

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 236**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08863833 .3**
96 Fecha de presentación: **18.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2234645**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2010**

54 Título: **Formulaciones de interferón beta pegilado**

30 Prioridad:
20.12.2007 EP 07150258
07.01.2008 US 10258

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.09.2012

73 Titular/es:
MERCK SERONO S.A.
CENTRE INDUSTRIEL
1267 COINSINS, CH

72 Inventor/es:
DEL RIO, Alessandra y
RICHARD, Joel

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 387 236 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de interferón beta pegilado

Campo de la invención.

La presente invención se refiere a formulaciones de interferón beta pegilado (PEG-IFN-β).

5 Fundamento de la invención.

El interferón-β es una proteína y se ha identificado como medicamento útil actualmente aplicado, p. ej., para el tratamiento de la esclerosis múltiple (MS).

10 Las proteínas pueden ser modificadas, bien sea en su secuencia o bien por medio de otras modificaciones con el fin de alterar o mejorar, p. ej., su actividad o su estabilidad. Una de estas modificaciones es la introducción de una unión con polímeros como el polietilenglicol (PEG).

El interferón β unido a polietilenglicol (PEG-IFN β) se ha descrito por ejemplo, en los documentos WO99/55377 y EP 0 593 868 A1.

15 En el campo de la medicina, se han hecho diversos planteamientos para estabilizar las proteínas mediante liofilización o en forma de composición farmacéutica líquida. Los materiales liofilizados han de ser reconstituidos en forma de una solución antes de su uso. Más cómodas, y por lo tanto de un interés particular, son las composiciones farmacéuticas líquidas concentradas o listas para utilizar, que no necesitan ninguna otra preparación adicional para su aplicación al paciente.

Las formulaciones farmacéuticas líquidas de interferón β se describen por ejemplo en los documentos WO 95/31213 y WO 2004/096263.

20 El documento WO 2005/084303 describe composiciones de conjugado de polímero - interferón beta 1b.

La patente de EE.UU. nº 6.531.122 se refiere a variantes de interferón pegilado en una formulación con excipientes, agentes solubilizantes y un tampón.

El documento WO 2004/060299 proporciona métodos para la síntesis de conjugados de polímeros de citocinas incluyendo el interferón beta y los antagonistas de unión con los receptores de los mismos.

25 El documento US 20060051320 A1 se refiere a formulaciones liofilizadas de interferón pegilado preparadas usando trehalosa como crioprotector.

El documento WO 99/48535 proporciona formulaciones que previenen la pérdida y el daño de conjugados de PEG-interferón alfa durante la liofilización y después de la misma.

30 El documento WO 03002152 se refiere en particular a composiciones estabilizadas que comprenden un polipéptido de interferón y un derivado de ciclodextrina de sulfoalquil éter.

Ninguna de las referencias anteriores describe ni sugiere las formulaciones líquidas de acuerdo con la invención.

Sumario de la invención

35 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica líquida que comprende un interferón beta pegilado (PEG-IFN-β), un excipiente, un agente tensioactivo y un tampón, en el que dicho excipiente es un poliol, en donde el agente tensioactivo es un poloxámero 188, en donde tampón es un tampón de acetato sódico, y en donde el pH de la composición farmacéutica es $4,2 \pm 0,2$.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar una composición farmacéutica líquida, en donde dicho método comprende añadir una cantidad calculada de excipiente y agente tensioactivo a la solución tamponada y después añadir el PEG-IFN-β de acuerdo con la presente reivindicación 18ª.

40 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un recipiente cerrado herméticamente, en condiciones estériles y apropiadas para el almacenamiento antes de su uso, que comprende la formulación farmacéutica líquida de acuerdo con la invención.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un *kit* de una composición farmacéutica, en la que el *kit* comprende un recipiente lleno con una composición farmacéutica según la invención.

45 Breve descripción de las tablas y de la figura.

Formulaciones de acuerdo con la invención que contienen 0,044 mg/ml de PEG-IFN beta.

La Tabla 1 ilustra diversas formulaciones de acuerdo con la invención, que contienen 0,044 mg/ml de PEG-IFN-beta.

La Tabla 2 describe una prueba de estabilidad (SE-HPLC) a 40 °C, 25 °C y 2 - 8 °C, respectivamente, de las formulaciones de acuerdo con la invención, con un pH de 4,2, a lo largo del tiempo.

5 La Tabla 3 describe una prueba de estabilidad (RP-HPLC) a 40 °C, 25 °C y 2 - 8 °C, respectivamente, de las formulaciones de acuerdo con la invención, con un pH de 4,2, a lo largo del tiempo

La Tabla 4 ilustra los títulos (mcg/mL) de las formulaciones de acuerdo con la invención, por SE-HPLC.

La Tabla 5 ilustra los títulos (mcg/mL) de las formulaciones de acuerdo con la invención por SE-HPLC, antes y después de la filtración, con el % de recuperación y una representación en forma de gráfico (Figura 1: % de recuperación mostrado como recuperación de AF y TO en %).

10 La Tabla 6 muestra los valores del pH de las formulaciones de acuerdo con la invención a lo largo de 4 a 26 semanas a 25 °C y 2 - 8 °C, respectivamente.

La Tabla 7 representa los resultados del bioensayo de formulaciones de acuerdo con la invención a lo largo del tiempo.

15 II. Formulaciones de acuerdo con la invención que contienen 0,055 y 0,110 mg/ml de PEG-IFN beta, respectivamente:

En estas formulaciones la cantidad de PEG-IFN-beta se ha aumentado a 0,055 y 0,110 mg/ml de PEG-IFN beta 1a, respectivamente.

La Tabla 8 ilustra una prueba SE-HPLC que mide la pureza a 40 °C, 25 °C y 8,2 °C, respectivamente, de las formulaciones de acuerdo con la invención con un pH de 4,2, a lo largo del tiempo.

20 La Tabla 9 ilustra una prueba de SE-HPLC que mide el contenido de proteína a 40 °C, 25 °C y 2 - 8 °C, respectivamente, de las formulaciones de acuerdo con la invención con un pH de 4,2, a lo largo del tiempo.

La Tabla 10 ilustra una prueba de RP-HPLC que mide la pureza a 40 °C, 25 °C y 2 - 8 °C, respectivamente, de las formulaciones de acuerdo con la invención con un pH de 4,2, a lo largo del tiempo.

25 La Tabla 11 muestra los valores del pH de las formulaciones de acuerdo con la invención a lo largo de 4 a 13 semanas a 25 °C y 2 - 8 °C, respectivamente, a lo largo del tiempo.

La Tabla 12 muestra los datos de bioensayos de formulaciones de acuerdo con la invención a 25 °C y 2 - 8 °C, respectivamente, a lo largo del tiempo.

La Tabla 13 ilustra los datos relacionados con las formas oxidadas por mapeo de péptidos de PEG-IFN-beta de las formulaciones de acuerdo con la invención.

30 Descripción detallada de la invención.

En un aspecto la invención se refiere a una composición farmacéutica líquida que comprende un PEG-IFN β, un excipiente, un agente tensioactivo y un tampón, en el que dicho excipiente es un poliol, en el que dicho agente tensioactivo es un poloxámero 188, en el que dicho tampón es un tampón de acetato sódico, y en el que el pH de la composición farmacéutica es $4,2 \pm 0,2$.

35 Los párrafos que siguen proporcionan definiciones de los diversos compuestos que constituyen la formulación de acuerdo con la invención, y se entiende que son válidos de manera uniforme a lo largo de la memoria y las reivindicaciones, a menos que una definición expresamente establecida proporcione una definición más amplia.

40 El interferón beta pegilado de la formulación puede ser cualquier interferón beta que lleve como modificación covalente un polietilen glicol o una modificación comparable a esta. Un ejemplo de PEG-interferón beta es un PEG-interferón beta en el que la pegilación puede ser llevada a cabo por métodos conocidos, tales como los descritos en el documento WO 99/55377.

En particular, de acuerdo con la invención, el IFN beta tiene unido covalentemente el polímero hidrófilo polietilenglicol (PEG), también conocido como poli(óxido de etileno) (PEO). El PEG puede ser un polímero lineal que tiene grupos hidroxilo en cada terminal:

45 $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

También puede ser usado como metoxi-PEG-OH (m-PEG), en el que un terminal es el grupo metoxi relativamente inerte, mientras que el otro terminal es un grupo hidroxilo que es sometido a la modificación química:

$\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

En lo anterior n puede ser de 1 a varios centenares.

