,7	0,14	98,9	0,85	99,1	0,84
4 BA, MET, POL	98,9	1	97,3	0,93	98,1	0,71
5 ARG	99,1	0,53	83,4	7,1	98,9	0,58
6 ARG, MET	98,9	0,52	84,6	5,1	98,8	0,66
7 ARG, MET, TW	98,6	0,8	97,5	2,5	99	0,49
8 ARG, MET, POL	98,9	0,7	76,6	12,1	98,9	0,43
9 MAN	99,9	0,05	81,2	1,3	97,8	0
10 MAN, MET	100	0	83,5	0,97	98,2	0
11 MAN, MET, TW	100	0	98,1	0,26	99,9	0
12 MAN, MET, POL	100	0	83,3	1,1	87,5	0,68
13 50mM acetato CONTROL	100	0	80,9	2,7	84	0,75
14 10mM acetato	100	0	89	0	92,4	0,82
15 LYS	99,6	0	97,4	0	99,6	0,08
16 LYS, MET	99,4	0	99,4	0	99,4	0,03
17 LYS, MET, TW	99,1	0,18	99,4	0,23	99,6	0,13
18 LYS, MET, POL	99,5	0,24	86,7	2,3	96,7	0,59
SOLO TWEEN 20	-	-	-	-	99,8	0,13

\*Almacenados a 2-8°C durante 3 semanas \*\* Congelados a -70°C., almacenados a -20°C durante 16 días y transferidos nuevamente a -70°C durante 4 horas. **Los resultados son el promedio de las repeticiones.**

La solución amortiguadora a granel contenía acetato sódico 50 mM, pH-3,8 + excipientes en diferentes combinaciones (BA - alcohol bencílico, MET - Metionina, MAN - Manitol, TW - Tween 20, POL -Poloxámero)

Tabla 18 - Resultados de pre-formulación para los tubos de 250 ml almacenados a -70°C con (+INC) o sin incubación a 29°C durante 8 horas

Cond.	Alcohol bencílico	L-Arg HCl	Manitol	Lisina	Poloxamer 188	Tween 20	L-Met	% Mono	% Ag	% Dim
1-nunc	-	-	-	-	-	-	-	96,2	1,1	2,7
1-(tubo de 250ml)	-	-	-	-	-	-	-	95,2	1,2	3,5
1-(tubo de 250ml)+INC	-	-	-	-	-	-	-	97,6	1,08	1,3
5-nunc	-	-	-	-	-	-	-	98,2	0,81	1
5-(tubo de 250ml)	-	-	-	-	-	-	-	98,5	0,41	1,1
5-(tubo de 250ml)+INC	-	-	-	-	-	-	-	99,46	0,58	0
9-nunc	-	-	-	-	-	-	-	97,4	0	2,6
9-(tubo de 250ml)	-	-	-	-	-	-	-	78,1	0,52	21,4
9-(tubo de 250ml)+INC	-	-	-	-	-	-	-	95,1	0	4,9
13-nunc control	-	-	-	-	-	-	-	82,1	1,2	16,6
13 control (tubo de 250ml)	-	-	-	-	-	-	-	73,2	2,2	24,5
13 control (tubo de 250ml)+INC	-	-	-	-	-	-	-	95,1	1,12	3,8
15-nunc	-	-	-	-	-	-	-	99,6	0,02	0,42
15-(tubo de 250ml)	-	-	-	-	-	-	-	99,4	0,03	0,61
15-(tubo de 250ml)+INC	-	-	-	-	-	-	-	99,9	0,11	0
Tween 20 Nunc	-	-	-	-	-	-	-	98,1	0	1,84
Tween 20 Nunc + INC	-	-	-	-	-	-	-	99,8	0,04	0,13

Los resultados son el promedio de las repeticiones.

**Tabla 19 - Disociación térmica en tubos de 15 ml después de un ciclo de F/T**

Aditivo	Condición	Monómero	Dímero	agregado
Alcohol bencílico	Previo a la incubación	94,76	4,08	1,17
	Después de 8 hrs. 29C	97,58	1,34	1,08
Arginina	Previo a la incubación	98,02	1,42	0,53
	Después de 8 hrs. 29C	99,46	0	0,58
Manitol	Previo a la incubación	78,29	21,72	0
	Después de 8 hrs. 29C	95,08	4,93	0
Lisina	Previo a la incubación	99,3	0,62	0,09
	Después de 8 hrs. 29C	99,89	0	0,11
Tween 20	Previo a la incubación	98,15	1,84	0
	Después de 8 hrs. 29C	99,82	0,13	0,04
Control	Previo a la incubación	73,4	24,67	1,93
	Después de 8 hrs. 29C	95,09	3,79	1,12

8.0 OBSERVACIONES

5 La adición de excipientes al r-h interferón beta 1a a granel disminuye de forma constante el porcentaje de dímeros y agregados (lo que aumenta de forma constante el porcentaje de monómeros). La comparación de los efectos de la disociación térmica y de los excipientes seleccionados sobre el r-h interferón beta muestra que puede alcanzarse un nivel de monómeros levemente mayor (nivel menor de dímeros y agregados) mediante la adición de excipientes. 10 Asimismo, las pre-formulaciones estabilizadas por excipientes muestran aún mayores niveles de monómeros cuando se someten además a disociación térmica (por ejemplo, incubación a 29°C).

1. **Tubos de 2 ml**

- A 4 °C.

15 Se obtuvieron pequeñas diferencias en el % de monómeros en las varias condiciones (delta máximo 1,3%) y las muestras que contenían manitol presentaron el nivel más alto de monómeros (100%).

- A -70 °C.

La combinación Manitol + TWEEN 20 + metionina es ligeramente mejor que la lisina. Todos los estabilizadores en varias combinaciones pueden proporcionar un % de monómeros ≥ 99.

- A -70 °C y almacenamiento a -20 °C

20 El % más alto de monómeros se obtuvo con la combinación de lisina + Tween 20 + metionina.

2. **Tubos de 250 ml**

- A -70 °C.

25 Existe una clara desventaja de la lisina en la disminución del nivel de oligomerización comparado con los otros excipientes probados.

Ejemplo 3: Estabilización de interferón beta mediante la adición de un excipiente al interferón a granel analizado por ultracentrifugación de velocidad, SEC y Deg/Ox HPLC

30 1.0 GLOSARIO/ ABREVIATURAS

<b>Ag</b>	agregados
<b>Dim</b>	dímeros
<b>Deg</b>	degradantes
<b>FDF</b>	forma de dosificación final
<b>F/T</b>	congelamiento y descongelamiento
<b>r-h IFN-beta 1a</b>	interferón beta recombinante humano 1a (r-h IFN beta 1a) de células CHO.
<b>r-h IFNA-beta FDF</b>	forma de dosificación final de r-h INF-beta 1a (r-h INF-beta FDF)
<b>SE-HPLC</b>	cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaños
<b>SAB</b>	acetato sódico 50 mM, pH-3.8
<b>Temp.</b>	Temperatura

40 2.0 INTRODUCCIÓN

El estudio se enfocó en la minimización de la oligomerización del r-h IFN-beta 1a durante las etapas de fabricación desde la fracción de SEC-EL al almacenamiento de la FDF para proporcionar un interferón beta a granel estable. La minimización de la oligomerización se hizo mediante:

1. La pre-formulación del volumen con excipientes y/u otros agentes estabilizadores antes de antes del congelamiento a -70°C.
2. La pre-formulación del volumen con excipientes y/u otros agentes estabilizadores sin congelamiento y transporte a 2-8°C.
3. El transporte del volumen de r-h IFN beta 1a descongelado a 2-8°C sin pre-formulación. Las muestras a granel pre-formuladas se analizaron mediante el uso de procedimientos de SE-HPLC, Deg/Ox HPLC y ultracentrifugación de velocidad. Es probable que la SE-HPLC detecte únicamente los oligómeros covalentes mientras que la ultracentrifugación de velocidad también detecta los oligómeros no covalentes tanto cuantitativamente como cualitativamente.

3.0 OBJETIVO/ ALCANCE

Minimizar la oligomerización del r-h IFN beta 1a durante el procesamiento a granel.

4.0 EQUIPOS Y MATERIALES

4.1 EQUIPOS

Unidad de filtro de 0,2µ P/N MPGL025 Millipore  
 Congelador Revco a -70 °C  
 Bomba peristáltica  
 Tubos de centrifugación cónicos de 250 ml - Corning  
 Criotubos de 1,8 ml – Nunc

4.2 MATERIALES

Fracción SEC el2  
 D-Manitol DAB, Ph Eur, BP, USP, FCC, E421 (código 1.05980, Merck)  
 Ácido acético glacial al 100% (código 1.00063, Merck)  
 Hidróxido de sodio 10M  
 L-Metionina (1.05707, Merck)  
 Monoclorhidrato de L-Arginina (código 1.01544, Merck)  
 Lisina (código 1.05701, Merck)

5.0 PROCEDIMIENTO

El estudio se llevó a cabo en fracciones de SEC-EL2.  
 El esquema del estudio se muestra en la figura 8.  
 Las diferentes condiciones de pre-formulación se muestran en la tabla 20.

**Tabla 20 - Condiciones de pre-formulación**

Condición	L-Arginina mg/ml	Manitol Mm	Lisina mg/ml	L-Metionina mg/ml	N° de los tubos	Almacenamiento	pH final	mg/ml*
1 Control	-	-	-	-	1x250ml lleno 1x2ml lleno 1x2ml medio lleno	2-8 °C	3,9	495
					1x250ml 2x2ml	-70 °C		
2	31,6	-	-	-	1x250ml 4x2ml	-70 °C	3,83	420
3		300	-	0,12	2x250ml lleno 4x2ml	2-8 °C	3,92	507
4		-	82,2	0,5	2x250ml 4x2ml	-70 °C	3,95	437

\*probado mediante HPLC Cuant.

6.4 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

Las soluciones se prepararon de conformidad con el ejemplo 2.

1. **Preparación de acetato sódico 50 mM, pH 3.8 (SAB)**  
Ver el ejemplo 2.
2. **Preparación de 0,5 litros de acetato 50 mM, pH-3,8, 63,2 mg/ml de arginina**
- 5 a. Se pesaron 0,483 kg de WFI  
b. Se agregaron 31,6 g de arginina.  
c. La solución se mezcló durante 5 minutos para permitir que la arginina se disolviera.  
d. Se agregaron 1,5 g de ácido acético.  
e. La solución se mezcló durante 5 minutos.  
f. Mientras que se medía el pH, se agregaron aproximadamente 0,28 ml de NaOH 10M hasta que el pH
- 10 llegó a 3,8. g. La solución se muestreó para verificar la conductividad y el pH. h. La solución se filtró a través de un filtro de 0,2 micrones.
3. **Preparación de 1 litro de acetato 50 mM, pH-3,8, 31,6 mg/ml de arginina**
- 15 a. Se pesaron 0,986 kg de WFI.  
b. Se agregaron 31,6 g de arginina.  
c. La solución se mezcló durante 5 minutos para permitir que la arginina se disolviera.  
d. Se agregaron 3,002 g de ácido acético.  
e. La solución se mezcló durante 5 minutos.  
f. Mientras se medía el pH, se agregaron aproximadamente 0,56 ml de NaOH 10M hasta que el pH llegó
- 20 a 3,8. g. La solución se muestreó para verificar la conductividad y el pH.  
h. La solución se filtró a través de un filtro de 0,2 micrones. 4.
4. **Preparación de 1 litro de acetato 50 mM, pH-4,1, 164,4 mg/ml de lisina**
- 25 a. Se pesaron 0,835 kg de WFI.  
b. Se agregaron 164,4 g de lisina.  
c. La solución se mezcló durante 5 minutos para permitir que la lisina se disolviera.  
d. Se agregaron 3,002 g de ácido acético.  
e. La solución se mezcló durante 5 minutos.  
f. Se agregaron 0,56 ml de NaOH, el pH llegó a aproximadamente 4.1.  
g. La solución se muestreó para verificar la conductividad y el pH.  
h. La solución se filtró a través de un filtro de 0,2 micrones.
- 30 5. **Preparación de 1 litro de acetato 50 mM, pH-4,0, 82,2 mg/ml de lisina**
- 35 a. Se pesaron 0,92 kg de WFI.  
b. Se agregaron 82,2 g de lisina.  
c. La solución se mezcló durante 5 minutos para permitir que la lisina se disolviera.  
d. Se agregaron 3,002 g de ácido acético.  
e. La solución se mezcló durante 5 minutos.  
f. Se agregaron 0,56 ml de NaOH, el pH llegó a aproximadamente 4,0.  
g. La solución se muestreó para verificar la conductividad y el pH.  
h. La solución se filtró a través de un filtro de 0,2 micrones.
- 40 6. **Preparación de 1 litro de acetato 50 mM pH-3,8, manitol 600mM, 0,24 mg/ml de metionina**
- 45 a. Se pesaron 0,92 kg de WFI.  
b. Se agregaron 110,28 g de manitol.  
c. La solución se mezcló durante 5 minutos para permitir que el manitol se disolviera.  
d. Se agregaron 3,002 g de ácido acético.  
e. La solución se mezcló durante 5 minutos.  
f. Se agregaron 0,24 g de metionina.  
g. La solución se mezcló durante 5 minutos.  
h. Mientras se medía el pH, se agregaron aproximadamente 0,56 ml de NaOH 10M hasta que el pH llegó
- 50 a 3,8. i. La solución se muestreó para verificar la conductividad y el pH.  
j. La solución se filtró a través de un filtro de 0,2 micrones.
- 55 7. **Preparación de 2 litros de acetato 50 mM, pH-3,8, manitol 300mM, 0,12 mg/ml de metionina**
- 60 a. Se pesaron 1,93 kg de WFI.  
b. Se agregaron 110,28 g de manitol.  
c. La solución se mezcló durante 5 minutos para permitir que el manitol se disolviera.  
d. Se agregaron 6,006 g de ácido acético.  
e. La solución se mezcló durante 5 minutos.  
f. Se agregaron 0,24 g de metionina.  
g. La solución se mezcló durante 5 minutos.  
h. Mientras se medía el pH, se agregaron aproximadamente 1,12 ml de NaOH 10M hasta que el pH llegó
- 65 a 3,8. i. La solución se muestreó para verificar la conductividad y el pH.  
j. La solución se filtró a través de un filtro de 0,2 micrones.

