

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 061**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2004 E 04730264 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 1617861**

54 Título: **Formulaciones líquidas de interferón estabilizadas, exentas de hsa**

30 Prioridad:

01.05.2003 EP 03101210
17.12.2003 US 530169 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.08.2013

73 Titular/es:

ARES TRADING S.A. (100.0%)
ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ
1170 AUBONNE, CH

72 Inventor/es:

SAMARITANI, FABRIZIO y
DEL RIO, ALESSANDRA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 417 061 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones líquidas de interferón estabilizadas, exentas de hsa.

CAMPO DEL INVENTO

- 5 El invento se refiere en términos generales a unas composiciones farmacéuticas que contienen interferón beta, más particularmente a unas formulaciones estabilizadas de interferón beta, que están exentas de albúmina de suero humano (HSA) como un excipiente farmacéutico añadido.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

- 10 Los interferones son unas citocinas, es decir unas proteínas solubles que transmiten mensajes entre células y desempeñan un cometido esencial en el sistema inmunitario ayudando a destruir a los microorganismos que causan infecciones y reparando cualquier daño resultante. Los interferones son secretados de modo natural por células infectadas y fueron identificados por primera vez en 1957. Su nombre se deriva del hecho de que ellos "interfieren" en la replicación y producción de virus.

- 15 Los interferones exhiben una actividad tanto antivírica como antiproliferativa. Sobre la base de las propiedades bioquímicas e inmunológicas, los interferones humanos que se presentan en la naturaleza son agrupados en tres clases principales: interferón alfa (leucocitos), interferón beta (fibroblastos) e interferón gamma (sistema inmunitario). El interferón alfa está aprobado actualmente en los Estados Unidos de América y otros países para el tratamiento de la leucemia de células pilosas, de las verrugas venéreas, del sarcoma de Kaposi (un cáncer que corrientemente aflige a pacientes que padecen del síndrome de la deficiencia inmunitaria adquirida (SIDA)), y de una hepatitis no A, no B crónica.

- 20 Además, los interferones (IFNs) son unas glicoproteínas producidas por el cuerpo como respuesta a una infección causada por virus. Ellos inhiben la multiplicación de virus en células protegidas. Por consistir en una proteína de bajo peso molecular, los IFNs son notablemente no específicos en su acción, es decir que un IFN inducido por un virus es efectivo contra una amplia gama de otros virus. Ellos, sin embargo, son específicos para ciertas especies, es decir, un IFN producido por una especie estimulará solamente la actividad vírica en células de la misma especie o de una especie estrechamente relacionada. Los IFNs fueron el primer conjunto de citocinas que se aprovecharon por sus potenciales actividades antitumorales y antivíricas.

- 25 Los tres IFNs principales son citados como IFN- α , IFN- β e IFN- γ . Dichas clases principales de IFNs fueron clasificadas inicialmente de acuerdo con sus células de origen (leucocitos, fibroblastos o células T). Sin embargo, quedó puesto en claro que varios tipos pueden ser producidos por una célula. Por lo tanto, ahora el IFN de leucocitos es denominado IFN- α , el IFN de fibroblastos es denominado IFN- β y el IFN de células T es denominado IFN- γ . Hay también un cuarto tipo de IFN, el IFN de linfoblastoides, producido en el linaje de células "Namalwa" (que se deriva del linfoma de Burkitt), que parece producir una mezcla de IFN tanto de leucocitos como de fibroblastos.

- 30 La unidad de interferón o la unidad internacional para interferón (U o UI, por unidad internacional) ha sido informada como una medida de la actividad de IFN definida como la cantidad necesaria para proteger a un 50 % de las células contra un daño causado por virus. El ensayo que se puede usar para medir una actividad biológica es el ensayo de inhibición del efecto citopático tal como se ha descrito (en las citas de Rubinstein, y colaboradores 1981; y de Familletti, P. C., y colaboradores, 1981). En este ensayo antivírico para detectar un interferón, alrededor de 1 unidad/ml de interferón es la cantidad necesaria para producir un efecto citopático del 50 %. Las unidades son determinadas con respecto al patrón de referencia internacional para Hu-IFN-beta proporcionado por el Instituto Nacional de la Salud (National Institutes of Health) (Pestka, página 1986).

Cada clase de IFN contiene varios tipos distintos. Los IFN- β y IFN- γ son cada uno el producto de un único gen.

- 35 Las proteínas clasificadas como IFNs- α son el grupo más diverso, que contiene aproximadamente 15 tipos. Hay un racimo de genes de IFN- α en el cromosoma 9, que contiene por lo menos 23 miembros, 15 de los cuales son activos y han sido transcritos. Los IFNs- α maduros no están glicosilados.