En otra realización preferida el PEG puede ser también un PEG ramificado representado por R (PEG-OH)_m en donde R representa un resto núcleo central tal como pentaeritriol o glicerol, y m representa el número de brazos de ramificación. Los brazos de ramificación (m) pueden variar entre tres y cien o varios centenares. Los grupos hidroxilo están sujetos a modificaciones químicas.

Otra forma de ramificación de acuerdo con la invención se describe, p. ej., en el documento WO 96/21469 en el que el PEG tiene un terminal único que está sujeto a modificación química. Este tipo de PEG se puede representar como (CH₃OPEG)pRX en donde p es igual a 2 ó 3, R representa un núcleo central tal como lisina o glicerol, y X representa un grupo funcional tal como carboxilo, que está sujeto a activación química.

Otra forma de ramificación de acuerdo con la invención se denomina "PEG colgante" y tiene grupos reactivos, tales como el grupo carboxilo, a lo largo de la columna vertebral de PEG en vez de al final de las cadenas de PEG.

Además es posible preparar el PEG-IFN beta de acuerdo con la invención con enlaces débiles o degradables en la columna vertebral, como se describe p. ej. en la solicitud de patente de EE.UU. 06/026.716. En consecuencia, el PEG se puede preparar con enlaces éster en la columna vertebral polímera que se somete a hidrólisis. La hidrólisis tiene por resultado en escisión del polímero en fragmentos de peso molecular más bajo, de acuerdo con el esquema de reacción:



Los copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno están estrechamente relacionados con PEG en su composición química y de acuerdo con la invención se pueden utilizar en vez de PEG.

Se han desarrollado diversos métodos para obtener proteínas pegiladas. El PEG se puede unir a grupos reactivos que se encuentran en la proteína que utilizan normalmente derivados de PEG activados electrofílicamente. Se pueden usar los grupos α- o ε-amino que se encuentran en los restos de lisina y el terminal N dando lugar a un conjugado que consiste en una mezcla de productos.

Los conjugados consisten preferentemente en una población de una o varias moléculas de PEG unidas, por molécula de proteína en el intervalo de uno al número de aminoácidos en la proteína.

Es preferible introducir la pegilación dirigida a un sitio en el IFN beta como, p. ej., se describe en Woghiren et al. en Bioconjugate Chem., 4 (5): 314 - 318, 1993, sintetizando un derivado PEG selectivo para tiol.

El IFN en una realización es pegilado específicamente. Una pegilación específica puede ser llevada a cabo de acuerdo con el documento EP 675 201 en el resto N-terminal con, p. ej., mPEG-propionaldehído. Se prefiere de un modo particular una mono-pegilación específica del sitio, según se describe en Woghiren et al, Bioconjugate Chem, 4 (5): 314 - 318, 1993.

Una realización de acuerdo con la invención es un IFN beta que lleva una mono-pegilación unida covalentemente a Cys¹⁷ como se describe en el documento WO 99/55377. El resto de PEG puede ser lineal o ramificado, metoxi PEG, PEG degradable hidrolíticamente o enzimáticamente y uno o más polioles y copolímeros de PEG y PLGA (poli(ácido láctico/ácido glicólico)).

El grupo tiol de cisteína de acuerdo con una realización de la invención se puede hacer reaccionar con un agente de pegilación que reacciona con tiol. Puede ser un PEG que contiene un grupo funcional, tal como el disulfuro de ortopiridilo, vinilsulfona, maleimida, yodoacetimida. Preferentemente el agente de pegilación reactivo con tiol es el derivado de disulfuro de ortopiridilo (OPSS) de PEG. El agente de pegilación se utiliza en su forma mono-metilada en la que sólo un terminal está disponible para conjugación, o en forma bifuncional en la que ambos terminales están disponibles para la conjugación.

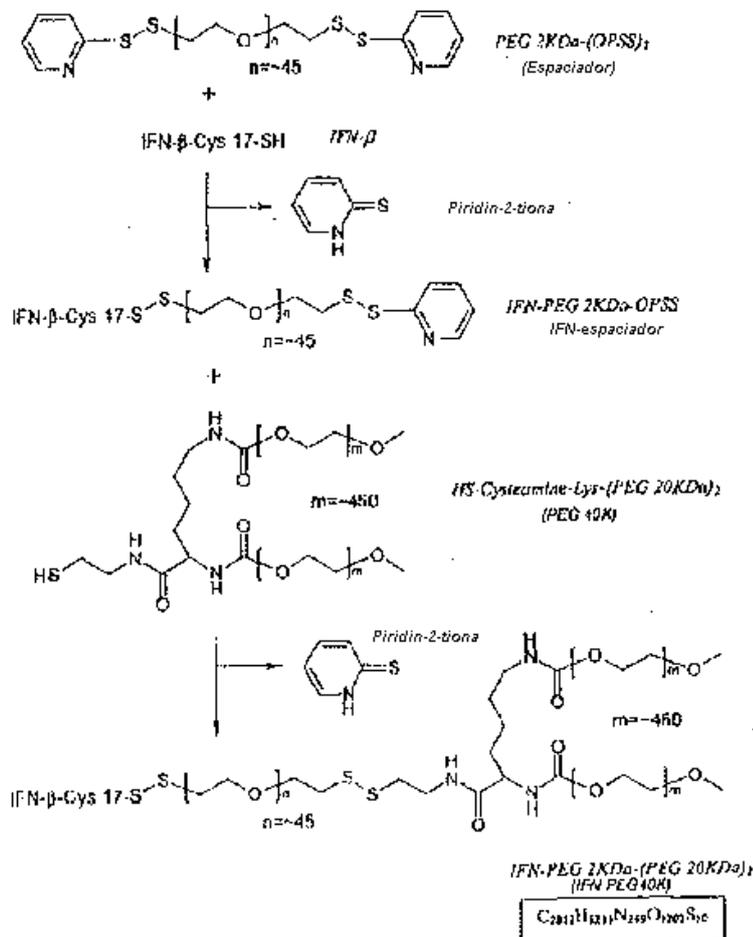
En una realización de la reacción preferida, se utiliza un IFN β-Cys¹⁷ y reacciona de acuerdo con el esquema de reacción como el que se describe en esta solicitud. Esta reacción es específica del sitio para Cys¹⁷ porque los otros dos restos de cisteína en el IFN β (posiciones 31 y 141) forman un puente disulfuro y por tanto no están accesibles para la pegilación. El PEG-IFN β tiene un tamaño efectivo equivalente al de una proteína con un peso molecular de 50 a 110 kDa, preferentemente aproximadamente 70 kDa. En la modificación de IFN β específica del sitio la molécula de PEG unida tiene preferiblemente un peso molecular mayor que 20 kDa. En una realización, la molécula de PEG unida a la Cys¹⁷ tiene 2 x 20 kDa unidos por medio de un espaciador.

El espaciador y el IFN forman un IFN -PEG un 2 kDa - OPSS de acuerdo con el esquema de síntesis que se indica a continuación.

Después de la pegilación la solución se purifica con el fin de separar el PEG-IFN β del espaciador libre y/o PEG. Preferentemente esta etapa de purificación se realiza mediante ultrafiltración. La ultrafiltración se realiza a una temperatura menor que 10 °C, preferentemente de 5 +/-3 °C, más preferentemente a 4 °C en condiciones básicas. En la

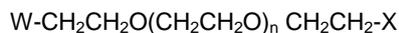
etapa de purificación se utiliza preferentemente NaOH 0,1 M. La solución de PEG-IFN β resultante contiene menos de 0,5 UE/ml de endotoxinas, preferentemente menos de 0,25 UE/ml de endotoxinas.

En una realización la pegilación se introduce en el IFN β de acuerdo con el siguiente esquema:



- 5 En una realización, un resto de PEG de bajo peso molecular puede unirse al IFN-β.