### 6.1 PRE-FORMULACIÓN A GRANEL

El esquema de la preparación y composición a granel se muestra en la figura 8 y en la tabla 20. A continuación sigue una descripción de las pre-formulaciones.

El SEC-EL se cuantificó mediante OD280, la concentración fue de 1,31 mg/ml.

5

#### **1ª etapa (SEC-EL2 dilución 1:1 p/p con las diferentes soluciones amortiguadoras)**

6.2.1 Una cantidad de 155 g de SEC-EL se diluyó 1:1 p/p con 155 g de SAB, 164,4 mg/ml de lisina.

6.2.2 Una cantidad de 78 g de SEC-EL se diluyó 1:1 p/p con 78 g de SAB, 63,2 mg/ml de arginina.

10

6.2.3 Una cantidad de 220 g de SEC-EL se diluyó 1:1 p/p con 220 g de SAB, 600 mM de manitol, 0,24 mg/ml de metionina.

6.2.4 Una cantidad de 189 g de SEC-EL se diluyó con 306 g de SAB para preparar una solución que contenía 0,50 mg/ml de r-h IFN beta 1a. Después de la filtración, esta solución se dividió en tubos de 250 ml y tubos nunc de 2 ml y se almacenó a -70 °C o 2-8 °C, los tubos de 250 ml para el transporte a 2-8 °C se llenaron hasta el tope.

15

#### **2ª etapa (Dilución final a granel a 0,50-0,58 mg/ml de r-h IFN-beta 1a)**

Las siguientes soluciones se prepararon (la concentración diana fue de 0,5 mg/ml de r-h IFN beta 1a).

6.2.5 Se diluyeron 310 g de la solución preparada en 6.2.1 con 90 g de SAB, 82,4 mg/ml de lisina.

6.2.6 Se diluyeron 156 g de la solución preparada en 6.2.2 con 48 g de SAB, 31,6 mg/ml de arginina.

20

6.2.7 Se diluyeron 440 g de la solución preparada en 6.2.3 con 132 g de SAB, 300 mM de manitol, 0,12 mg/ml de metionina.

6.2.8 Después de la filtración estas 3 soluciones (6.2.5 a 6.2.7) se dividieron en tubos de 250 ml y tubos de 2 ml (que contenían 2ml del volumen).

25

6.2.9 Los tubos de 250 ml y los tubos de 2 ml de las soluciones que contenían lisina y arginina se congelaron y almacenaron a -70 °C, la solución que contenía manitol y metionina se almacenó a 2-8 °C (el tubo de 250 ml se llenó hasta el tope).

### 6.3 TRATAMIENTO A GRANEL PRE-FORMULADO

Las muestras almacenadas a -70 °C y 2-8 °C se probaron mediante ultracentrifugación de velocidad, Deg/Ox HPLC y SE-HPLC.

30



7.0 RESULTADOS

Tabla 21

5

Condición	L-Arginina mg/ml	Lisina mg/ml	Manitol Mm	Met mg/ml	Almacenamiento	pH	%Mono	%Ag	%Dímero	DEG/OX HPLC
1 Control SEC-HPLC	-	-	-	-	-70°C	3,9	77,6	1,6	20,8	1,1
1 Control AUC	-	-	-	-	-70°C	3,9	80,4	2,2	17,4	1,1
1 Control SEC-HPLC	-	-	-	-	2-8°C	3,9	99,9			1,1
1 Control AUC	-	-	-	-	2-8°C	3,9	95			1,1
2 SEC-HPLC	31,6	-	-	-	-70°C	3,8	99	0	1	1
2 AUC	31,6	-	-	-	-70°C	3,8	96,6	0,7	2,7	1
3 SEC-HPLC	-	-	300	0,12	2-8°C	3,9	99,8	0,2	0	1,1
3 AUC	-	-	300	0,12	2-8°C	3,9	95	0,6	4,4	1,1
4 SEC-HPLC	-	82,2	300	0,12	-70°C	4	99,6	0,4	0	1,1
4 AUC	-	82,2	300	0,12	-70°C	4	93,8	0,6	5,6	1,1

8.0 OBSERVACIONES

10

Los resultados obtenidos en el ejemplo 2 se confirman en el presente estudio mediante los procedimientos de ultracentrifugación de velocidad y SEC (las diferencias en el nivel de % de monómeros se debe a la probable detección de únicamente los oligómeros covalentes por SEC). Además, la DEG/OX HPLC indica que el nivel de formas oxidadas permanece estable después de la adición de los excipientes al r-h interferón beta 1a a granel.

Ejemplo 4: Estabilización de interferón beta mediante la adición de un excipiente al interferón a granel ya sea antes o después de la etapa de filtración.

15

1.0 GLOSARIO/ ABREVIATURAS

20

- Ag agregados
- COA certificado de análisis
- Dim dímeros
- Deg degradantes
- Deg/Ox-HPLC cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa para degradantes y formas oxidadas
- F/T congelamiento y descongelamiento
- HPLC Cuant. cromatografía líquida de alto rendimiento para la determinación cualitativa de r-IFNβ en r-h IFN-beta 1a a granel
- 25 r-h IFN-beta 1a interferón beta recombinante humano 1a (r-h IFN beta 1a) de células CHO.
- r-h IFNA-beta FDF forma de dosificación final de r-h INF-beta 1a (r-h INF-beta FDF)
- SE-HPLC cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaños
- Temp. Temperatura

## 2.0 Resumen

Mediante el uso de los procedimientos de SE-HPLC y ultracentrifugación de velocidad se mostró que la pre-formulación de IFN beta 1a a granel con manitol 300mM (antes del congelamiento) minimizó los oligómeros y agregados covalentes y no covalentes cuando se agregó antes o después de la filtración a granel y después de 1 ciclo de F/T y 4 ciclos de F/T. El efecto de la adición de manitol 300mM antes de la filtración es más considerable en la disminución del nivel de oligomerización, especialmente de los oligómeros y agregados no covalentes en los tubos de 250ml (recipientes de rutina de r-h IFN beta 1a a granel).

Mediante el uso de los procedimientos de SE-HPLC y ultracentrifugación de velocidad se mostró que los oligómeros no se forman en el r-h IFN-beta 1a a granel descongelado almacenado a 2-8°C sino que se forman durante el congelamiento y descongelamiento del r-h IFN-beta 1a a granel.

## 3.0 INTRODUCCIÓN

La minimización de la oligomerización y agregación de r-h IFN-beta 1a durante los ciclos de congelamiento y descongelamiento es una meta deseada debido a que se cree que los agregados de proteína pueden provocar reacciones inmunogénicas lo que conduce a la producción de anticuerpos neutralizadores.

El procedimiento analítico empleado actualmente para la determinación del nivel de monómeros en el volumen es el de SE-HPLC. Los resultados preliminares mediante el uso de la ultracentrifugación de velocidad parecen indicar que la SE-HPLC puede detectar únicamente los oligómeros covalentes, mientras que la ultracentrifugación de velocidad, detecta además los oligómeros no covalentes de forma cualitativa y cuantitativa (ver experimento 2). El estudio propuesto pretendió determinar el efecto de la pre-formulación del volumen con manitol a escala de producción sobre la oligomerización y agregación del r-h IFN-beta 1a mediante el uso de los procedimientos de SE-HPLC y ultracentrifugación de velocidad como procedimientos analíticos.

## 4.1 OBJETIVO/ALCANCE

4.1.1 Determinar si los agregados no covalentes se encuentran presentes en una fracción de SEC (antes de la filtración y antes del congelamiento).

4.1.2 Determinar si el manitol a 300mM minimiza los oligómeros y agregados covalentes y no covalentes cuando se agrega antes o después de la filtración a granel, antes del congelamiento y después de 1 ciclo de F/T y 4 ciclos de F/T.

4.1.3 Determinar si el manitol a 150mM minimiza los oligómeros y agregados covalentes y no covalentes cuando se agrega antes de la filtración a granel, antes del congelamiento y después de 1 ciclo de F/T y 4 ciclos de F/T.

4.1.4 Determinar si el nivel de agregados no covalentes en los tubos de prueba de 1,8 ml es similar al de los tubos de 250 ml, después del F/T.

## 5.0 EQUIPOS Y MATERIALES

### 5.1 EQUIPOS

Unidad de filtración de 0,2µ para 150-500 ml de Nalgene.

### 5.2 MATERIALES

Fracción SEC el2 - 800 ml.

Manitol - Merck P/N 1.05980.9050

Solución amortiguadora de acetato 50 mM, pH 3,8, IPL código S88RD600

Solución amortiguadora de acetato 50 mM, pH 3,8 con manitol 300 mM (54,6 g Manitol/litro)

Solución amortiguadora de acetato 50 mM, pH3,8, con manitol 600 mM (109,39 Manitol/litro).

Solución amortiguadora de acetato 50 mM, pH 3,8 con manitol 150 mM (27,3 g Manitol/litro)

Tubos de centrifugación cónicos de 250 ml - Corning P/N 430776

Criotubos de 1,8 ml - tubos Nunc P/N 375418

## 6.0 PROCEDIMIENTO

El estudio se llevó a cabo en una única fracción de SEC-EL2.

(concentración 1,81 mg/ml, de conformidad con OD280).

### 6.1 PREPARACIÓN A GRANEL

Los volúmenes se prepararon de la siguiente forma:

#### (1) Fracción SEC el2

Un tubo de 1,8 ml se llenó completamente para la ultracentrifugación de velocidad y se transportó a 2-8 °C.

#### (2) Control

Se filtraron 180 ml de SEC el2 a través de un filtro de 0,2µ seguido por un lavado de filtro con 720 ml de acetato 50 mM, pH-3,8. El volumen se distribuyó en cuatro tubos de 250 ml (200 ml cada uno) y en diez criotubos de 1,8 ml antes del congelamiento a -70 °C. Dos de los tubos de 1,8 ml no se congelaron. Uno de estos dos tubos se llenó completamente y se mantuvo a 2-8 °C antes del análisis de ultracentrifugación de velocidad.

La concentración del volumen fue de 350 µg/ml (de conformidad con HPLC Cuant.).

#### (3) Manitol 300 mM agregado después de la filtración

Se filtraron 180 ml de SEC el2 a través de un filtro de 0,2µm y a continuación el filtro se lavó con 180 ml de acetato 50 mM, manitol 600 mM, pH-3,8 y 540 ml de acetato 50 mM, manitol 300 mM, pH-3.8. El volumen se distribuyó en

cuatro tubos de 250 ml (200 ml cada uno) y en diez criotubos de 1,8 ml antes del congelamiento a -70 °C. Dos de los tubos de 1,8 ml no se congelaron. Uno de estos dos tubos se llenó completamente y se mantuvo a 2-8 °C antes del análisis de ultracentrifugación de velocidad. La concentración final de manitol fue de 300 mM. La concentración del volumen fue de 344 µg/ml (de conformidad con HPLC Cuant.).

5 **(4) Manitol 150 mM agregado antes de la filtración**

Se mezclaron 200 ml de SEC el2 con 200 ml de acetato 50mM, manitol 300 mM, 380 ml de esta mezcla se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm y a continuación el filtro se lavó con 570 ml de acetato 50 mM, manitol 150 mM, pH-3,8. El volumen se distribuyó en cuatro tubos de 250 ml (200 ml cada uno) y en diez criotubos de 1,8 ml antes del congelamiento a -70 °C. Dos de los tubos de 1,8 ml no se congelaron. Uno de estos dos tubos se llenó completamente y se mantuvo a 2-8 °C antes del análisis de ultracentrifugación de velocidad. La concentración final de manitol fue de 150 mM. La concentración del volumen fue de 342 µg/ml (de conformidad con HPLC Cuant.).