- 40 Los IFNs- α y IFN- β tienen todos ellos la misma longitud (165 o 166 aminoácidos) con unas actividades biológicas similares. Los IFNs- γ tienen una longitud de 146 aminoácidos, y se asemejan menos cercanamente a las clases α y β . Solamente los IFNs- γ pueden activar a los macrófagos o inducir la maduración de células T asesinas. Estos nuevos tipos de agentes terapéuticos son denominados algunas veces agentes modificadores de la respuesta biológica (BRMs acrónimo de Biologic Response Modifiers), puesto que ellos tienen un efecto sobre la respuesta del organismo frente al tumor, afectando al reconocimiento por medio de una modulación inmunitaria.

- 5 El interferón de fibroblastos humanos (IFN- β) tiene una actividad antivírica y puede también estimular a células asesinas naturales contra células neoplásicas. Es un polipéptido con un tamaño de aproximadamente 20.000 Da inducido por virus y ARNs bicatenarios (de doble hebra). A partir de la secuencia de nucleótidos del gen para un interferón de fibroblastos, clonada por una tecnología de ADN recombinante, (Derynk y colaboradores 1980) dedujeron la secuencia completa de aminoácidos de la proteína. Ésta tiene una longitud de 166 aminoácidos.
- Shepard y colaboradores (1981) describieron una mutación en la base 842 (Cys \rightarrow Tyr en la posición 141) que anulaba su actividad antivírica, y un clon variante con una supresión (delección) de los nucleótidos 1.119-1.121.
- 10 Mark y colaboradores (1984) introdujeron una mutación artificial reemplazando la base 469 (T) por (A) causando un cambio de aminoácidos de Cys \rightarrow Ser en la posición 17. Se informó de que el resultante IFN- β era tan activo como el IFN- β "natural" y estable durante un almacenamiento a largo plazo (-70°C).
- El Rebif® (de Serono - interferón β humano recombinante), que es el último desarrollo en la terapia con un interferón para la esclerosis múltiple (MS), es el interferón (IFN) beta-1a, producido a partir de linajes de células de mamíferos. Su nombre internacional sin propietario (INN, acrónimo de International Nonproprietary Name) el "interferón beta-1a".
- 15 Igual que con todos los agentes farmacéuticos basados en proteínas, un obstáculo principal que se debe de superar en el uso de un IFN-beta como un agente terapéutico, es la pérdida de utilidad farmacéutica que puede resultar de su inestabilidad en formulaciones farmacéuticas.
- Las inestabilidades físicas que amenazan a la actividad de los polipéptidos y a su eficacia en formulaciones farmacéuticas incluyen una desnaturalización y una formación de aglomerados solubles e insolubles, mientras que 20 las inestabilidades químicas incluyen una hidrólisis, una formación de imidas, una oxidación, una racemización y una desamidación. Se conoce que algunos de estos cambios conducen a la pérdida o a la reducción de la actividad farmacéutica de la proteína que interesa. En otros casos, se desconocen los efectos exactos de estos cambios, pero se considera todavía que los resultantes productos de degradación son inaceptables farmacéuticamente debido a su potencial de tener efectos colaterales indeseados.
- 25 La estabilización de polipéptidos en composiciones farmacéuticas sigue siendo un sector en que el tanteo desempeña un cometido principal (revisado por Wang (1999) Int. J. Pharm. 185:129-188; y por Wang y Hanson (1988) J. Parenteral Sci. Tech. 42:S3-S26). Los excipientes que se añaden a las formulaciones farmacéuticas de polipéptidos para aumentar su estabilidad incluyen tampones, azúcares, agentes tensioactivos, aminoácidos, poli(etilen glicoles), y polímeros, pero los efectos estabilizadores de estos aditivos químicos varían dependiendo de 30 la proteína.
- Las actuales formulaciones de IFN-beta emplean el uso de un HSA como un agente intensificador de la solubilidad para el IFN-beta. Sin embargo, el uso de un HSA tiene algunas desventajas. Un HSA es un producto de sangre humana y por lo tanto debe de ser cosechado a partir de individuos humanos. Mientras que se están adoptando medidas para reducir el riesgo, el uso de productos de sangre humana, tales como un HSA, acarrea consigo la 35 introducción potencial de virus humanos tales como los VIH y VCH.
- Consiguientemente, hay una necesidad de adicionales composiciones farmacéuticas de IFN-beta que comprendan unos estabilizadores fisiológicamente compatibles que mejoren la solubilidad de esta proteína y estabilicen a la proteína contra la formación de aglomerados, aumentando de esta manera su utilidad farmacéutica.
- 40 El documento de solicitud de patente de los EE.UU. US 2002/0172661 describe unas composiciones farmacéuticas estabilizadas con una baja fuerza iónica y con un pH situado dentro de un intervalo de más o menos 3,0 a aproximadamente 5,0, que están exentas de HSA, que comprendan un interferón beta sustancialmente monomérico así como métodos útiles en su preparación.
- 45 El documento de patente europea EP 1250932 describe una formulación en forma de una solución acuosa estable de interferón que comprende un interferón alfa como interferón activo y a su uso. Se describen además unos métodos para preparar dicha formulación en forma de solución acuosa estable de interferón así como un medicamento que comprende dicha formulación de interferón y un método para tratar pacientes por administración de dicha formulación de interferón.
- 50 El documento EP 0736303 describe una solución acuosa de interferón exenta de HSA, que contiene un interferón alfa, un detergente no iónico, un tampón para ajustar el pH a 4,5-5,5, alcohol bencílico y opcionalmente un agente isotonzante.