Un resto de PEG de bajo peso molecular tiene la fórmula:



- 10 en la que W y X son grupos que reaccionan independientemente con una amina, un grupo funcional sulfhidrilo, carboxilo o hidroxilo, para unir el resto de PEG de bajo molecular al IFN β. Preferentemente W y X se seleccionan independientemente entre disulfuro de ortopiridilo, maleimidias, vinilsulfonas, yodoacetamidas, aminas, tioles, carboxilos, ésteres activos, carbonatos de benzotriazol, carbonatos de p-nitrofenol, isocianatos y biotina.

El resto de PEG de peso molecular bajo tiene preferentemente un peso molecular de 100 a 5000 daltons. En una realización preferida tiene de 1000 a 3000 daltons, preferentemente de 1500 a 2000 daltons, y más preferentemente 2000 daltons.

- 15 El resto de PEG monofuncional o bifuncional para la unión al terminal libre de un PEG de bajo peso molecular que está unido al IFN-β tiene preferentemente un peso molecular en el intervalo entre 100 y 200 daltons. Es preferible un metoxi PEG, PEG ramificado, PEG degradable por hidrólisis o enzimáticamente, PEG colgante o PEG dendrímico.

El PEG monofuncional y bifuncional tiene además la fórmula:



- 20 en la que Y es reactivo a un grupo terminal en el extremo libre del resto de PEG de peso molecular bajo que une al IFN-β y Z es -OCH₃ o un grupo reactivo para formar un conjugado bifuncional.

Por tanto, en una forma por etapas dos o más restos de PEG pueden ser utilizados para producir PEG-IFN β útil en la composición de la invención y para su uso como medicamento.

Ventajosamente, el puente disulfuro entre PEG y IFN β es estable en la circulación y puede ser fragmentado al entrar en la célula.

- 5 El PEG-IFN β utilizado en la formulación de acuerdo con la invención tiene aproximadamente la misma o una mayor actividad de interferón β en comparación con el interferón β original.

10 El excipiente puede ser cualquier poliol que, junto con los otros componentes de la formulación, de lugar a una forma estable de formulación de PEG-interferón beta. Son ejemplos de polioles manitol (PEARLITOL $\text{\textcircled{R}}$), sorbitol (NEOSORB $\text{\textcircled{R}}$), maltitol (MALTISORB), xilitol (XYLISORB) y maltitol (LYCASIN). Un excipiente de poliol preferido es el manitol.

De acuerdo con invención se utiliza un agente tensioactivo no iónico, un poloxámero 188.

El tampón es un tampón de acetato sódico.

15 El interferón beta puede ser interferón beta de origen natural humano o uno producido de forma recombinante, que lleva una pegilación de acuerdo con la invención. Además, el interferón beta (IFN- β) de acuerdo con la invención se refiere a las glicoproteínas producidas por el organismo en respuesta a una infección viral.

20 La unidad de interferón o la unidad internacional para el interferón (U o IU, para la unidad internacional) ha sido publicada como una medida de la actividad de IFN definida como la cantidad necesaria para proteger el 50% de las células contra el daño viral. El ensayo que se puede emplear para medir la actividad biológica es el ensayo de inhibición del efecto citopático como se ha descrito (Rubinstein, et al 1981; Familletti, PC, et al, 1981). En este ensayo antiviral para el interferón, aproximadamente 1 unidad de interferón/ml es la cantidad necesaria para producir un efecto citopático del 50%. Las unidades se determinan con relación a la norma de referencia internacional para Hu-IFN beta de los Institutos Nacionales de Salud (Pestka, S. 1986).

Los interferones se llaman también modificadores de la respuesta biológica (BRM), porque tienen efecto sobre la respuesta del organismo al tumor, lo que afecta el reconocimiento a través de la inmunomodulación.

25 El interferón de fibroblastos humanos (IFN β) tiene una actividad antiviral y también puede estimular las células asesinas naturales contra las células neoplásicas. Es un polipéptido de aproximadamente 20.000 Da inducido por virus y RNAs bicatenarios. A partir de la secuencia de nucleótidos del gen de interferón de fibroblastos, clonado por tecnología de DNA recombinante, Derynk et al. 1980 dedujeron la secuencia completa de aminoácidos de la proteína. Tiene una longitud de 166 aminoácidos.

30 El Rebif $\text{\textcircled{R}}$ (Merck Serono - interferón- β humano recombinante), una terapia con interferón para la esclerosis múltiple (EM), es el interferón (IFN)-beta-1a, producido a partir de líneas de células de mamíferos. Su Denominación Común Internacional (DCI) o INN es "interferón beta-1a".

35 Se entiende que un "interferón beta" o "IFN β ", como se usa en el presente texto, incluye cualquier molécula definida como tal en la bibliografía, que comprende, por ejemplo, cualquier tipo de IFN β mencionados en la sección anterior. El IFN β adecuado de acuerdo con la presente invención está disponible comercialmente, como p. ej., Rebif $\text{\textcircled{R}}$ (Merck Serono), Avonex $\text{\textcircled{R}}$ (Biogen Idec), siempre y cuando muestre los sitios de unión para la pegilación específica. También se prefiere el uso de interferón beta de origen humano, de acuerdo con la presente invención. Se entiende que el término interferón beta, como se usa en el presente texto, abarca las sales.

40 Se entiende que el término "interferón beta (IFN β)", como se usa en el presente texto, incluye interferón de fibroblastos, en particular de origen humano, como se obtiene por aislamiento a partir de los fluidos biológicos o como se obtiene mediante técnicas de DNA recombinante a partir de las células hospedadoras eucariotas, así como sus sales. Preferentemente se entiende que IFN beta significa Interferón beta-1a. Preferentemente, IFN beta se entiende que es Interferón beta-1a.

45 Se han descrito bioensayos para la determinación de la actividad de IFN- β /PEG-IFN- β . Un ensayo de IFN puede, por ejemplo, llevarse a cabo según se describe en Rubinstein et al., 1981. Así pues, se puede determinar si cualquier mutéina dada tiene una actividad sustancialmente similar, o incluso una mejor, que el IFN β por medio de una experimentación de rutina.

50 El término "sales" en el presente texto se refiere tanto a las sales de los grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de los 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, de sodio, de calcio, sales de amonio, hierro o zinc, y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como la trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Desde luego, cualquiera de tales sales

debe mantener la actividad biológica de las proteínas (IFN) de interés para la presente invención, es decir, la capacidad de unirse al correspondiente receptor e iniciar la señalización del receptor.

Preferentemente, el PEG-IFN beta está presente en la composición a una concentración de 0,1 mg/ml a 0,01 mg/ml, preferentemente de 0,06 mg/ml a 0,03 mg/ml e incluso más preferentemente a una concentración de 0,044 mg/ml.

5 En otra realización el PEG-IFN beta está presente en la formulación de acuerdo con la invención en una concentración de 0,05 a 0,150 mg/ml, preferentemente 0,055 o 0,110 mg/ml.

La dosificación usada en la composición, y que puede aplicarse a un individuo, variará dependiendo de varios factores, entre los que se incluyen las propiedades farmacocinéticas, la vía de administración, las condiciones del paciente y las características (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), el alcance de los síntomas, los tratamientos simultáneos, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado.

10 [La dosis estándar de IFN beta humano/PEG-IFN beta se encuentra en el intervalo de 80.000 UI/kg a 200.000 UI/kg al día, o de 6 MIU (millones de unidades internacionales) a 12 MIU por persona por día, o el equivalente de 22 a 44 µg (microgramos) de IFN beta por persona. De acuerdo con la presente invención, el PEG-IFN β en la composición de la invención se puede utilizar preferentemente en una dosis de aproximadamente 1 a 50 µg, más preferentemente de aproximadamente 10 a 30 µg o aproximadamente de 10 a 20 µg por persona por día equivalente a IFN-beta.

La administración de ingredientes activos de acuerdo con la presente invención puede ser por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Las vías de administración preferidas para la composición de la invención son la vía subcutánea y la vía intramuscular.

20 La composición de PEG-IFN β de la invención puede ser también administrada diariamente o cada dos días, o con menor frecuencia. Preferentemente, la composición de PEG-IFN β se administra una, dos o tres veces por semana. Preferentemente, se administra una vez cada dos semanas.

La vía de administración preferida es la administración subcutánea, administrada por ejemplo, tres veces por semana. Otra vía de administración preferida es la administración intramuscular, que p. ej. se puede aplicar una vez a la semana.