10

15 **(5) Manitol 300 mM agregado antes de la filtración**

Se mezclaron 200 ml de SEC el2 con 200 ml de acetato 50mM, manitol 600 mM, 380 ml de esta mezcla se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm y a continuación el filtro se lavó con 400 ml de acetato 50 mM, manitol 300 mM. El volumen se distribuyó en cuatro tubos de 250 ml (200 ml cada uno) y en diez criotubos de 1,8 ml antes del congelamiento a -70 °C. Dos de los tubos de 1,8 ml no se congelaron. Uno de estos dos tubos se llenó completamente y se mantuvo a 2-8 °C antes del análisis de ultracentrifugación de velocidad. La concentración final de manitol fue de 300 mM. La concentración del volumen fue de 342 µg/ml (de conformidad con HPLC Cuant.).

15

20

**Nota:** El eluyente de la columna de SEC se recolectó en cuatro botellas de 1 litro en paralelo a través de un sistema de cuatro válvulas controladas electrónicamente que se abrían de forma alternativa cada 5 minutos (controladas por el controlador LCC500). En el caso en que el manitol se agregó a la fracción de SEC-EL2 antes de la filtración, la fracción de SEC y las soluciones de manitol (4) o (5) se mezclaron suavemente en la botella de vidrio en línea durante la elusión de la columna de SEC. En el caso en que el manitol se agregó después de la filtración de SEC (3), el manitol se agregó y se filtró a través de la misma unidad de filtración pero después de la fracción de SEC EL-2.

25

**6.2 CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO**

Los 4 ciclos de F/T de los tubos de 250 ml se llevaron a cabo mediante el congelamiento durante al menos 8 horas y el descongelamiento durante 7 horas a temperatura ambiente. A continuación los tubos se mezclaron después de cada ciclo de descongelamiento en 25 inversiones. Los cuatro ciclos de F/T de los tubos de 1,8ml se llevaron a cabo mediante el congelamiento durante al menos 8 horas y el descongelamiento durante 2 horas. Los tubos se mezclaron mediante 20 inversiones antes del siguiente ciclo de congelamiento. De cada condición a granel (2-5), dos tubos de 250ml congelados y dos tubos de 1,8ml derivados de los tratamientos de 1 F/T y 4 F/T se mantuvieron para la ultracentrifugación de velocidad. Los otros dos tubos de 250ml y 1,8ml para cada condición a granel se descongelaron y probaron mediante SEC-HPLC. La prueba de SE-HPLC y la ultracentrifugación de velocidad se llevaron a cabo sobre las muestras descongeladas durante 24 horas +/-2 horas. Lo que permitió en primer lugar que el manitol se disolviera.

30

35

Tabla 22 - Lista de las muestras probadas por SEC/lote a granel

Descripción de la muestra	Volumen de la muestra en tubo	Prueba
SEC 2-8°C (1)	1,8ml en 1,8ml	Vel.. ultra.
VOLUMEN 2-8°C (1)	1,8ml en 1,8ml 0,5ml en 1,8ml	Vel.. ultra. SE -HPLC
VOLUMEN 1 F/T (2)	200ml en 1,8 ml 0,5ml en 1,8ml 200ml en 250ml 0,5ml en 1,8ml	Vel.. ultra. Vel.. ultra. SE -HPLC SE -HPLC
VOLUMEN 4 F/T (2)	200ml en 250ml 1,8ml en 1,8ml 200ml en 250ml 0,5ml en 1,8ml	Vel.. ultra. Vel.. ultra. SE -HPLC SE -HPLC
Volumen 300mM Manitol (agregado después de filtración SEC) 2-8°C (3)	1,8ml en 1,8ml 0,5ml en 1,8ml	Vel.. ultra. SE -HPLC
Volumen 300mM Manitol (agregado después de filtración SEC) 1F/T(3)	200ml en 250ml 1,8ml en 1,8ml 200ml en 250ml 0,5ml en 1,8ml	Vel.. ultra. Vel.. ultra. SE -HPLC SE -HPLC
Volumen 300mM Manitol (agregado después de filtración SEC) 4F/T(3)	200ml en 250ml 1,8ml en 1,8ml 200ml en 250ml 0,5ml en 1,8ml	Vel.. ultra. Vel.. ultra. SE -HPLC SE -HPLC
Volumen 150mM Manitol (agregado antes de filtración SEC) 2-8°C (4)	1,8ml en 1,8ml 0,5ml en 1,8ml	Vel.. ultra. SE -HPLC
Volumen 150mM Manitol (agregado antes de filtración SEC) 1F/T(4)	200ml en 250ml 1,8ml en 1,8ml 200ml en 250ml 0,5ml en 1,8ml 0,5ml en 1,8ml	Vel.. ultra. Vel.. ultra. SE -HPLC SE -HPLC QUANT HPLC
Volumen 150mM Manitol (agregado antes de filtración SEC) 4F/T(4)	200ml en 250ml 1,8ml en 1,8ml 200ml en 250ml 0,5ml en 1,8ml	Vel.. ultra. Vel.. ultra. SE -HPLC SE -HPLC
Volumen 300mM Manitol (agregado antes de filtración SEC) 2-8°C (5)	1,8ml en 1,8ml 0,5ml en 1,8ml	Vel.. ultra. SE -HPLC
Volumen 300mM Manitol (agregado antes de filtración SEC) 1F/T(5)	200ml en 250ml 1,8ml en 1,8ml 200ml en 250ml 0,5ml en 1,8ml 0,5ml en 1,8ml	Vel.. ultra. Vel.. ultra. SE -HPLC SE -HPLC QUANT HPLC
Volumen 300mM Manitol (agregado antes de filtración SEC) 4F/T(5)	200ml en 250ml 1,8ml en 1,8ml 200ml en 250ml 0,5ml en 1,8ml	Vel.. ultra. Vel.. ultra. SE -HPLC SE -HPLC
Volumen de la solución amortiguadora (50mN de acetato amortiguador)	250ml en 250ml (5 tubos) 250ml en 250ml (5 tubos)	Método Chems-can Plate

**Nota:** Los números entre paréntesis se refieren al esquema detallado.

7.0 RESULTADOS

7.1 El uso del procedimiento de SE-HPLC, después de 1 F/T y la pre-formulación con manitol en las tres condiciones (3, 4 y 5) tuvo un efecto secundario en la disminución del nivel de oligomerización tanto en los tubos de 1,8 ml como en los de 250 ml (-0,4% más de pureza en comparación con la muestra de control).

El uso del procedimiento de ultracentrifugación de velocidad, después de 1 F/T de manitol en las tres condiciones (3, 4 y 5) tuvo un efecto significativo en el nivel de oligomerización tanto en los tubos de 1,8 ml como en los de 250 ml.

En los tubos de 250ml (Tabla 25), la adición de manitol 300 mM antes de la filtración (condición 5) presentó un efecto más positivo en la disminución de la oligomerización en comparación con el manitol 300 mM después de la filtración (condición 3).

En los tubos de 1,8 ml (Tabla 24), la adición de manitol 300 mM después de la filtración (condición 3) presentó un efecto más positivo en la disminución de la oligomerización en comparación con el manitol antes de la filtración (condición 5).

7.2 El uso del procedimiento de SE-HPLC, después de 4 ciclos de F/T (tabla 26) con manitol en las tres condiciones (3, 4 & 5) tuvo un efecto significativo en la disminución del nivel de oligomerización en los tubos de 1,8ml (aproximadamente una pureza un 2,6% mayor en comparación con la muestra de control cuando se pre-formuló con manitol 300 mM).

Mediante el uso del procedimiento de ultracentrifugación, después de 4 ciclos de F/T, el manitol en las tres condiciones (3, 4 & 5) tuvo un efecto significativo en el nivel de oligomerización tanto en los tubos de 1,8ml como en los de 250ml. No obstante, el efecto positivo fue más dominante en los tubos de 1,8ml.

7.3 Mediante el uso de los procedimientos de SE-HPLC y ultracentrifugación (tabla 23), no ocurrió oligomerización en las muestras almacenadas a 2-8°C (no congeladas).

7.4 De conformidad con los procedimientos de SE-HPLC y de ultracentrifugación, el nivel de oligomerización fue significativamente mayor en los tubos de 250ml en comparación con los tubos de 1,8ml.

**Nota:** Los resultados entre comillas en las tablas 23 a 27 están relacionados con el % de agregados.

**Tabla 23 - % de pureza del volumen en los tubos de 1,8 ml almacenados a 2-8 °C**

Prueba	Condiciones			
	2	4	3	5
	No hubo Control de Manitol	150mM Manitol agregado antes de la filtración	300mM de Manitol agregado después de la filtración	300mM de Manitol agregado antes de la filtración
SE-HPLC	100	100	100	100
Ultracentrifugación	N/A	N/A	N/A	N/A

**Tabla 24 - % de pureza del volumen en los tubos de 1,8 ml después de un ciclo de F/T**

Prueba	Condiciones			
	2	4	3	5
	No hubo Control de Manitol	150mM Manitol agregado antes de la filtración	300mM de Manitol agregados después de la filtración	300mM de Manitol agregados antes de la filtración
SE-HPLC	99,4(0,5)	99,7(0,1)	99,7(0)	99,8(0,1)
Ultracentrifugación	84,6(1,1)	88,1(0,5)	96,6(0,1)	94(0,9)

**Tabla 25 - % de pureza del volumen en los tubos de 250 ml después de un ciclo de F/T**

Prueba		Condiciones			
		2	4	3	5
		No hubo Control de Manitol agregado antes de la filtración			
		150mM de Manitol agregado antes de la filtración	300mM de Manitol agregados después de la filtración	300mM de Manitol agregado antes de la filtración	
SE-HPLC	1*	98,5(0,1)	98,6(0,1)	99(0,1)	99,8(0,2)
	2*	98,5(0,1)	98,6(0,1)	98,9(0,1)	99(0,1)
	Prom.	98,5(0,1)	98,6(0,1)	98,95(0,1)	98,9(0,15)
Ultracentrifugación		75,8(2,35)	78(2,22)	80,7(1,05)	86(0,35)

\*Muestras de tubos de 250ml distintos

5

**Tabla 26 - % de pureza del volumen en los tubos de 1,8 ml después de cuatro ciclos de F/T**

Prueba		Condiciones			
		2	4	3	5
		No hubo Control de Manitol agregado antes de la filtración			
		150mM de Manitol agregado antes de la filtración	300mM de Manitol agregados después de la filtración	300mM de Manitol agregado antes de la filtración	
SE-HPLC	1*	96,3(1,4)	98,3(0,4)	99(0,3)	99(0,3)
	2*	96,5(1,5)	98,3(0,4)	99,1(0,2)	98,8(0,3)
	Prom.	96,4(1,45)	98,3(0,4)	99,05(0,25)	98,9(0,3)
Ultracentrifugación		77(6,8)	92,7(0,9)	84,6(3,63)	86,1(0,7)

\*Muestras de tubos de 1,8ml distintos

10

**Tabla 27 - % de pureza del volumen en los tubos de 250 ml después de 4 ciclos de F/T**

Prueba		Condiciones			
		2	4	3	5
		No hubo Control de Manitol agregado antes de la filtración			
		150mM de Manitol agregado antes de la filtración	300mM de Manitol agregados después de la filtración	300mM de Manitol agregado antes de la filtración	
SE-HPLC	1*	94(2,1)	93,8(0,9)	94,3(1,5)	93,8(1,4)
	2*	94(2,1)	93,8(1,0)	94,3(1,5)	93,8(1,5)
	Prom.	94(2,1)	93,8(0,95)	94,3(1,5)	93,8(1,45)
Ultracentrifugación		72(6,29)	74(4,48)	76,4(3,63)	76,6(4,01)

\*Muestras de un mismo tubo

15

**8.0 CONCLUSIONES**

8.1 Mediante el uso de los procedimientos de SE-HPLC y ultracentrifugación de velocidad se mostró que la pre-formulación de r-h IFN beta 1a a granel con manitol 300mM (antes del congelamiento) minimizó los oligómeros y agregados covalentes y no covalentes cuando se agregó antes o después de la filtración a granel y después de uno ciclo de F/T y cuatro ciclos de F/T. No obstante, efecto de la adición de manitol 300mM antes de la filtración es más

considerable en la disminución del nivel de oligomerización, especialmente de los oligómeros y agregados no covalentes en los tubos de 250ml (recipientes de rutina de r-h IFN beta 1a a granel).

El efecto de la pre-formulación del volumen con manitol sobre la oligomerización y agregación del r-h IFN beta 1a, seguida de F/T en los tubos de prueba de 1,8ml fue similar al de los tubos de 250ml (una pureza aproximadamente un 0,4% mayor en comparación con la muestra de control cuando se probó mediante SE-HPLC y aproximadamente un 13% mayor cuando se probó mediante ultracentrifugación de velocidad).

8.2 La adición de manitol a una concentración de 150mM minimizó además los oligómeros y agregados covalentes y no covalentes cuando se agregó antes de la filtración a granel, antes del congelamiento y después de 1 ciclo de F/T y 4 ciclos de F/T pero el efecto fue menos considerable en comparación con el efecto de 300 mM.

8.3 Mediante el uso de los procedimientos de SE-HPLC y ultracentrifugación de velocidad se mostró que los oligómeros no se formaron en el r-h IFN-beta 1a a granel descongelado ni en el SEC-EL almacenado a 2-8°C sino que se formaron durante el congelamiento y descongelamiento del r-h IFN-beta 1a a granel.

8.4 Los resultados preliminares mediante el uso de la ultracentrifugación de velocidad parecen indicar que la SE-HPLC (a diferencia de la NUEVA SEC) puede detectar únicamente los oligómeros covalentes, mientras que la ultracentrifugación de velocidad, detecta además los oligómeros no covalentes de forma cualitativa y cuantitativa.

Las muestras almacenadas a 4°C (o 2-8°C), que no se sometieron a ciclos de F/T, permanecieron muy estables (en términos de % de contenido de monómeros). Sin limitarse a esta teoría, se cree que el efecto de las tensiones sobre la molécula, como los ciclos de congelamiento/descongelamiento, aumenta de manera constante la formación de oligómeros de interferón beta. En las muestras almacenadas a 4°C se proporcionaron los mejores resultados con la combinación de manitol y metionina con la adición oportuna complementaria de alcohol bencílico o Tween 20, que no mostró ninguna oligomerización en las muestras almacenadas a 2-8°C. Preferentemente, el presente procedimiento emplea una combinación de manitol y metionina como estabilizadores con la posibilidad de agregar además alcohol bencílico o Tween 20. La lisina por sí sola o en combinación es también un excipiente preferido para su empleo. Pocos excipientes muestran actividad estabilizadora contra las tensiones provocadas por los ciclos de F/T, es decir, Tween 20, alcohol bencílico o lisina (es decir, se ha mostrado que estos excipientes contrarrestan las tensiones del congelamiento/descongelamiento). Si el proceso de fabricación se encuentra sujeto a ciclos de congelamiento/descongelamiento, entonces se agregan preferentemente los excipientes preferidos como Tween 20, alcohol bencílico o lisina a la solución a granel.

Por tanto, cuando los ciclos de F/T ocurren durante el proceso de fabricación, se identifican además los excipientes preferidos y sus combinaciones. Las muestras almacenadas a -20°C en la presente invención se sometieron a muchos ciclos de F/T, los tubos se congelaron primero a -70°C y después se transfirieron a un segundo congelador para el almacenamiento a -20°C durante 16 días. Las muestras se volvieron a transferir a -70°C durante 4 horas antes del descongelamiento. De conformidad con lo que antecede, el Tween 20, el alcohol bencílico y la lisina se utilizan preferentemente como estabilizadores cuando ocurren las tensiones como los ciclos de F/T. De ese modo, a cualquier temperatura de almacenamiento (-70°C, -20°C o 4°C) y en la presencia de tensiones como los ciclos de F/T, las tensiones de tween, el Tween 20, la lisina y el alcohol bencílico solos o en cualquier combinación son excipientes preferidos para su uso en una solución de interferón a granel. Las siguientes combinaciones son particularmente preferidas:

1. Lisina y alcohol bencílico,
2. Lisina y Tween 20,
3. Lisina y alcohol bencílico y Tween 20, y
4. Alcohol bencílico y Tween 20.

Las realizaciones descritas a continuación son las más preferidas para cualquier temperatura de almacenamiento (-70°C, -20°C o 4°C) y en la presencia de tensiones como los ciclos de F/T.

La lisina proporciona buenos resultados a -20°C, así como para los 4°C y -70°C en términos de % de monómeros y % de agregados. La lisina es el único aminoácido probado que es capaz de estabilizar el interferón beta contra los ciclos de congelamiento/descongelamiento. Por tanto, la lisina es el excipiente más preferido contra los ciclos de F/T y evita la necesidad de agentes bacteriostáticos (por ejemplo alcohol bencílico) o tensioactivos (por ejemplo, Tween 20), que fueron los otros dos excipientes que mostraron actividad estabilizadora contra la tensión por F/T. De este modo, puede considerarse que las pre-formulaciones contienen únicamente lisina o una combinación de lisina y un antioxidante (por ejemplo, metionina). De hecho, los mejores resultados a -20°C se obtuvieron mediante la combinación de lisina y metionina. Más preferentemente, la presente invención utiliza una combinación de lisina y metionina. Se obtuvo un alto nivel de porcentaje de monómeros con una combinación de manitol, metionina y Tween 20 (98,12% de monómeros). La combinación de alcohol bencílico y metionina proporcionó un porcentaje de monómeros alto (aproximadamente un 98% de monómeros). Por tanto, se prefiere la combinación de alcohol bencílico y metionina. Puede agregarse Tween 20 de forma adicional a esta combinación, lo que proporciona un % de monómeros más alto (aproximadamente un 99%). Por tanto, la combinación de alcohol bencílico, metionina y Tween 20 es más preferida.

Los experimentos se realizaron en dos puntos específicos durante el proceso de fabricación. La adición de ciertos excipientes (por ejemplo manitol) antes o después de la filtración, disminuyó y/o redujo la formación de oligómeros y agregados. Mediante el uso de los procedimientos de SE-HPLC y ultracentrifugación de velocidad se mostró que la pre-formulación de r-h IFN beta 1a a granel con manitol 300mM (antes del congelamiento) minimizó los oligómeros y

agregados covalentes y no covalentes cuando se agregó antes o después de la filtración a granel y después de un ciclo de F/T y cuatros ciclos de F/T. Por consiguiente, la invención no debe limitarse en ningún caso únicamente a un punto específico del proceso de fabricación de la proteína a granel sino que abarca todas las etapas necesarias para la preparación y/o almacenamiento de una proteína a granel pre-formulada (es decir, pueden agregarse excipientes estabilizadores en múltiples etapas durante el procesamiento a granel). Los resultados no muestran una gran diferencia en términos de oligomerización y agregación, pero la adición de manitol antes de la filtración proporciona mejores resultados, especialmente con los oligómeros y agregados no covalentes en los tubos de 250ml. Preferentemente, se agrega entonces manitol antes de la etapa de filtración.

Finalmente, los experimentos anteriores mostraron que la combinación de ciertos excipientes y la disociación térmica pueden proporcionar niveles más altos de porcentaje de monómeros en comparación con los niveles obtenidos cuando se tomaron de forma separada. De esta forma, se alcanza una reducción drástica en términos de niveles de dímeros y agregados. Por consiguiente, la presente invención preferentemente combina una solución a granel estable por medio de la adición de excipientes con disociación térmica. La disociación térmica puede llevarse a cabo en cualquier etapa del proceso de fabricación y no debe limitarse en ningún caso a un punto específico del procesamiento a granel.

Ejemplo 5: Estudios de pre-formulación a un pH 4,7

Para evaluar la incidencia del pH sobre la oligomerización y la formación de agregados, se realizó un estudio de pre-formulación a un pH de 4,7.

(1) Procedimiento:

1. Se pre-formuló un primer volumen de 0,5mg/ml a un pH de 4,7 mediante la mezcla 1:1 (1 volumen de la fracción de SEC EL2 con 1 volumen de acetato 50 mM a un pH de 7,2 y se valoró con NaOH).

2. Se pre-formuló un segundo volumen a un pH de 4,7 con 82,2mg/ml de lisina mediante la mezcla 1:1 (1 volumen de la fracción de SEC EL2 con un volumen de acetato 50 mM a un pH de 7,2, que contenía lisina a 164,4mg/ml y se valoró con NaOH).

3. Estas preparaciones se compararon con un control a 0,5mg/ml en acetato 50mM, pH 3,8 y con un control pre-formulado a 0,5 mg/ml en acetato 50mM, pH 3,9 con 82,2mg/ml de lisina.

4. Después de un ciclo de congelamiento y descongelamiento, en tubos de 1,8ml, las muestras se probaron mediante el nuevo procedimiento de SEC HPLC.

Resultados:

**Tabla 28**

Condiciones	%monómero	%dímero	%agregado
pH 3,8	81,41	17,92	0,67
pH 4,7	99,1	0,9	0
pH 4,7	99,4	0,6	0
pH 4,7+Lisina 82,2mg/ml	99,6	0,24	0,12
pH 3,9+Lisina 82,2mg/ml	99,7	0,03	0,27

(2) Conclusión:

- La pre-formulación a un pH de 4,7 redujo de forma consistente la oligomerización y la formación de agregados en comparación con la pre-formulación a un pH de 3,8 (aproximadamente un 99% de monómeros en comparación con un 81% de monómeros respectivamente y un 0,67% de agregados con un 0% de agregados respectivamente). Por tanto, el procedimiento de la presente invención se lleva a cabo a un pH de 4,7.
- La pre-formulación con lisina a un pH de 3,9 o a un pH de 4,7 reduce la oligomerización. A un pH de 4,7, la adición de lisina proporcionó un % de monómeros de un 99,6 % en comparación con el 99,1% de monómeros sin lisina. A un pH de 3,8, la adición de lisina presentó un efecto sorprendente sobre la reducción de la oligomerización lo que proporcionó un % de monómeros de 99,7 en comparación con el 81,41 % de monómeros sin lisina. Por tanto, la lisina es un aminoácido preferido para agregarse al procedimiento de la presente invención.
- La combinación de la pre-formulación a un pH de 4,7 y la adición de lisina proporcionó los mejores resultados. Por tanto, el procedimiento de la presente invención se lleva a cabo más preferentemente a



un pH de 4,7 con la adición de lisina como excipiente. En una realización más preferida, el presente procedimiento de la invención puede por tanto combinar la adición de excipientes preferidos a un interferón a granel a un pH de 4,7 con la disociación térmica.

#### 5 Ejemplo 6: procedimientos analíticos

El presente ejemplo describe los diferentes procedimientos analíticos utilizados.

La (SE)-HPLC de exclusión por tamaños, la nueva SE-HPLC, asimismo denominadas en la presente como "nueva SE-HPLC" o "NUEVA SEC", y la ultracentrifugación de velocidad (AUC) se utilizaron para la medición de los niveles de agregados y oligómeros de interferón beta 1a recombinante humano (r-h IFN-beta 1a o r-h beta IFN 1a). Los procedimientos de NUEVA SE-HPLC y AUC presentados son capaces de detectar los oligómeros covalentes y no covalentes así como los agregados de forma cuantitativa y cualitativa.

#### 15 **a. SE-HPLC – Prueba de pureza**

La SE-HPLC se utiliza para determinar la cantidad de agregados en el IFN beta 1a a granel.

#### 15 **Procedimiento**

Se analizaron las muestras de 100 µl del IFN beta 1a a granel para ser examinado y la muestra de control (PRB).

Se preparó la siguiente solución: ACN (acetonitrilo) al 30% / TFA (ácido trifluoroacético) al 0,2%/ H<sub>2</sub>O.

La columna (Progel-TSK G2000 o equivalente) se equilibró en el eluyente, a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min, por al menos 1 hora. Una vez que se obtuvo una línea de base regular, las muestras de 100 µl se inyectaron y eluyeron mediante el uso de un gradiente isocrático, a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. El perfil de columna se registró mediante detección UV a 214 nm. El porcentaje del monómero de IFN beta 1a de la muestra a granel se determinó a partir de las áreas integradas de picos de proteína.

#### 25 **Especificación**

El área principal del pico de la muestra de IFN beta 1a a granel (que corresponde a la molécula intacta) no es menor al 95% del área total de picos, con no más de un 1% de agregados.

#### **Procedimiento para la muestra de control de congelamiento/ descongelamiento (F/T) para la prueba de SE-HPLC**

1. Retirar la cantidad deseada de r-h interferón beta 1a a granel/lote del congelador de -70 °C.
- 30 2. Descongelar a temperatura ambiente durante 6 a 9 horas para los tubos grandes (aproximadamente 200 ml) o 2 a 4 horas para los tubos/ ampollas pequeños (1-15 ml). (Primer ciclo de congelamiento/ descongelamiento).
3. Una cantidad deseable del volumen anterior es la alícuota de porciones de 1 ml (en el caso de tubos grandes).
4. Congelar las alícuotas a -70 °C durante al menos 2 horas.
- 35 5. Repetir las etapas 2 y 4 tres veces más.
6. Después del cuarto ciclo de descongelamiento, diluir la pequeña cantidad de la muestra de control a 0,25 mg/ml con solución amortiguadora de dilución para el control.
7. La alícuotas deben almacenarse a -70 °C. 8.
- 40 8. Descongelar los tubos divididos en alícuotas de F/T de control durante 2 horas a temperatura ambiente antes de utilizarlos en la prueba de SE-HPLC.

#### **b. NUEVA SE-HPLC**

La detección del contenido total de agregados se realizó sobre una columna TSK G2000SWXL (TosoHaas) o Bio-Suite (Waters); la elución se realizó en el modo isocrático a 0,5 mL/min mediante el uso de una solución amortiguadora de acetato sódico 50 mM, NaCl 50 mM, pH 3,8, la longitud de onda se ajustó a 215 nm. El tiempo de ejecución es de 30 minutos. El r-h IFN beta 1a a granel en la práctica (0,35 mg/ml) se inyecta en la columna en la fase de saturación (0,2 ml por inyección).

#### Equipos y materiales del nuevo procedimiento de SE-HPLC:

50 Sistema de HPLC: Waters Alliance

Detector UV: Waters 996 PDA longitud de onda 214 nm

Ajuste de temperatura de automuestreo: 4 °C.

Columna TosoHaas TSK G2000 SW<sub>XL</sub>

Temperatura de columna: temperatura ambiente.