Preferentemente de 22 a 44 µg o de 6 MIU a 12 MIU equivalente a IFN beta de PEG-IFN beta en la composición de la invención son administrados tres veces por semana por vía subcutánea.

30 La composición de PEG-IFN beta puede ser administrada por vía subcutánea, a una dosis de 25 a 30 µg o de 8 MIU a 9,6 MIU, cada dos días. También pueden ser administrados por vía intramuscular 30 µg o 6 MIU equivalentes al IFN beta de PEG-IFN beta, una vez a la semana.

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

Una composición, solución o formulación "estable" es una composición en la que el grado de degradación, modificación, agregación, pérdida de actividad biológica, y similares, de las proteínas contenidas en ella están controlados de un modo aceptable, y no aumentan de forma inaceptable con el tiempo. Preferentemente la formulación retiene al menos o aproximadamente el 60%, más preferentemente al menos o aproximadamente el 70%, lo más preferentemente al menos o aproximadamente el 80% de la actividad de interferón marcada, a lo largo de un periodo de 12 a 24 meses. Las composiciones de PEG-IFN β de la invención tienen preferentemente una vida comercial de al menos aproximadamente 6 meses, 12 meses, 18 meses, más preferentemente al menos 20 meses, aún más preferentemente al menos aproximadamente 22 meses, lo más preferentemente al menos aproximadamente 24 meses, cuando se almacenan a una temperatura entre 2 y 8°C.

Se dispone en la técnica de métodos para controlar la estabilidad de las composiciones farmacéuticas de PEG-IFN β líquidas de la presente invención, incluyendo los métodos que se describen en el presente texto. Así, la formación de agregado de PEG-IFN β durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida de la presente invención puede ser determinada fácilmente midiendo el cambio de PEG-IFN β soluble en la solución a lo largo del tiempo. La cantidad de polipéptido soluble en la solución puede cuantificarse mediante cierto número de ensayos analíticos adaptados a la detección del PEG-IFN β en particular. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, HPLC de fase inversa (RP) y espectroscopia de absorción UV, como se describe en los Ejemplos que siguen.

La determinación de agregados, tanto insolubles como solubles, durante el almacenamiento en las composiciones líquidas puede realizarse, por ejemplo, usando ultracentrifugación analítica como se indica en los Ejemplos más

adelante, para distinguir entre la porción del polipéptido soluble que está presente como agregados solubles, y la porción que está presente en forma molecular no agregada, biológicamente activa.

5 El término "tampón" o "tampón aceptable fisiológicamente" se refiere a soluciones de compuestos que se sabe que son seguros para uso farmacéutico o veterinario en formulaciones, y que tienen el efecto de mantener o controlar el pH de la formulación en el margen de pH deseado para dicha formulación. Los presentes tampones son tampones de acetato sódico.

El excipiente esté presente preferentemente a una concentración de 30 mg/ml a 50 mg/ml, preferentemente en una concentración de 40 mg/ml a 50 mg/ml, incluso más preferentemente una concentración de 45 mg/ml.

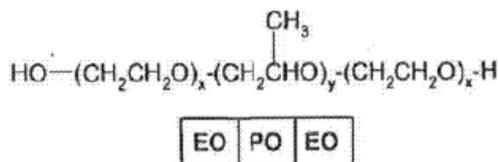
10 El agente tensioactivo tiene una concentración de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml, preferentemente una concentración de 0,4 mg/ml a 0,7 mg/ml, incluso más preferentemente una concentración de 0,5 mg/ml.

La expresión "agente tensioactivo" se refiere a un compuesto soluble que reduce la tensión superficial de los líquidos, o reduce la tensión interfacial entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido, siendo la tensión superficial la fuerza que actúa sobre la superficie de un líquido tendiendo a reducir al mínimo el área de la superficie.

15 Los agentes tensioactivos han sido usados algunas veces en formulaciones farmacéuticas, incluyendo el suministro de fármacos y polipéptidos de bajo peso molecular, con el fin de modificar la absorción del fármaco o su suministro a los tejidos diana. Entre los agentes tensioactivos bien conocidos se encuentran los polisorbatos (derivados polioxi-tenidos de ésteres grasos de sorbitol; Tween®), así como Poloxámeros tales como Pluronic® o Lutrol® comercializados por BASF, Alemania.

20 De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que formulando un PEG-IFN β con Pluronic® F68 (BASF, Pluronic® F68 es también conocido como Poloxámero 188) se obtienen formulaciones estables que reducen al mínimo la pérdida de principio activo causada por adsorción en las superficies del frasco y/o del dispositivo de suministro (p. ej. la jeringuilla, bomba, catéter, etc.). Se ha encontrado también que formulando un PEG-IFN β con Pluronic® F68 (BASF, Pluronic® F68 es también conocido como Poloxámero 188) se obtiene una composición estable, que es más resistente a la oxidación y a la formación de agregados de proteínas.

25 Los agentes tensioactivos Pluronic® F68 son copolímeros de bloques de óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO). El bloque de óxido de propileno (PO) está emparejado entre dos bloques de óxido de etileno (EO).



En el Pluronic® F77, el porcentaje de polioxi-etileno (hidrófilo) es 70%, y el peso molecular del hidrófobo (polioxi-propileno) es aproximadamente 2.306 Da.

30 En el Pluronic® F87, el porcentaje de polioxi-etileno (hidrófilo) es 70%, y el peso molecular del hidrófobo (polioxi-propileno) es aproximadamente 2.644 Da.

En el Pluronic® F88, el porcentaje de polioxi-etileno (hidrófilo) es 80%, y el peso molecular del hidrófobo (polioxi-propileno) es aproximadamente 2.644 Da.

35 En el Pluronic® F68, el porcentaje de polioxi-etileno (hidrófilo) es 80%, y el peso molecular del hidrófobo (polioxi-propileno) es aproximadamente 1.967 Da.

El Pluronic, en particular el Pluronic® F68, está presente preferentemente a una concentración que es suficiente para mantener la estabilidad del PEG-IFN β, a lo largo del periodo de almacenamiento deseado (por ejemplo de 12 a 24 meses), y también a una concentración que es suficiente para prevenir pérdidas de proteína debidas a la adsorción sobre superficies tales como las de los frascos, ampollas, cartuchos o jeringuillas.

40 En otra realización preferida se usa metionina, en particular L-metionina. Es particularmente útil una concentración de 0,1 mg/ml a 0,5 mg/ml, preferentemente una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 0,3 mg/ml, más preferentemente aproximadamente 0,25 mg/ml o aproximadamente 0,12 mg/ml.

Se ha encontrado que mediante la adición de metionina, ventajosamente la formulación se estabiliza más y se reduce la oxidación de la proteína.

45 Los diversos compuestos contenidos o comprendidos en la formulación de acuerdo con la presente invención pueden variarse como se describió antes, y podría lograrse el efecto positivo de la metionina. En una realización, la formulación comprende o contiene 0,055 mg/ml de PEG-IFN beta, tampón de acetato sódico 10 mM a aproximada-

mente pH 3,5 a 4,5, preferentemente 4,2, 45 mg/ml de manitol y 0,5 mg/ml de poloxámero 188, alternativamente 0,110 mg/ml de PEG-IFN beta.

La composición de la presente invención contiene un tampón en cantidad suficiente para mantener el pH de dicha composición en $4,2 \pm 0,2$.

- 5 El tampón está presente en la composición de la presente invención a una concentración de aproximadamente 5 mM a 500 mM, preferentemente en una concentración de aproximadamente 10 mM.

La composición es preferentemente una solución acuosa.

La invención incluye composiciones líquidas. El disolvente preferido es agua para inyección.

- 10 Podría indicarse que ajustando el pH en $4,2 \pm 0,2$ para las composiciones de PEG-IFN β , pueden proporcionarse formulaciones estables.

- 15 Las composiciones de acuerdo con la presente invención han conseguido influir positivamente en el proceso de degradación del PEG-IFN β , el cual proceso de degradación puede ser influido negativamente en las composiciones líquidas. Esta influencia puede medirse mediante SE-HPLC, p. ej. a 40°C y 25°C, respectivamente. La composición de la presente invención consiguió que no se observase una disminución significativa del contenido de PEG-IFN β (SE-HPLC). En particular, no se detectó disminución del contenido de PEG-IFN β después de un tiempo de hasta 2 semanas a 40°C y de hasta 6 semanas a 25°C. Las composiciones de la presente invención muestran buenas características de estabilidad y en particular pudo conseguirse una reducción de la degradación de las proteínas en el almacenamiento.