Fase móvil: acetato sódico 50 mM, pH 3,8 con NaCl 50mM.

55 Preparada mediante la disolución de 5,84gr. de NaCl en 2 litros de acetato sódico de 50mM, pH 3,8, solución amortiguadora. La solución amortiguadora de acetato se preparó en una unidad de solución estéril mediante la adición de ácido acético a WFI y la valoración con una solución de NaOH 10M hasta el pH 3,8.

Velocidad de flujo: 0,5 mL/min.

Eluyente: CH<sub>3</sub>COONa 50 mM - NaCl 50 mM, pH 3,8

60 Solución activadora: HCl 50 mM - NaCl 50 mM

#### Reactivos:

Acético, Merck Código K31358056

NaOH, Merck B197582

Solución de NaOH 10M

65 WFI

NaCl, JT BAKER código 3627-07

**c. Análisis de velocidad de sedimentación - AUC**

1. Descripción del procedimiento

5 Las muestras de descripción del procedimiento se cargaron en células con piezas centrales de carbón-epón de dos canales con una longitud de trayectoria de 12mm. Las piezas centrales y las ventanas color zafiro se limpiaron con detergente y después se pusieron en remojo en agua para tratar de lograr superficies más claras. El placebo correspondiente se cargó en el canal de referencia (el instrumento funciona como un espectrofotómetro de doble haz). Las células cargadas a continuación se colocaron en un rotor analítico AN-50Ti, cargado en una centrifugadora analítica Beckman Optima XL-I y se llevaron a 20°C. El rotor a continuación se llevó a 3000rpm y las muestras se escanearon (a 280nm, el pico de absorbancia) para confirmar la carga adecuada de las células. El rotor a continuación se llevó a la velocidad de ejecución final de 50000rpm. Se registraron 50 escaneos para cada muestra a esta velocidad de rotor.

15 Los datos se analizaron mediante el uso del procedimiento c(s) desarrollado por Peter Schuck en N.I.H. e implementado en su programa de análisis SEDFIT (versión 8.7; Schuck, P. (2000)). Análisis de distribución de tamaño de las macromoléculas mediante ultracentrifugación de velocidad de sedimentación y modelado de ecuación de Lamm Biophys. J. 78, 1606-1619).

20 En este enfoque, cualquier dato sin procesar se ajusta directamente para obtener la distribución de coeficientes de sedimentación, mientras que modela la influencia de la difusión en los datos para mejorar la resolución. El procedimiento funciona mediante la asignación de un coeficiente de difusión para cada valor de coeficiente de sedimentación basado en el supuesto de que todas las especies tienen la misma forma hidrodinámica general (con forma definida por el cociente del coeficiente de fricción con relación al de una esfera  $f/f_0$ ). Por tanto, los valores de  $f/f_0$  son variados para encontrar el mejor ajuste general de los datos para cada muestra. Las distribuciones se calcularon mediante el uso de nivelación de entropía máxima.

25 2. Parámetros analíticos

– Tipo de rotor	8 orificios
– Velocidad de rotor	50k rpm
– Piezas centrales	carbón epón
– Longitud de canal	12mm
– Temperatura durante la ejecución de la AUC	20 °C
– Longitud de onda de detección	280 nm
– Volumen de muestra	432 mcl
– Volumen de referencia	442 mcl

35 3. Equipos y software

Ultracentrifugadora analítica modelo XL-I (Beckman Coulter)  
Software SEDFIT versión 8.70b (Peter Schuck - National Institutes of Health)  
Software Origin versión 6.03 (Beckman Coulter)  
Software Proteome Lab XL-A/XL-1 versión 5.0 (Beckman Coulter)

40 **d. Cuantificación del IFN-beta-1a mediante RP-HPLC - HPLC Cuant.**

El procedimiento de fase inversa descrito a continuación permite la cuantificación de IFN beta 1a en las muestras a granel.

La cuantificación de la proteína se realizó sobre una columna de poro ancho C4, butilo 5 µm (Baker); la longitud de onda se ajustó a 214nm y la elución se realizó en 1mL/min mediante el uso de la siguiente fase móvil y gradiente.

45 Procedimiento:

Las muestras de IFN beta 1a para examinar se diluyeron con una solución amortiguadora de acetato sódico 50 mM, pH 3,8, a una concentración que osciló entre 50 y 150 µg/ml.

Se prepararon las siguientes soluciones:

50 Eluyente A: TFA al 0,1% en H<sub>2</sub>O (agua/ácido trifluoroacético 0,1%)  
Eluyente B: TFA al 0,1% en ACN (acetonitrilo/ácido trifluoroacético al 0,1%)  
Eluyente C: ACN (acetonitrilo)

55 La columna C4 RP-HPLC primero se lavó con el eluyente C a una velocidad de flujo de 1,0ml/min durante 30 minutos y a continuación con un 50% de H<sub>2</sub>O y un 50% de ACN durante 15 minutos. La columna se equilibró en un 70% del eluyente A y un 30% del eluyente B, a una velocidad de flujo de aproximadamente 1,0 ml/min durante 15 minutos.

Una vez obtenida la línea de base regular, las muestras de IFN beta 1a, las muestras de control y las muestras de la curva de calibración (PRB, 1.24-19.8 µg) se inyectaron de forma secuencial. En cada caso se inyectaron 100 µl excepto por la muestra de 1,24 µg de la curva de calibración, para la cual se inyectaron 20 µl. La velocidad de flujo se mantuvo a 1,0 ml/min.

60 Se utilizó el siguiente gradiente:

Tabla 29

Tiempo (min.)	% Eluyente A	% Eluyente B	% Eluyente C
0	70	30	0
5	70	30	0
6	58	42	0
15	57	43	0
30	46	54	0
35	45	55	0
40	40	60	0
40,1	20	80	0
45	20	80	0
45,1	0	0	100
50	0	0	100
50,1	70	30	0
65	70	30	0

Tiempo de ejecución = 65 minutos

5 La cantidad de IFN beta 1a en la muestra de prueba se calculó a partir de la regresión logarítmica de las áreas de la curva de calibración.

**Especificación**

El IFN beta 1a a granel contiene 0,280 a 0,500 mg de IFN beta 1a/ml.

10 **e. Pureza por HPLC de fase inversa (RP) - DEG/OX**

El procedimiento de fase inversa descrito a continuación permite la detección de las formas oxidadas del IFN beta 1a, que se eluye de forma diferente a la molécula intacta.

La cuantificación de las formas oxidadas se realizó sobre una columna C4, Supelcosil LC-304 (Supelco) con termostato a 40°C; la longitud de onda se ajustó a 208 nm y la elución se realizó en 1 mL/min mediante el uso de la siguiente fase móvil y gradiente.

15 Se prepararon las siguientes soluciones:

Eluyente A: 60% de H<sub>2</sub>O/ 40% de ACN/ 0,14% de HFBA (agua 60%/ acetonitrilo 40%/ ácido heptafluorobutírico 0,14%)

20 Eluyente B: 20% de H<sub>2</sub>O/ 80% de ACN/ 0,14% de HFBA (agua 20%/ acetonitrilo 80%/ ácido heptafluorobutírico 0,14%)

Eluyente C: 20% de H<sub>2</sub>O/ 80% de ACN/ 0,1% de HFBA (agua 20%/ acetonitrilo 80%/ ácido heptafluorobutírico 0,1%)

La columna C4 RP-HPLC se equilibró con un 70% del eluyente A y un 30% del eluyente B, a una velocidad de flujo de 1ml/min durante al menos 15 minutos (hasta que se obtuvo una línea de base regular). Se inyectaron las muestras de 120 µl. La muestra para examinar se diluyó con acetato sódico 50 mM, pH 3,8, a una concentración que osciló entre 0,250 y 0,280 mg/ml.

25 Se utilizó el siguiente gradiente:

Tabla 30

Tiempo (min.)	% Eluyente A	% Eluyente B	% Eluyente C
0	70	30	0
8	70	30	0
61	62	38	0
66	0	100	0
71	0	0	100
72	70	30	0

30 El porcentaje de pureza de la muestra de IFN beta 1a a granel se calculó mediante el uso de las áreas integradas de los picos de proteínas.

**Especificación**

El área de pico principal de IFN beta 1a (correspondiente a la molécula intacta) no es menor a un 95% del área total de picos.

5 **f. Bioensayo de inhibición del efecto citopático - CPE****Biopotencia (Actividad antiviral)**

La actividad antiviral del IFN beta 1a a granel se midió mediante el bioensayo de inhibición del efecto citopático (CPE).

10 La actividad biológica se midió mediante un ensayo antiviral basado en la protección de células inducida por el IFN beta (WISH tejido amniótico de células amnióticas humanas) contra el efecto citopático de un virus (Virus de estomatitis vesicular).

El principio del bioensayo para el interferón radica en el hecho de que varios virus como el virus de estomatitis vesicular (VSV) causa la muerte celular que puede visualizarse mediante la tinción de efecto retardado.

El efecto citopático puede por tanto utilizarse para cuantificar la protección celular por interferón.

15 El ensayo se realizó mediante medición indirecta de la muerte celular, que se evaluó por las cantidades de tinte de sal de tetrazolio MTT (Dimetiltiotetrazolio) tomado de las células con vida. El procedimiento hace uso de la determinación espectrofotométrica automática del porcentaje de células protegidas y de un ensayo de rectas paralelas formadas por tres puntos para la evaluación estadística del valor.

**Procedimiento**

20 Este ensayo se realizó en placas de microtitulación.

a. Se agregaron además 50 µl de un medio de cultivo celular (MEM/5% FBS) a cada pocillo.

b. Se agregaron 100 µl de la muestra de IFN beta 1a o solución estándar (60-100 IU de h IFN beta/ml) a los pocillos y se realizaron tres etapas de diluciones 1:1,5 de fila a fila en las placas.

25 c. Se agregó una suspensión de 50 µl de células WISH ( $0,78-0,82 \times 10^6$  células/ml) a cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante 18-20 horas en una incubadora humedecida con CO<sub>2</sub> al 5%.

d. Se agregó una suspensión de VSV a cada pocillo excepto a los pocillos de control de células, llenados con MEM/2,5% FBS.

e. Las placas se incubaron durante 24 horas en una incubadora humedecida con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C.

f. Después de verificar mediante microscopio invertido que

30 (1) se alcanzó al menos un 80% de daño celular en la fila de control de VSV y

(2) el porcentaje de los valores medios de protección en la presencia de IFN beta estándar cayó en el intervalo del 84% para el estándar no diluido, 45% para la dilución 1:1 y 27% para la dilución 1:3 los cultivos se tiñeron con el tinte específico MTT.

g. La intensidad de la coloración se determinó mediante lectura espectrofotométrica a 592 nm.

35 h. Para cuantificar la actividad del IFN beta 1a, a continuación se analizaron las lecturas de OD mediante programa informático (Colombo Software).

**Especificación**

El IFN beta 1a contiene no menos de  $50 \times 10^6$  IU/ml.

40 **g. Mapeo de carbohidratos mediante espectrometría de masas por electropulverización - ES-MS**

La porción de carbohidratos de IFN beta 1a, unida por N al residuo Asn-80, se analizó mediante ES-MS de la molécula intacta mediante el uso de un espectrómetro de masas cuadrupolo.

**Procedimiento**

El procedimiento de prueba consiste en las siguientes etapas:

45 1) Desalar la muestra de IFN beta 1a a granel,

2) Análisis semicuantitativo de ES-MS de las especies de glicofomas intactas de IFN beta 1a mediante el uso de un espectrómetro de masas cuadrupolo

Las glicofomas intactas se identificaron en el espectro de ES-MS de conformidad con su peso molecular esperado (en el intervalo de 21-24 kDa, donde la cadena de proteínas MW es 20 kDa). Finalmente, las glicofomas se agruparon de conformidad con su nivel de sialilación (sin sialilar, monosialiladas, disialiladas, trisialiladas) y su % de abundancia relativa se determinó de conformidad con las alturas relativas de sus picos.

**Desalación de muestras**

Se desalaron aproximadamente 35 µg de las muestras de IFN beta 1a (muestra de control de IFN beta 1a y muestra de prueba a granel) mediante diálisis (dispositivo Microcon 10, Amicon o equivalente) contra acetoniitrilo/agua/ácido acético (40/60/1, p/p) a temperatura ambiente (aproximadamente 150 µg de IFN beta 1a/ml de concentración final).

55 **Análisis de ES-MS**

El análisis de ES-MS de ionización positiva se llevó a cabo sobre un espectrómetro de masas cuadrupolo simple con Plataforma de micromasa LCZ (o equivalente) mediante entrada de flujo directa de las muestras desaladas con bomba de infusión ajustada a 6-10 µl/min en una fuente de electropulverización.

60 El espectrómetro de masas se calibró con mioglobina en el intervalo m/z de 600-2400 Da y se ejecutó mediante el uso de los siguientes ajustes:

Voltaje capilar: 2,5-4,0 KV

Voltaje cónico: 36 V

Temperatura de fuente: 70-100 °C.

La adquisición de masa se llevó a cabo mediante escaneo de 600 Da a 2400 Da (para detectar la mioglobina) y 1100 a 2400 Da (para IFN beta 1a) a una velocidad de escaneo típica de aproximadamente 10 sec./ escaneo. El procesamiento de espectro de masas y la desconvolución de iones de múltiples cargas se realizó mediante el uso del software Mass Lynx (o equivalente).

#### 5 Interpretación de los resultados de ES-MS

Un espectro de ES-MS desconvolucionado representativo muestra que los picos de MS (calificados de A a F) representan distintas glicofomas que pueden reunirse en 4 grandes grupos de glicofomas de conformidad con su grado de sialilación como se muestra en la tabla 34 a continuación.

10 **Tabla 31 - Glicofomas observadas en el espectro de ES-MS de IFN beta 1a**

Pico MS	Glicofoma*	MW esperado (Da)	Nivel de sialización
F	2A0S1F	21793	sin sialilar
B	2A1S1F	22084	Monosialiladas
A	2A2S1F	22375	Disialiladas
C	3A2S1F y/o 2A2S1F + 1 HexNa-cHex repetido	22739	Disialiladas
D	3A3S1F	23031	Trisialiladas
E	4A3S1F y / o 3A3S1F + 1 Hex-NaHex repetido	23400	Trisialiladas

\*2A = oligosacáridos de tipo biantenarico complejo; 3A = oligosacáridos de tipo triantenarico complejo; 4A = oligosacáridos de tipo cuadrantenarico complejo; 0S = sin sialilar; 2S = disialiladas, 3S = trisialiladas, 1F = fucosiladas.

La evaluación semi-cuantitativa de cada una de las 4 glicofomas principales se llevó a cabo de la siguiente forma:

- % de glicofomas sin sialilar: Altura del pico/ Alturas totales de pico x100
- % de glicofomas monosialiladas: Altura del pico/ Alturas totales de pico x100
- % de glicofomas disialiladas: Alturas de picos (A+C)/Alturas totales de picos x100
- % de glicofomas trisialiladas: Alturas de picos (D+E)/ Alturas totales de picos x100 donde la altura total del pico es la suma de las alturas de los picos de A a F.

20 Nótese que el pico de MS sin rotular a aproximadamente 22244 Da (Figura SPA-1), correspondiente al extremo N truncado (2-166 aa) 2A2S1F IFN beta 1a que carece de una metionina terminal, no se toma en consideración para el cálculo de las glicofomas disialiladas de IFN beta 1a, los niveles de esta impureza se controlan mediante una prueba de liberación a granel separada (truncación del extremo N, N-1: NMT 6%).

#### Especificación

El espectro se ajusta al perfil de IFN beta 1a esperado (% de altura de picos):

- 25 glicofomas sin sialilar: No más de un 5%
- Glicofomas monosialiladas: 6-30%
- Glicofomas disialiladas: 56-81%
- Glicofomas trisialiladas: 8-16%

#### 30 h. Enfoque isoeléctrico - IEF

Las isoformas de IFN beta 1a se separaron mediante enfoque isoeléctrico y se visualizaron mediante tinción azul de Coomassie. El pl de las isoformas a continuación se comparó con el del PRB. El pl y el área de glicofomas se midieron mediante densitometría.

#### 35 Procedimiento

##### Preparación de muestras:

Las muestras de IFN beta 1a se concentraron a 0,7-1,0 mg/ml mediante el uso de una unidad microconcentradora de centrifugación.

##### Preparación de gel y enfoque isoeléctrico:

40 Se preparó un gel de acrilamida al 5% para IEF (isoelectroenfoco) y se lavó después del moldeado para extraer toda la acrilamida sin polimerizar. El gel se reconstituyó con anfólitos (2% final, intervalo de pH 3-10), ácido glutámico 10 mM, lisina 10 mM y glicerol al 3%, se colocó en un aparato de electroforesis y se enfrió a 15 °C.

El gel se pre-enfocó durante 60 minutos a una potencia de 1 W bajo un flujo de nitrógeno en la presencia de una trampa de dióxido de carbono (0,1 NaOH).

45 A continuación, aproximadamente 3,5 µg del IFN beta 1a a granel, 6 µg de citocromo c y estándares de pl adecuados se aplicaron como gotas (5 µl) sobre la superficie del gel.

El gel de IEF se enfocó a 101 °C a 8000 V-hora.

El gel se fijó en un 20% (p/v) de TCA durante 30-35 minutos, a continuación se tiñó con azul de Coomassie mediante el uso del procedimiento coloidal de Neuhoff et al. (*Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250, Electrophoresis, 1988:9:255-262*).

La cuantificación y la determinación de pI de las isoformas de IFN beta 1a se realizó mediante el uso de un densitómetro automático (Densitómetro informático, dinámica molecular, E.U.A. proporcionado con el programa Image-Quant 3.3 y otros software necesarios para la integración/ cálculo de los resultados; o equipo equivalente).

## 10 Especificación

El electroforetograma obtenido con la muestra de prueba es similar al obtenido con el estándar propio del laboratorio:

1. El electroforetograma obtenido consiste en tres grupos principales de bandas, que contienen un total de 5 a 10 bandas (con excepción de la banda en el punto de carga) y se ajusta al patrón de bandas obtenido con el estándar de referencia.

2. Las cinco bandas principales, probadas por densitometría, deben caer dentro de los límites de grupos mostrados en la tabla 32

**Tabla 32 - enfoque eléctrico, especificación de las isoformas**

Nº de grupo	pI	% del área total
1	8,8 - 9,2	8 - 27
2	8,4 - 8,7	47 - 72
3	7,7 - 8,1	11 - 34

## REFERENCIAS

1. Derynk R. et al., Nature 1980; 285, 542-547.

2. Familletti, P. C., Rubinstein, S., and Pestka, S. 1981 "A Convenient and Rapid Cytopathic Effect Inhibition Assay for Interferon," in Methods in Enzymology, Vol. 78 (S. Pestka, ed.), Academic Press, New York, 387-394;

3. Mark D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81 (18) 5662-5666 (1984).

4. Pestka, S. (1986) "Interferon Standards and General Abbreviations, in Methods in Enzymology (S. Pestka, ed.), Academic Press, New York 119, 14-23.

5. Rubinstein, S., Familletti, P. C., and Pestka, S. Convenient Assay for Interferons. J. Virol 1981; 37, 755-758.

6. Shepard H. M. et al., Nature 1981; 294, 563-565.

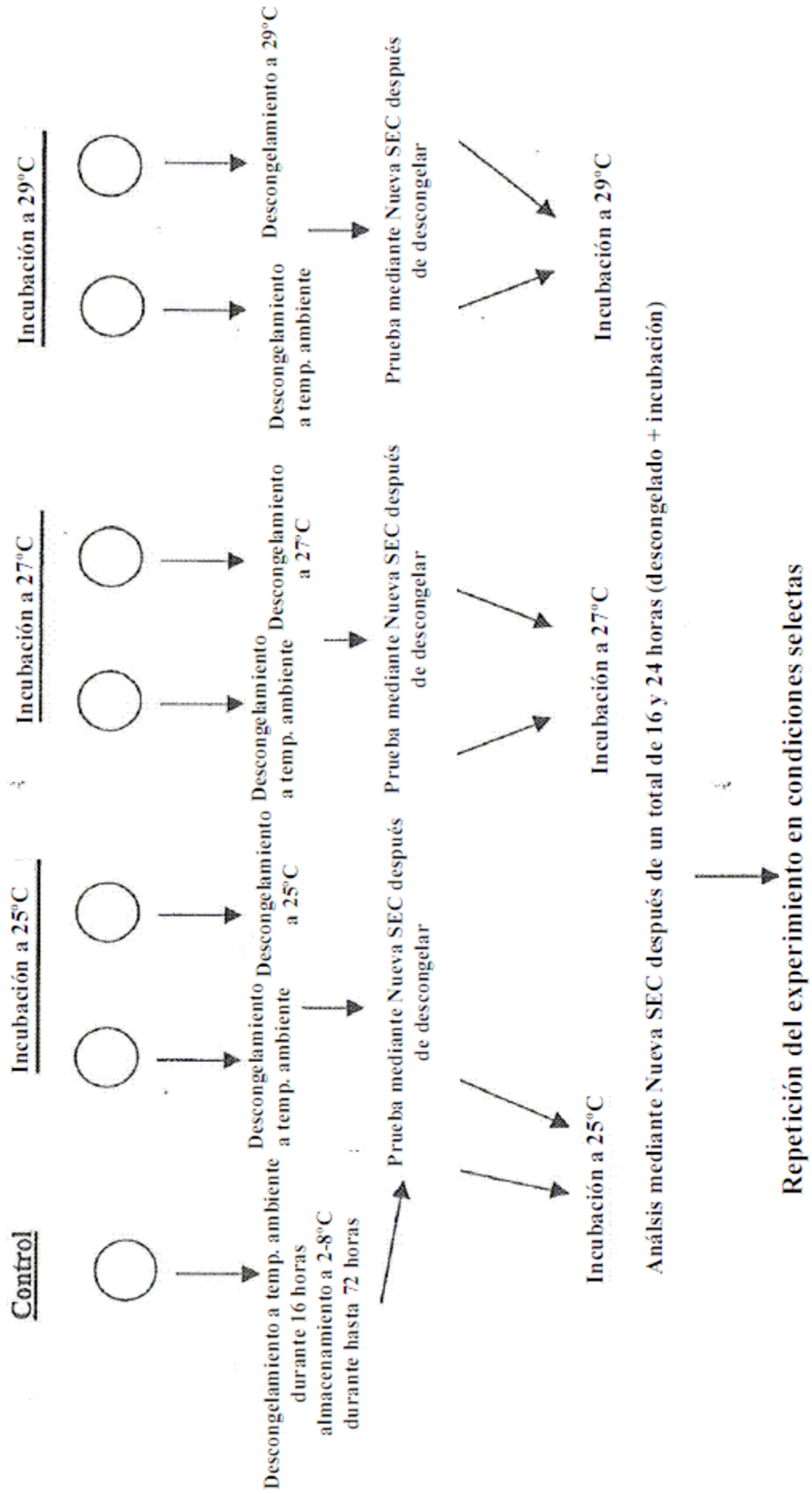
## REIVINDICACIONES

- 5 1) Un método para preparar una solución a granel estable de una proteína monomérica, donde la proteína es interferón, comprendiendo dicho método las etapas de:
- a) proporcionar un volumen de proteína monomérica en una solución reguladora, y
- b) agregar un excipiente a dicho volumen, donde dicho excipiente se selecciona del grupo que consiste en:
- 10 i) un agente bacteriostático,
- ii) un tensioactivo,
- iii) un agente de isotonicidad,
- iv) un aminoácido,
- v) un antioxidante,
- 15 vi) un agente de isotonicidad y un antioxidante,
- vii) un agente de isotonicidad, un antioxidante y un aminoácido,
- viii) un aminoácido y un antioxidante,
- ix) un aminoácido, un antioxidante y un tensioactivo,
- x) un agente bacteriostático y un antioxidante, y
- 20 xi) un agente bacteriostático, un antioxidante y un tensioactivo y que comprende además una etapa de incubación de dicha proteína a granel a una temperatura comprendida en el intervalo de 27°C a 31°C durante 3 a 40 horas.
- 2) El método de la reivindicación 1, en el que el interferón es IFN beta.
- 25 3) El método de la reivindicación 1, en el que el interferón IFN beta es interferón IFN beta recombinante humano.
- 4) El método de la reivindicación 1, en el que el agente bacteriostático es alcohol bencílico.
- 30 5) El método de la reivindicación 1, en el que el tensioactivo es Tween 20.
- 6) El método de la reivindicación 1, en el que el agente de isotonicidad es manitol.
- 7) El método de la reivindicación 1, en el que el aminoácido es lisina o arginina.
- 35 8) El método de la reivindicación 1, en el que el antioxidante es metionina.
- 9) El método de la reivindicación 1, en el que el agente de isotonicidad es manitol y el antioxidante es metionina.
- 40 10) El método de la reivindicación 1, en el que el agente de isotonicidad es manitol, el antioxidante es metionina y el aminoácido es lisina.
- 11) El método de la reivindicación 1, en el que el aminoácido es lisina y el antioxidante es metionina.
- 45 12) El método de la reivindicación 1, en el que el aminoácido es lisina, el antioxidante es metionina y el tensioactivo es Tween 20.
- 13) El método de la reivindicación 1, en el que el agente bacteriostático es alcohol bencílico y el antioxidante es metionina.
- 50 14) El método de la reivindicación 1, en el que el agente bacteriostático es alcohol bencílico, el antioxidante es metionina y el tensioactivo es Tween 20.
- 15) El método de la reivindicación 1, en el que dicha incubación se lleva a cabo antes o después de la etapa de pre-formulación de la reivindicación 1.
- 55 16) El método de la reivindicación 1, en el que dicha incubación se lleva a cabo durante 10, 16, 18,5 o 24 horas.
- 17) El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho IFN se mantiene a un intervalo de pH de 3,0 a 6,0.
- 60 18) El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho IFN se encuentra presente a una concentración de 10 µg/ml a 2000 µg/ml.