- 20 Los resultados positivos pudieron conseguirse en particular para una composición que contiene 0,044 mg/ml de PEG-IFN β , tampón de acetato sódico 10 mM de pH 4,2, 45 mg/ml de manitol y 0,5 mg/ml de Poloxámero 188 preparada en frascos de vidrio, preferentemente de 3 ml, o jeringuillas de vidrio, preferentemente de 1 ml.

Las composiciones de la presente invención muestran buena estabilidad, que se mide por la pureza utilizando SE-HPLC, RP-HPLC, el contenido de proteína medido por SE-HPLC, y la actividad biológica.

- 25 En otro aspecto la presente invención se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica líquida como se describió antes, en donde dicho método comprende añadir una cantidad calculada de excipiente y agente tensioactivo a la solución tamponada, y añadir después el PEG-IFN β .

En otro aspecto más, la invención se refiere a un recipiente cerrado herméticamente en condiciones estériles y apropiado para el almacenamiento antes de su uso, que comprende la formulación farmacéutica líquida de acuerdo con la presente invención.

- 30 Puede usarse cualquier recipiente apropiado para aplicaciones médicas. El recipiente es preferentemente una jeringuilla llenada previamente, un frasco o un cartucho para un auto-inyector.

Las formulaciones de la invención pueden administrarse usando dispositivos reconocidos. Los ejemplos que comprenden estos sistemas de frasco individual incluyen los dispositivos de auto-inyector o inyector de lápiz para el suministro de una solución tal como Rebiject®.

- 35 Los productos actualmente reivindicados incluyen material de envasado. El material de envasado proporciona, además de la información requerida por los organismos reguladores, las condiciones bajo las cuales puede usarse el producto. El material de envasado de la presente invención proporciona instrucciones para el paciente, si se precisan, para preparar la solución final y para usar tal solución final a lo largo de un periodo de 24 horas o mayor para el producto en dos frascos, húmedo/seco. Para el producto en solución en frasco único, la etiqueta indica que tal solución puede usarse a lo largo de un periodo de 24 horas o mayor. Los productos reivindicados actualmente son útiles para su uso como producto farmacéutico humano. Las composiciones pueden ser proporcionadas al paciente en forma de soluciones transparentes.

- 40 El PEG-IFN β puede ser administrado a un paciente de acuerdo con la presente invención a través de una diversidad de métodos de suministro, incluyendo inyección SC o IM; implante transdérmico, pulmonar, transmucosal, bomba osmótica, cartucho, microbomba, oral u otros medios apreciados por un profesional como es bien conocido por los expertos en la técnica.

En otro aspecto la invención se refiere a un *kit* de una composición farmacéutica, en donde el *kit* comprende un recipiente lleno con una composición farmacéutica de la presente invención.

El recipiente es preferentemente una jeringuilla para ser usada en un dispositivo de suministro.

- 50 En lo que sigue, la presente invención será ilustrada mediante los ejemplos.

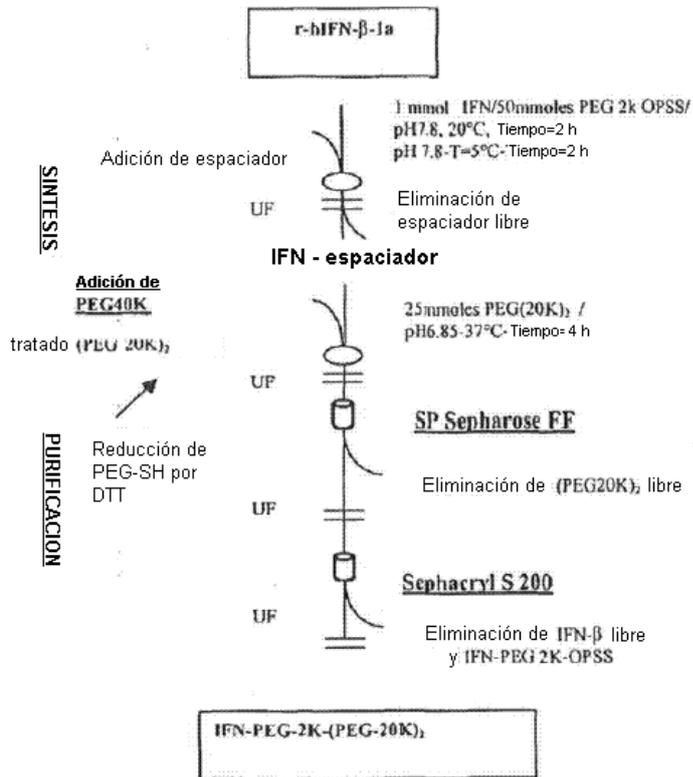
Ejemplos

Se describirán realizaciones preferidas de la invención mediante los ejemplos que siguen.

1. Preparación de un conjugado PEG-IFN β.

En el esquema que sigue se ilustran ejemplos de la preparación de PEG-IFN β:

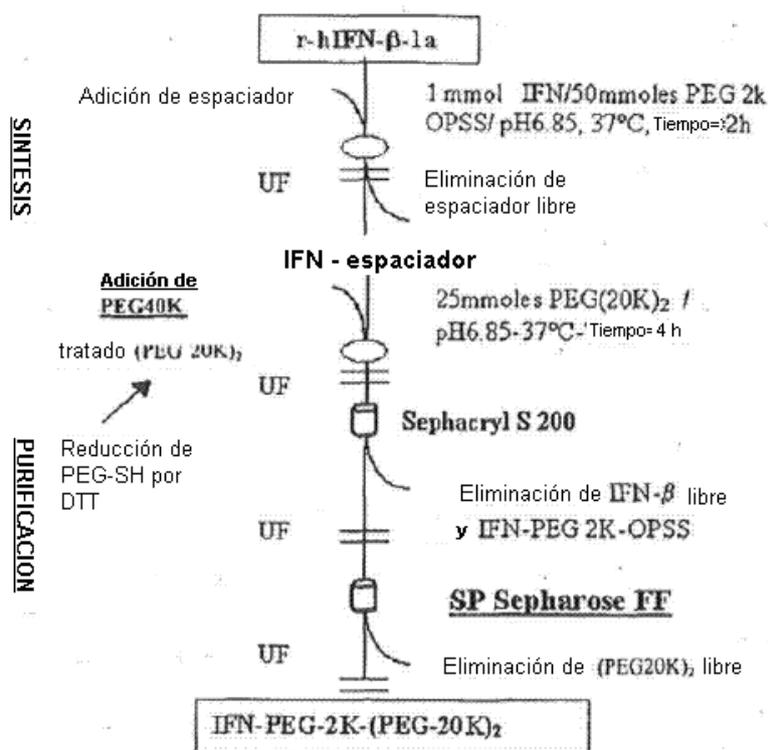
5 Diagrama de flujo de la síntesis y purificación de PEG-IFN β.



PEG 2k OPSS = (2-piridilditio)2-PEG-2K

PEG (20K)₂ = HS-cisteamina-Lys-(PEG-20K)(2-piridilditio)2-PEG-2K

Diagrama de flujo de la síntesis y purificación de PEG-IFN β.



2. Formulación.

Se formularon composiciones de PEG-IFN β usando PEG-IFN β 1a. La solución fue filtrada a través de una membrana de 0,22 μm (Durapore) y se introdujo en el recipiente final (1 ml en frasco o jeringuilla).

- 5 La composición de prueba contenía 0,044 mg/ml de PEG-IFN β 1a, tampón de acetato sódico 10 mL pH 4,2, 45 mg/ml de manitol y 0,5 mg/ml de Poloxámero 188. Alternativamente, contenía 0,055 o 0,110 mg/ml de PEG-IFN β 1a y posiblemente junto con metionina.

- 10 Las muestras de la composición de prueba se almacenaron a 40°C, 25°C y 2 - 8°C, respectivamente, y se realizaron las pruebas para la determinación de la pureza mediante SE-HPLC o RP-HPLC, del contenido de proteína mediante SE-HPLC, de la actividad biológica mediante un ensayo antiviral basado en la protección de las células inducida por IFN β, y del pH a lo largo del tiempo, así como para la medida de formas oxidadas por análisis de mapeo de péptidos/UPLC.