- 19) El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha solución reguladora se encuentra a una concentración de 5mM a 500mM.
- 5 20) El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente de isotonicidad se encuentra presente a una concentración de 0,5 mg/ml a 500 mg/ml.
- 21) El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente de isotonicidad se encuentra presente a una concentración de 55mg/ml o 150mM o 300mM o 600mM.
- 10 22) El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho Tween 20 se encuentra presente a una concentración de 0,01 mg/ml a 10 mg/ml.
- 23) El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho antioxidante se encuentra presente a una concentración de 0,01 mg/ml a 5,0 mg/ml.
- 15 24) El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho aminoácido se encuentra presente a una concentración de 20mg/ml a 200 mg/ml.
- 20 25) El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha lisina se encuentra presente a una concentración de 27 mg/ml o 55 mg/ml o 82 mg/ml o 164 mg/ml.
- 26) El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha arginina se encuentra presente a una concentración de 32 mg/ml o 63 mg/ml.
- 25 27) El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente bacterioestático se encuentra presente a una concentración de 0,01 mg/ml a 200 mg/ml.
- 30 28) Un método para aumentar y/o mantener la estabilidad de una proteína monomérica, donde la proteína es interferón, que comprende el método de pre-formulación del volumen de dicha proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27.



FIGURA 1 - Procedimiento a escala de laboratorio pequeño



Resultados SE-HPLC de muestras de 0,9ml de volumen después de 4f/T

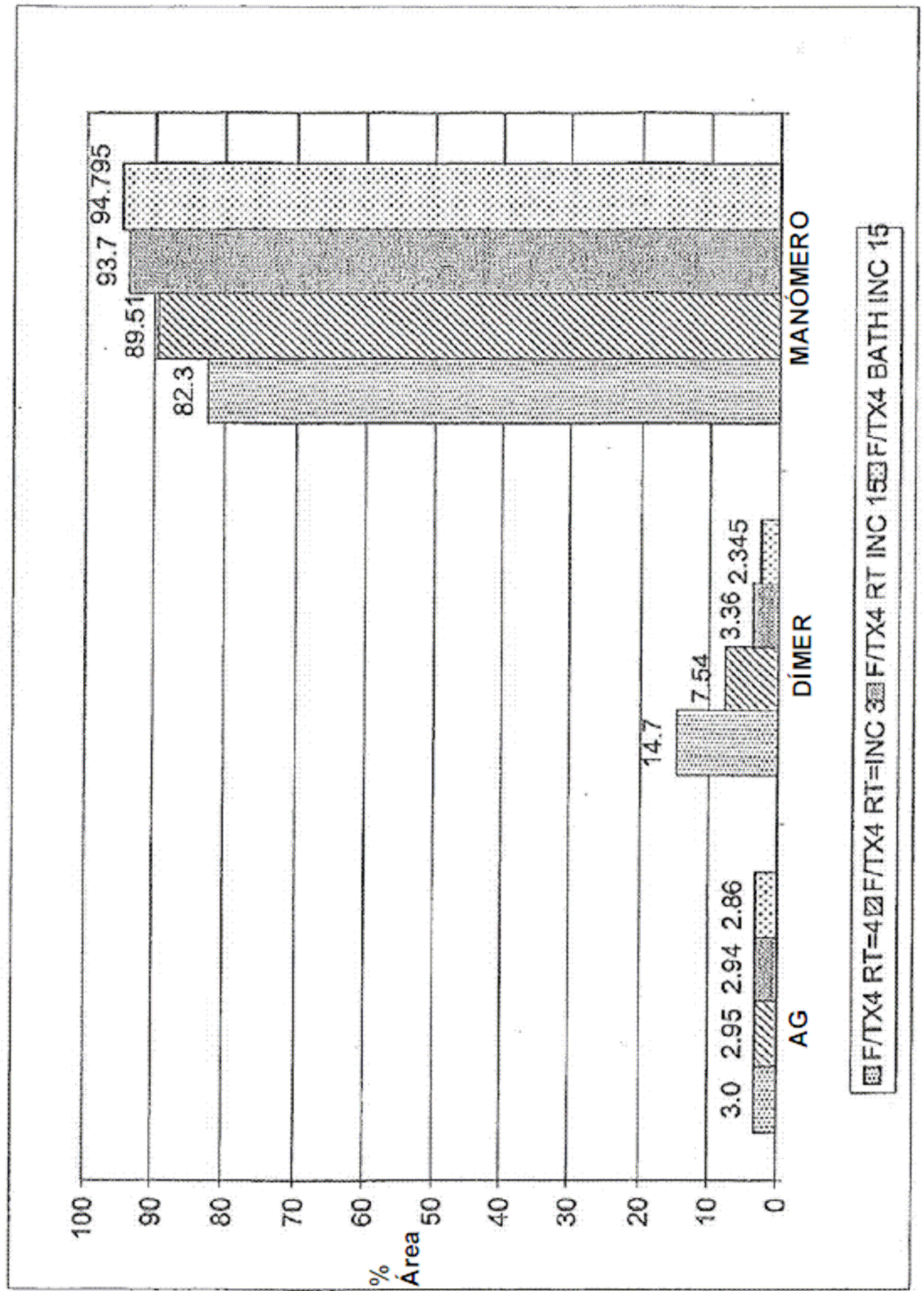


Figura 3 - Resultados SE-HPLC de muestras de 200ml de volumen después de 2F/T

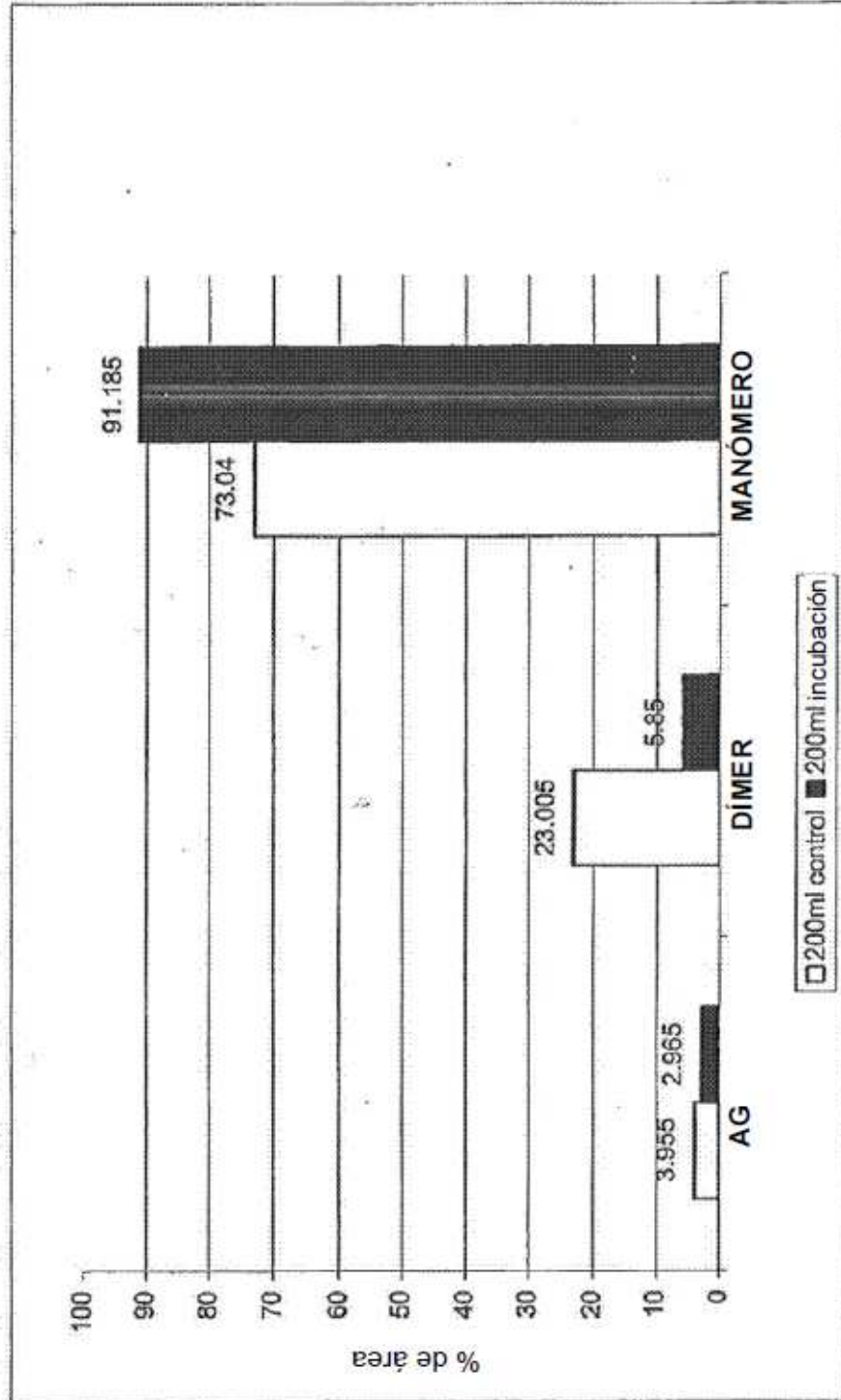


Figura 4 - Cinética de disociación térmica en escala de laboratorio F/TX1. Porcentaje de monómeros en el curso del tiempo.

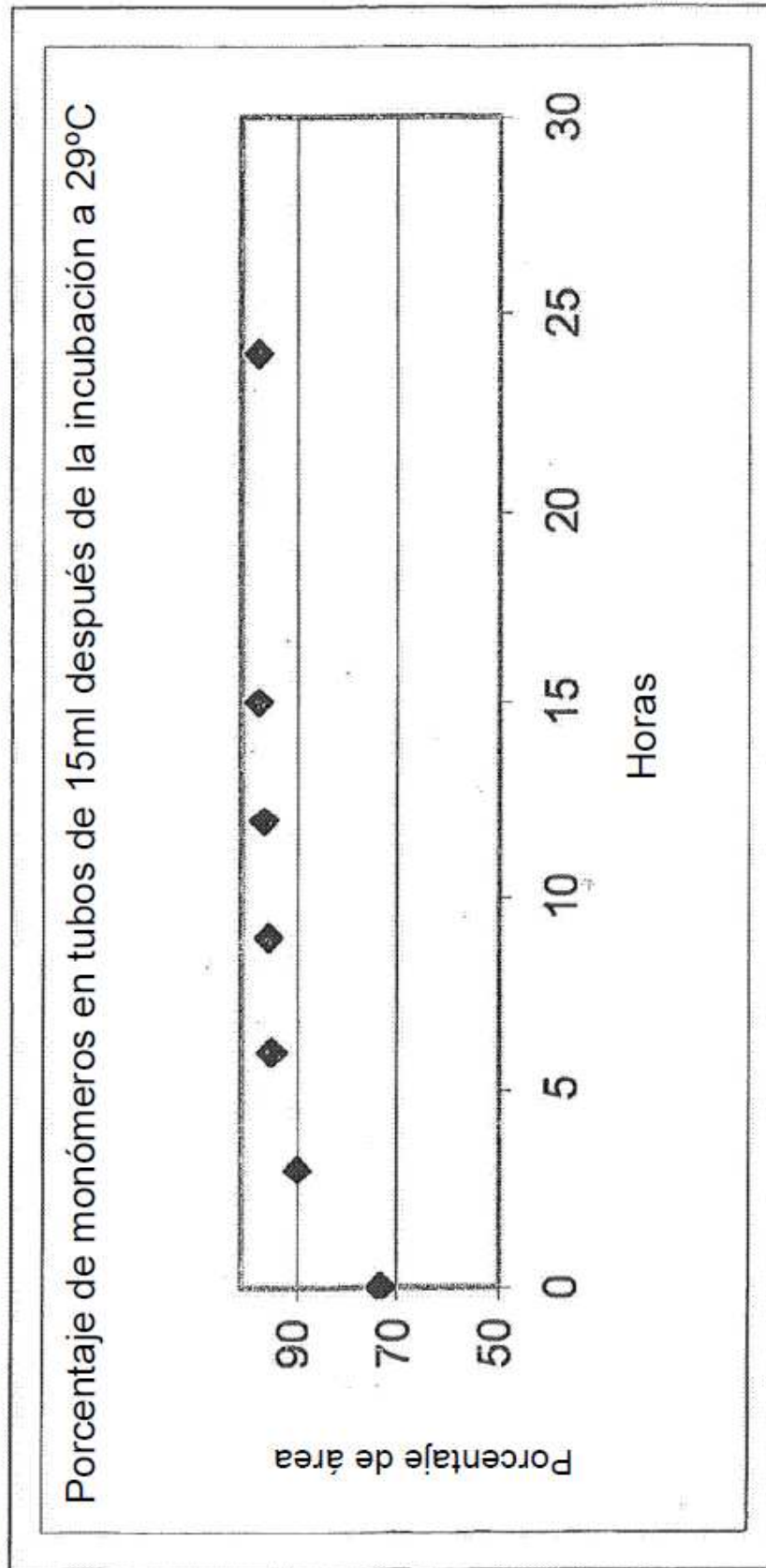


Figura 5 - Cinética de disociación térmica en escala de laboratorio F/TX1. Porcentaje de dímeros en el curso del tiempo.