Ensayos de estabilidad y otra experimentación.

3.1. Pureza y ensayo por SE-HPLC.

- 15 La pureza por SE-HPLC fue evaluada en una columna Shodex (Aqueous SE, código KW-803); la elución se llevó a cabo en modo isocrático a razón de 1,0 mL/min usando PBS 1x preparado mediante dilución 1:10 en agua desde PBS 10x (Gibco BRL código 70013-016); la detección se realizó mediante UV a 214 nm.

Muestras formuladas de IFN-PEG fueron inyectadas usando los siguientes volúmenes de inyección: 200 mcL (para muestras de 44 y 55 mcg/mL); 100 mcL (para muestras de 110 mcg/mL).

- 20 Para el ensayo, la cuantificación de la proteína se realizó frente al patrón de referencia PS200-01 (ensayo de punto único).

3.2. Pureza por RP-HPLC.

- 25 El análisis de la pureza por RP-HPLC se realizó en una columna C4 (Symmetry 300 C4, 5 m tamaño 4,6 x 250 mm, Waters) termostalizada a 35°C; la longitud de onda se ajustó en 214 nm y la elución se efectuó a 1 mL/min usando las siguientes condiciones:

Fase móvil: A = 0,1% de TFA/agua; B = 0,1% de TFA/acetonitrilo

Gradiente: 30% → 70% B en 40 min.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% A	% B
0	1,0	70	30
3	1,0	70	30
40	1,0	30	70
45	1,0	70	30

Muestras formuladas con IFN-PEG fueron inyectadas tal cual usando los siguientes volúmenes de inyección: 160 mcL (para muestras de 44 mcg/mL); 200 mcL (para muestras de 55 mcg/mL); 100 mcL (para muestras de 110 mcg/mL).

5 **3.3. Actividad biológica (bioensayo in vitro).**

La actividad biológica fue determinada usando el método disponible para IFN β , que es un ensayo antiviral basado en la protección de las células inducida por IFN β (células WISH-tejido amniótico humano) contra el efecto citopático de un virus (virus de la estomatitis vesicular).

3.4. Determinación del pH.

10 Las medidas del pH se realizaron usando un pH-metro calibrado (Mettler-Toledo, mod. 713) de acuerdo con un procedimiento de trabajo estándar.

3.5. Formas oxidadas por mapeo de péptidos/UPLC.

15 El método para la cuantificación de los restos de metionina oxidados (Met 1, Met 117, Met 36) prevé la digestión proteolítica de la muestra de IFN-PEG con endoproteinasa Lys-C, seguida por un análisis de UPLC de gradiente; se realiza un pretratamiento de la muestra formulada antes de la digestión proteolítica con el fin de eliminar cualquier interferencia con los componentes de la matriz.

La separación de la mezcla proteolítica se realiza en una columna analítica Acquity UPLC (BEH C18 1,7 μ m 2,1 x 50 mm cod. 1860002350, Waters); la elución se realizó en condiciones de gradiente usando 0,1% de TFA/agua (A1) y 0,1% de TFA/acetonitrilo (B1).

20 Pueden usarse los siguientes ajustes instrumentales y parámetros de análisis:

Longitud de onda del detector de UV	214 nm				
Temperatura del muestreador automático	+5°C \pm 3°C				
Temperatura de la columna	+40°C \pm 5°C				
Velocidad de flujo de la columna	0,6 ml/min				
Duración del análisis	23 min				
Retardo de la próxima inyección	10 min				
Gradiente lineal	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	A1 (%)	B1 (%)	Curva
	0,0	0,6	95	5	-----
	1,0	0,6	95	5	6
	3,0	0,6	90	10	6
	8,0	0,6	64	36	6
	18,0	0,6	60	40	6
	20,0	0,6	0	100	6

ES 2 387 236 T3

	22,0	0,6	0	100	6
	23,0	0,6	95	5	6
Tiempo total del análisis	33 minutos				

Tabla 1

Composición de formulaciones de PEG-IFN β (mg/mL)

	PEG-IFN	Tampón	Manitol	L-metionina	Poloxámero 188	Recipiente
PEG-IFN Man/F68-frasco	0,044	Acetato 10 mM pH 4,2 (*)	45,0	-	0,5	frasco DIN2R
PEG-IFN Man/Met-frasco (**)	0,044	Acetato 10 mM pH 4,2 (*)	45,0	0,12	-	frasco DIN2R
PEG-IFN Man/F68/Met-frasco	0,044	Acetato 10 mM pH 4,2 (*)	45,0	0,12	0,5	frasco DIN2R
PEG-IFN Man/F68-jering.	0,044	Acetato 10 mM pH 4,2 (*)	45,0	0,12	0,5	jeringuilla 1 mL

(*) También está presente tampón PBS residual del granel (debido a la dilución 1:5 de sustancia de fármaco PEG-IFN).

(**) Referencia

5

Tabla 2

% de pureza por SE-HPLC

	Tiempo cero	1 semana +40°C	2 sema- nas +40°C	4 semanas +40°C
	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
PEG-IFN Man/F68-frasco	85,2	83,3	82,1	79,8
PEG-IFN Man/ Met-frasco (**)	85,3	84,3	82,2	90,3
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	85,0	83,0	81,0	76,7
PEG-IFN Man/F68-jering.	85,2	83,4	82,0	78,8

	Tiempo cero	2 sema- nas +25°C	4 sema- nas +25°C	6 semanas +25°C	8 semanas +25°C	13 sema- nas +25°C	26 sema- nas +25°C
	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
PEG-IFN Man/F68-frasco	85,2	87,1	87,1	87,2	87,3	86,3	86,7
PEG-IFN Man/ Met-frasco (**)	85,3	87,2	87,3	86,9	86,5	85,5	84,7
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	85,0	87,0	86,7	86,8	96,7	85,8	86,1
PEG-IFN Man/F68-jering.	85,2	87,3	86,7	86,9	86,8	86,3	86,7

	Tiempo cero	4 sema- nas 2 a 8°C	6 sema- nas 2 a 8°C	8 semanas 2 a 8°C	13 sema- nas 2 a 8°C	26 sema- nas 2 a 8°C
	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
PEG-IFN Man/F68-frasco	85,2	86,4	86,3	86,7	86,4	88,1
PEG-IFN Man/ Met-frasco (**)	85,3	86,4	86,3	86,0	84,8	87,3
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	85,0	85,8	85,9	85,7	85,7	87,5
PEG-IFN Man/F68-jering.	85,2	85,9	86,3	86,7	86,4	87,0

5 (**) Referencia

Tabla 3

% de pureza por RP-HPLC

	Tiempo cero	1 semana +40°C	2 sem. +40°C	4 sem. +40°C
	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
PEG-IFN Man/F68-frasco	96,0	94,1	91,7	87,4
PEG-IFN Man/ Met-frasco (**)	96,3	93,9	90,8	88,5
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	95,9	93,7	92,3	90,0
PEG-IFN Man/F68/Met- jering.	96,4	93,4	92,5	88,8

	Tiempo cero	2 sema- nas +25°C	4 semanas +25°C	6 semanas +25°C	8 semanas +25°C	12 sema- nas +25°C	26 sema- nas +25°C
	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
PEG-IFN Man/F68-frasco	96,0	95,0	94,5	93,3	93,5	93,9	90,6
PEG-IFN Man/ Met-frasco (**)	96,3	94,3	95,0	93,4	93,3	94,1	90,9
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	95,9	94,5	94,4	93,4	93,1	94,3	90,8
PEG-IFN Man/F68/Met- jering.	96,4	94,3	94,3	93,3	93,4	93,1	90,6

	Tiempo cero	4 sema- nas 2 a 8°C	6 semanas 2 a 8°C	8 semanas 2 a 8°C	12 sema- nas 2 a 8°C	26 sema- nas 2 a 8°C
	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
PEG-IFN Man/F68-frasco	96,0	94,5	94,9	94,4	95,7	96,0
PEG-IFN Man/ Met-frasco (**)	96,3	95,2	93,9	94,0	95,1	95,8
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	95,9	94,9	94,5	93,9	95,3	95,7
PEG-IFN Man/F68/Met- jering.	96,4	94,7	94,1	94,6	94,7	96,1