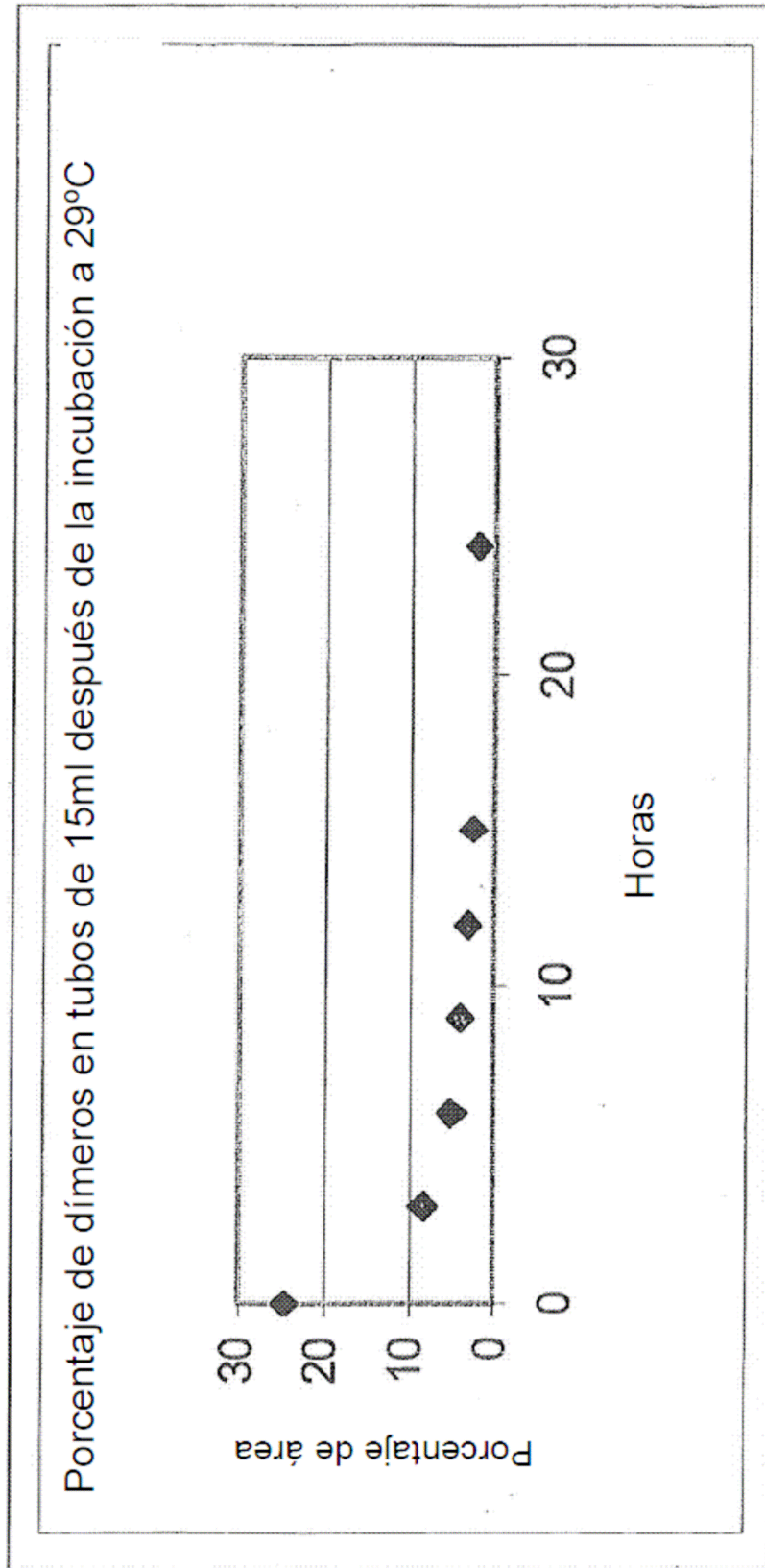


Figura 6 - Cinética de disociación térmica en escala de laboratorio FTX1. Porcentaje de agregados en el curso del tiempo.

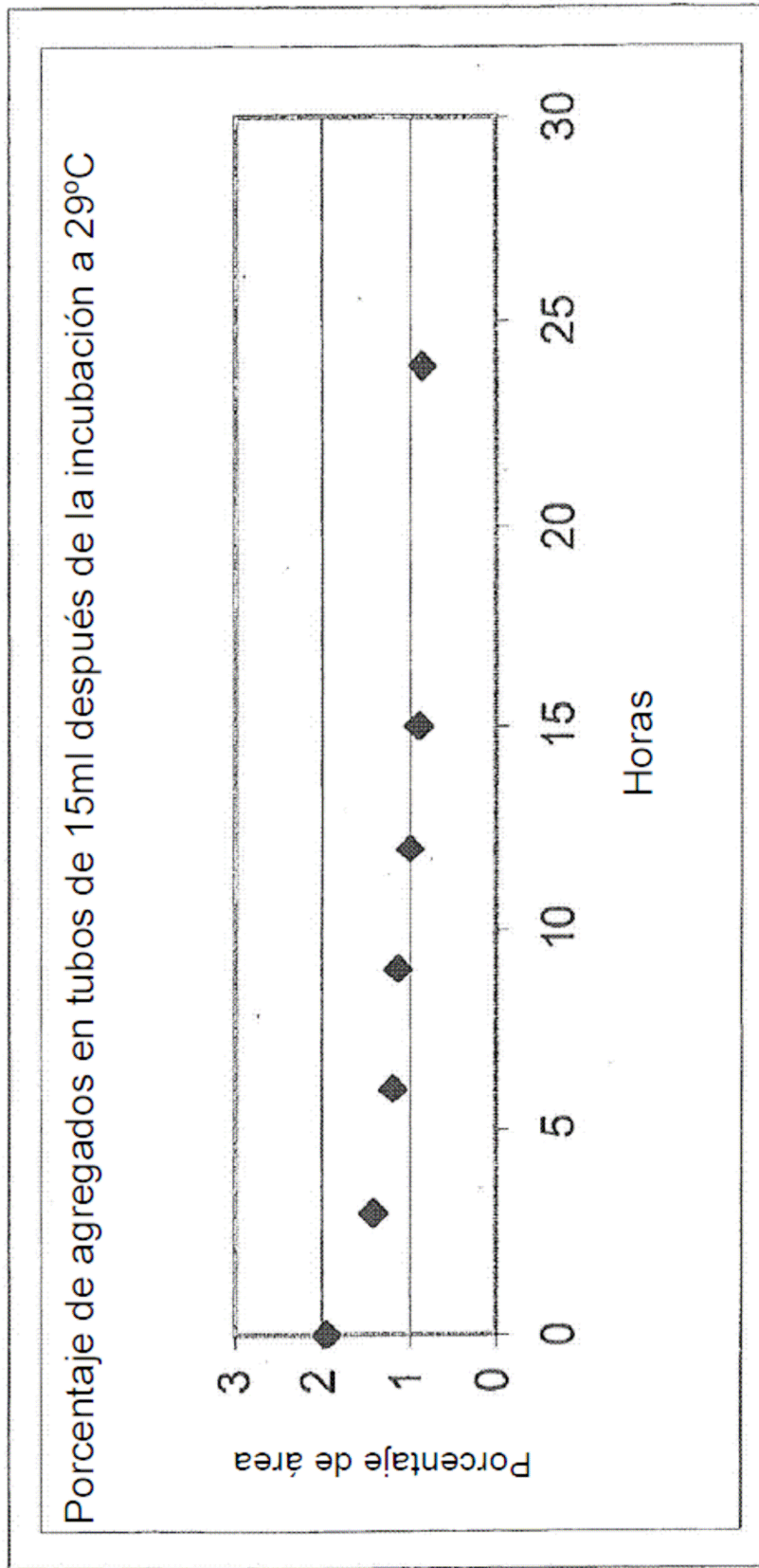
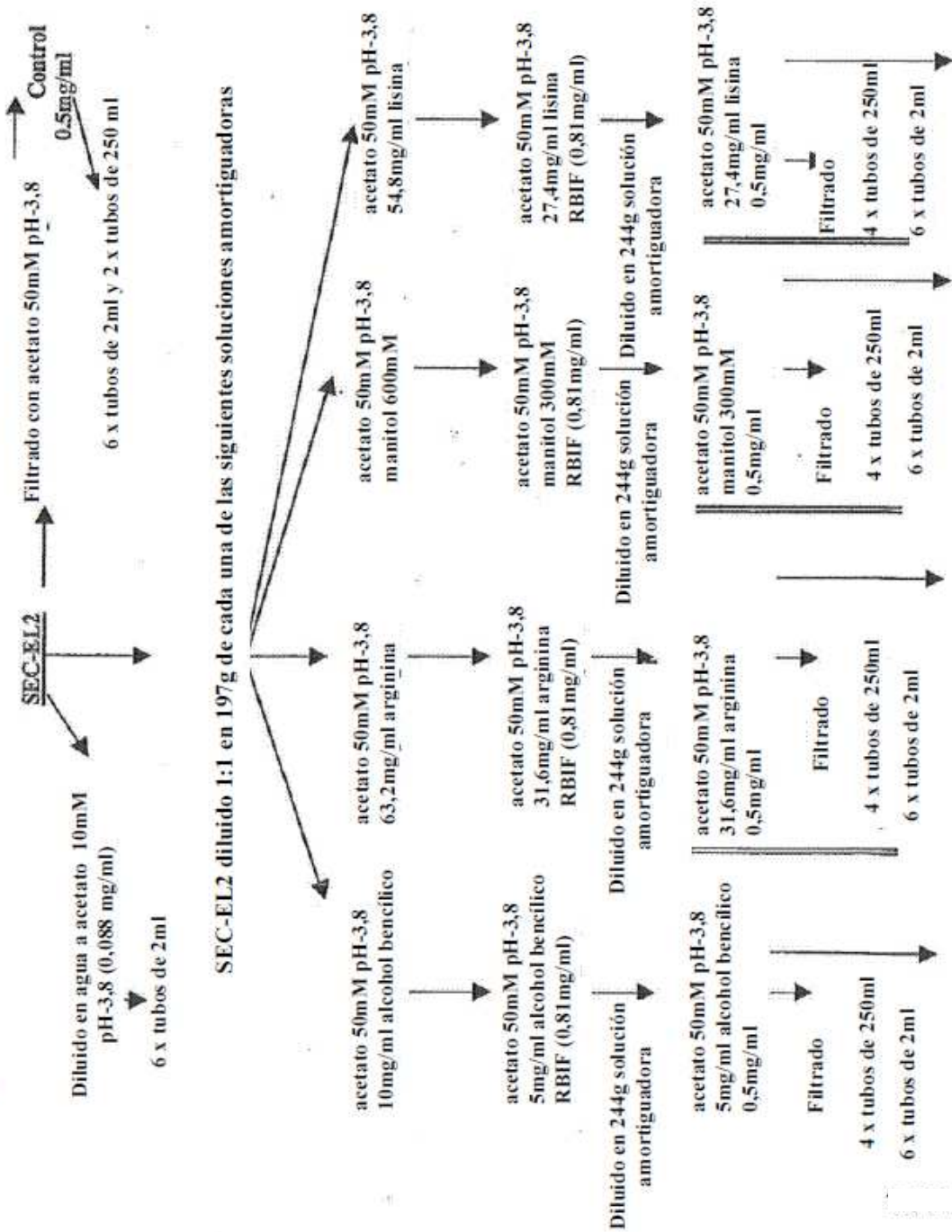


Figura 7 - Esquema de estudio de preformulación para el ejemplo 2



0,2ml de las siguientes soluciones amortiguadoras se diluyeron 1:100 en 19,8ml de las correspondientes soluciones RBIF

acetato 50mM pH-3,8 5mg/ml alcohol bencílico 12mg/ml metionina	acetato 50mM pH-3,8 31,6mg/ml arginina 12mg/ml metionina	acetato 50mM pH-3,8 manitol 300mM 12mg/ml metionina	acetato 50mM pH-3,8 27,4mg/ml lisina 12mg/ml metionina
acetato 50mM pH-3,8 5mg/ml alcohol bencílico 12mg/ml metionina 50mg/ml plurónico	acetato 50mM pH-3,8 31,6mg/ml arginina 12mg/ml metionina 50mg/ml plurónico	acetato 50mM pH-3,8 manitol 300mM 12mg/ml metionina 50mg/ml plurónico	acetato 50mM pH-3,8 27,4mg/ml lisina 12mg/ml metionina 50mg/ml plurónico
acetato 50mM pH-3,8 5mg/ml alcohol bencílico 12mg/ml metionina 5mg/ml Tween	acetato 50mM pH-3,8 31,6mg/ml arginina 12mg/ml metionina 5mg/ml Tween	acetato 50mM pH-3,8 manitol 300mM 12mg/ml metionina 5mg/ml Tween	acetato 50mM pH-3,8 27,4mg/ml lisina 12mg/ml metionina 5mg/ml Tween

Filtrado

Se trasfirió a tubos de 2ml y se almacenó a 2-8°C, a -20°C y a -70°C



Figura 8 - Esquema de estudio de preformulación para el ejemplo 3