5 (**) Referencia

Tabla 4

Título (mcg/mL) por SE-HPLC

	Tiempo cero	1 semana +40°C	2 sema- nas +40°C	4 semanas +40°C
PEG-IFN Man/F68-frasco	41,2	44,4	44,3	43,7
PEG-IFN Man/ Met-frasco (**)	40,5	43,1	43,3	41,5
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	43,0	46,3	45,3	44,9
PEG-IFN Man/F68/Met- jering.	43,4	46,7	46,0	45,7

	Tiempo cero	2 sema- nas +25°C	4 semanas +25°C	6 semanas +25°C	8 semanas +25°C	12 sema- nas +25°C	26 sema- nas +25°C
PEG-IFN Man/F68-frasco	41,2	43,6	42,7	41,9	44,5	41,8	41,4
PEG-IFN Man/ Met-frasco (**)	40,5	42,0	41,2	40,4	42,7	40,6	38,4
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	43,0	45,1	44,2	43,3	45,7	43,1	42,5
PEG-IFN Man/F68/Met- jering.	43,4	45,6	44,6	43,7	46,2	43,8	43,4

	Tiempo cero	4 sema- nas 2 a 8°C	6 semanas 2 a 8°C	8 semanas 2 a 8°C	12 sema- nas 2 a 8°C	26 sema- nas 2 a 8°C
PEG-IFN Man/F68-frasco	41,2	42,7	42,0	44,4	42,2	41,9
PEG-IFN Man/ Met-frasco (**)	40,5	41,7	40,4	43,3	41,1	39,8
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	43,0	44,4	43,3	45,7	43,6	43,3
PEG-IFN Man/F68/Met- jering.	43,4	44,7	44,1	48,4	44,3	44,2

5 (**) Referencia

Tabla 5

Título (mcg/mL) por SE-HPLC

	Antes de filtración (mcg/mL)	Después de filtración (mcg/mL)	TO (mcg/mL)	Recuperación AF (%)	Recuperación TO (%)
PEG-IFN Man/F68-frasco	43,4	41,7	41,2	96,1	94,9
PEG-IFN Man/ Met-frasco (**)	43,4	42,7	40,2	98,3	92,5
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	43,5	42,0	43,0	96,7	98,9
PEG-IFN Man/F68/Met-jeringuilla	43,5	42,0	43,4	96,7	99,9

Tabla 6

Determinación del pH

	Tiempo cero	4 semanas +25°C	8 semanas +25°C	12 semanas +25°C	26 semanas +25°C
PEG-IFN Man/F68-frasco	4,22	4,20	4,16	4,19	4,22
PEG-IFN Man/ Met-frasco (**)	4,23	4,20	4,17	4,21	4,20
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	4,22	4,21	4,19	4,23	4,22
PEG-IFN Man/F68/Met-jering.	4,22	4,20	4,19	4,22	4,21
	Tiempo cero	4 semanas +2-8°C	8 semanas +2-8°C	12 semanas +2-8°C	26 semanas +2-8°C
PEG-IFN Man/F68-frasco	4,22	4,22	4,17	4,21	4,17
PEG-IFN Man/ Met-frasco (**)	4,23	4,23	4,17	4,19	4,18
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	4,22	4,25	4,19	4,23	4,20
PEG-IFN Man/F68/Met-jering.	4,22	4,26	4,18	4,24	4,22

Tabla 7

Bioensayo (MIU/mL)

	Tiempo cero	4 semanas +25°C	8 semanas +25°C	12 semanas +25°C	26 semanas +25°C
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	33,9	36,6	35,7	33,6	27,0
PEG-IFN Man/F68/Met-jering.	34,8	37,9	40,1	32,6	30,2
	Tiempo cero	4 semanas +2-8°C	8 semanas +2-8°C	12 semanas +2-8°C	26 semanas +2-8°C
PEG-IFN Man/ F68/Met-frasco	33,9	38,8	36,8	34,0	31,5
PEG-IFN Man/F68/Met-jering.	34,8	38,1	40,1	34,5	31,3

(**) Referencia

5

10

Tabla 8

Pureza por SE-HPLC (%)

40°C

	T = 0		1 semana		3 semanas		4 semanas	
	HMV + dímero	Monó- mero						
PEG-IFN/Acet 55 mcg	3,5	96,5	4,0	96,0	3,8	99,2	4,4	95,6
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	3,5	96,5	3,8	96,2	4,1	95,9	4,4	95,7
PEG-IFN/Acet 110 mcg	3,6	96,4	4,5	95,5	5,6	94,4	5,7	94,3
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	3,9	96,1	4,3	95,7	4,5	95,5	5,1	94,9

5

25°C

	T = 0		4 semanas		8 semanas		13 semanas	
	HMV + dímero	Monó- mero						
PEG-IFN/Acet 55 mcg	3,5	96,5	3,4	96,6	3,6	96,4	3,5	96,5
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	3,5	96,5	3,3	96,7	3,6	96,4	3,5	96,5
PEG-IFN/Acet 110 mcg	3,6	96,4	3,7	96,3	4,0	96,0	3,7	96,3
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	3,9	96,1	3,7	96,3	4,0	96,1	3,9	96,1

2 - 8°C

	T = 0		4 semanas		8 semanas		13 semanas	
	HMV + dímero	Monó- mero						
PEG-IFN/Acet 55 mcg	3,5	96,5	3,9	96,1	3,8	96,2	3,6	96,4
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	3,5	96,5	3,6	96,4	4,0	96,0	3,6	96,4
PEG-IFN/Acet 110 mcg	3,6	96,4	3,9	96,1	4,2	95,8	3,9	96,1
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	3,9	96,1	3,9	96,1	4,1	95,9	3,8	96,2

Tabla 9

Contenido de proteína por SE-HPLC (mcg/mL)

40°C

5

	T = 0	1 semana	2 semanas	4 semanas
PEG-IFN/Acet 55 mcg	52,7	51,9	52,3	51,9
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	53,0	52,1	52,2	51,8
PEG-IFN/Acet 110 mcg	110,2	109,1	107,9	108,0
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	110,9	108,7	107,9	107,5

25°C

	T = 0	4 semanas	8 semanas	13 semanas
PEG-IFN/Acet 55 mcg	52,7	52,5	53,0	51,6
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	53,0	53,4	53,1	51,2
PEG-IFN/Acet 110 mcg	110,2	110,0	109,5	107,0
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	110,9	109,6	109,1	106,7

10

2 - 8°C

	T = 0	4 semanas	8 semanas	13 semanas
PEG-IFN/Acet 55 mcg	52,7	54,4	53,8	51,9
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	53,0	54,0	53,7	52,4
PEG-IFN/Acet 110 mcg	110,2	111,1	110,5	108,6
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	110,9	111,0	110,5	108,3

Tabla 10

Pureza por RP-HPLC (%)

40°C

15

	T = 0	1 semana	2 semanas	4 semanas
PEG-IFN/Acet 55 mcg	97,6	96,1	94,4	94,6
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	97,7	95,7	94,2	94,6
PEG-IFN/Acet 110 mcg	95,9	95,5	93,8	94,4
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	96,0	95,7	93,7	94,2

ES 2 387 236 T3

25°C

	T = 0	4 semanas	8 semanas	13 semanas
PEG-IFN/Acet 55 mcg	98,7	98,3	96,5	97,3
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	98,7	98,8	96,8	96,2
PEG-IFN/Acet 110 mcg	97,0	98,6	96,8	96,5
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	97,0	98,5	96,5	95,9

2 - 8°C

5

	T = 0	4 semanas	8 semanas	13 semanas
PEG-IFN/Acet 55 mcg	98,7	99,3	98,1	98,6
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	98,7	99,6	98,3	98,4
PEG-IFN/Acet 110 mcg	97,0	98,3	96,8	96,6
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	97,0	98,3	96,7	96,9

Tabla 11

Valores del pH

10

25°C

	T = 0	4 semanas	8 semanas	13 semanas
PEG-IFN/Acet 55 mcg	4,22	4,21	4,22	4,12
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	4,21	4,19	4,23	4,21
PEG-IFN/Acet 110 mcg	4,21	4,15	4,25	4,21
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	4,20	4,15	4,19	4,19

2 - 8°C

	T = 0	4 semanas	8 semanas	13 semanas
PEG-IFN/Acet 55 mcg	4,22	4,15	4,17	4,19
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	4,21	4,16	4,19	4,21
PEG-IFN/Acet 110 mcg	4,21	4,15	4,17	4,20
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	4,20	4,16	4,15	4,19

Tabla 12

Bioensayo (U/mL)

25°C

5

	T = 0	4 semanas	8 semanas	13 semanas
PEG-IFN/Acet 55 mcg	40,3	36,0	32,7	32,4
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	38,7	33,0	34,9	30,0
PEG-IFN/Acet 110 mcg	81,9	65,7	70,6	63,9
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	77,0	63,7	72,9	65,6

2 - 8°C

	T = 0	4 semanas	8 semanas	13 semanas
PEG-IFN/Acet 55 mcg	40,3	40,7	34,9	28,0
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	38,7	40,1	35,7	27,4
PEG-IFN/Acet 110 mcg	81,9	68,8	72,0	57,7
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	77,0	75,3	70,0	56,8

Tabla 13

Formas oxidadas por mapeo de péptidos/UPLC (%)

2 - 8°C

5

				Pendiente (%/mes)
Met 1	T = 0	8 semanas	13 semanas	
PEG-IFN/Acet 55 mcg/No Met	1,7	2,0	1,3	-0,09
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	1,6	1,5	1,2	-0,13
PEG-IFN/Acet 110 mcg/No Met	1,5	1,6	1,3	-0,03
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	1,3	1,6	1,3	-0,02
Met 117	T = 0	8 semanas	13 semanas	
PEG-IFN/Acet 55 mcg/No Met	4,6	5,5	5,3	0,24
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	4,8	4,7	4,4	-0,10
PEG-IFN/Acet 110 mcg/No Met	5,0	5,1	5,1	0,06
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	5,3	5,1	4,5	-0,24
Met 36	T = 0	8 semanas	13 semanas	
PEG-IFN/Acet 55 mcg/No Met	4,0	4,3	4,7	0,21
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	4,2	3,8	4,0	-0,07
PEG-IFN/Acet 110 mcg/No Met	3,8	4,2	4,5	0,24
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	3,9	3,9	4,0	0,03

0 2 3

25°C

				Pendiente (%/mes)	
Met 1	T = 0	4 semanas	8 semanas	13 semanas	
PEG-IFN/Acet 55 mcg/No Met	1,7	1,4	1,9	1,6	0,01
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	1,6	1,2	1,8	1,3	-0,03
PEG-IFN/Acet 110 mcg/No Met	1,5	-	1,9	1,5	0,05
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	1,3	1,2	1,7	1,3	0,06
Met 117	T = 0	4 semanas	8 semanas	13 semanas	
PEG-IFN/Acet 55 mcg/No Met	4,6	4,2	5,4	5,2	0,29
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	4,8	4,4	4,9	4,7	0,02
PEG-IFN/Acet 110 mcg/No Met	5,0	-	5,5	5,0	0,02
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	5,3	4,4	5,0	4,5	-0,20

ES 2 387 236 T3

Met 36	T = 0	4 semanas	8 semanas	13 semanas	
PEG-IFN/Acet 55 mcg/No Met	4,0	3,5	4,6	4,8	0,36
PEG-IFN/Acet 55 mcg/0,25 Met	4,2	3,4	3,7	4,1	0,02
PEG-IFN/Acet 110 mcg/No Met	3,8	-	4,3	4,6	0,26
PEG-IFN/Acet 110 mcg/0,25 Met	3,9	3,6	3,6	4,0	0,06
	0	1	2	3	

Nota: En todas las Tablas, mcg quiere decir microgramos, HMW quiere decir especies de alto peso molecular, y Dim quiere decir dímero.

Lista de referencias.

1. Derynk R. et al., Nature 1980; 285, 542 - 547
- 5 2. Familletti, PC, Rubinstein, S., y Pestka, S. 1981 "A Convenient and Rapid Cytopathic Effect Inhibition Assay for Interferon," in Methods in Enzymology, Vol. 78 (S. Pestka, ed.), Academic Press, Nueva York, 387 - 394
3. Mark DF et al., Proc. Natl. Natl. Acad. Acad. Sci. Ciencia. USA, 81 (18) 5662-5666 (1984)
4. Pestka, S. (1986) "Interferon Standards and General Abbreviations, en Methods in Enzymology (S. Pestka, ed.), Academic Press, Nueva York 119, 14 - 23
5. Rubinstein, S., Familletti, PC, y Pestka, S. Convenient Assay for Interferons. J. Virol 1981; 37, 755 - 758
- 10 6. Shepard HM et al., Nature 1981; 294, 563 - 565.
7. Woghiren et al. en Bioconjugate Chem., 4(5): 314 - 318, 1993.

REIVINDICACIONES

- 1^a. Una composición farmacéutica líquida que comprende un interferón β pegilado (PEG-IFN β), un excipiente de poliol, un agente tensioactivo de poloxámero 188 y un tampón de acetato sódico, en la que el pH de la composición farmacéutica es $4,2 \pm 0,2$.
- 5 2^a. Una composición según la reivindicación 1^a, en la que dicho excipiente de poliol es manitol
- 3^a. La composición según la reivindicación 1^a o 2^a, en la que dicho PEG-IFN β está presente en una concentración de 0,01 mg/ml a 0,1 mg/ml.
- 4^a. La composición según la reivindicación 3^a, en la que dicho PEG-IFN β está presente en una concentración de 0,044 mg/ml, 0,055 mg/ml o 0,110 mg/ml.
- 10 5^a. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el PEG-IFN β contiene un PEG lineal o ramificado, preferentemente un PEG ramificado.
- 6^a. La composición según la reivindicación 5^a, en la que el PEG tiene un peso molecular de al menos 20 kDa, preferentemente al menos 40 kDa, más preferentemente 40 kDa.
- 15 7^a. La composición según la reivindicación 1^a o 2^a, en la que dicho excipiente de poliol está presente en una concentración de 30 mg/ml a 50 mg/ml.
- 8^a. La composición según la reivindicación 1^a o 2^a, en la que dicho excipiente de poliol está presente en una concentración de 40 mg/ml a 50 mg/ml.
- 9^a. La composición según la reivindicación 1^a o 2^a, en la que dicho excipiente de poliol está presente en una concentración de 45 mg/ml.
- 20 10^a. La composición según la reivindicación 1^a o 2^a, en la que dicho poloxámero 188 está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml.
- 11^a. La composición según la reivindicación 1^a o 2^a, en la que dicho poloxámero 188 está presente en una concentración de 0,4 mg/ml a 0,7 mg/ml.
- 25 12^a. La composición según la reivindicación 1^a o 2^a, en la que dicho poloxámero 188 está presente en una concentración de 0,5 mg/ml.
- 13^a. La composición según la reivindicación 1^a o 2^a, en la que dicho tampón de acetato sódico está presente en una concentración de 5 mM a 500 mM.
- 14^a. La composición según la reivindicación 13^a, en la que dicho tampón de acetato sódico está presente en una concentración de 10 mM.
- 30 15^a. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición es una solución acuosa.
- 16^a. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición comprende además metionina.
- 35 17^a. La composición según la reivindicación 16^a, en la que la metionina está presente en una concentración de 0,10 a 0,50 mg/ml, preferentemente de 0,20 a 0,40 mg/ml, más preferentemente de 0,12 o 0,25 mg/ml.
- 18^a. Un método para preparar una composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 17^a, en el que dicho método comprende añadir una cantidad calculada de un excipiente de poliol y poloxámero 188 a la solución tamponada de acetato sódico, y después añadir el PEG-IFN β .
- 40 19^a. Un recipiente cerrado herméticamente en condiciones estériles y apropiadas para el almacenamiento antes de su uso, que comprende la formulación farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 17^a.
- 20^a. El recipiente según la reivindicación 19^a, en donde dicho recipiente es una jeringuilla pre-llenada, o un frasco para un auto-inyector.
- 21^a. Un *kit* de una composición farmacéutica, en donde el *kit* comprende un recipiente llenado con una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 17^a.

45

Figura 1