DESCRIPCIÓN DEL INVENTO

El presente invento se dirige a unas composiciones farmacéuticas estabilizadas que comprenden un interferón beta (IFN-beta) y a métodos para su preparación. Estas composiciones se preparan en la ausencia de albúmina de suero humano (HSA), y por lo tanto están exentas de este excipiente farmacéutico. Dichas composiciones son citadas aquí como composiciones farmacéuticas de IFN-beta "exentas de HSA" y ellas comprenden un interferón beta (IFN-beta) o una isoforma, una muteína, una proteína fusionada, un derivado funcional, una fracción activa o una sal del mismo, en donde dicha composición es una solución que comprende un tampón, un agente tensioactivo Poloxamer 188, un agente de isotonicidad y un agente antioxidante, que es metionina.

De acuerdo con una forma de realización del presente invento, las composiciones comprenden también un agente bacteriostático.

Un IFN- β o IFN-beta es el IFN de acuerdo con el presente invento. Un IFN- β apropiado de acuerdo con el presente invento está disponible comercialmente p.ej. como Rebit® (de Serono), Avonex® (de Biogen) o Betaferon® (de Schering). El uso de interferones de origen humano es también preferido de acuerdo con el presente invento. Se pretende que el término interferón, tal como se usa en el presente contexto, abarque una isoforma, una muteína, una proteína fusionada, un derivado funcional, una fracción activa o una sal de la misma..

Se pretende que el término "interferón beta (IFN-beta o IFN- β)", tal como se usa en el presente contexto, incluya un interferón de fibroblastos en particular de origen humano, tal como se obtiene por aislamiento a partir de fluidos biológicos o tal como se obtiene por técnicas de ADN recombinantes a partir de células anfitrionas procarionóticas o eucarióticas, así como sus sales, derivados funcionales, variantes, compuestos análogos y fragmentos activos. Se pretende que de manera preferida un IFN-beta signifique el Interferón beta-1a.

Tal como se usa en el presente contexto, el término "muteínas" se refiere a unos compuestos análogos al IFN-beta en los que uno o más residuos de aminoácidos de un IFN-beta natural son reemplazados por diferentes residuos de aminoácidos, o han sido suprimidos, o uno o más residuos de aminoácidos son añadidos a la secuencia natural de un IFN-beta, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con el IFN-beta de tipo silvestre. Estas muteínas se preparan por conocidas técnicas de síntesis y/o por conocidas técnicas de mutagénesis dirigidas a un sitio, o cualquier otra técnica conocida apropiada para esto. Las muteínas preferidas incluyen p.ej. las que han sido descritas por Shepard y colaboradores (1981) o por Mark y colaboradores (1984).

Cualquiera de tales muteínas tiene de manera preferida una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicadora de la del IFN-beta, de manera tal que tiene una actividad sustancialmente similar o incluso mejor que la del IFN-beta. La función biológica de un interferón es bien conocida para una persona experta en la especialidad, y se han establecido y están disponibles unas normas biológicas del National Institute for Biological Standards and Control [Instituto nacional de normas biológicas y control] (<http://immunology.org/links/NIBSC>).

Han sido descritos ciertos ensayos biológicos para la determinación de la actividad de un IFN. Un ensayo para IFN se puede llevar a cabo por ejemplo tal como ha sido descrito por Rubinstein y colaboradores, 1981. Por lo tanto, se puede determinar si cualquier muteína dada tiene sustancialmente una actividad similar, o incluso mejor, que la de un IFN por medio de una experimentación rutinaria.

Las muteínas de un IFN-beta, que se pueden usar de acuerdo con el presente invento, o el ácido nucleico que las codifica, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que se pueden obtener rutinariamente por una persona con experiencia ordinaria en la especialidad, sin ninguna experimentación indebida, basándose en las enseñanzas y en la guía aquí presentadas.

Unos cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con el presente invento son los que se conocen como sustituciones "conservativas". Las sustituciones conservativas de aminoácidos de los polipéptidos o las proteínas del invento pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo, que tienen unas propiedades fisicoquímicas suficientemente similares para que una sustitución entre miembros del grupo conserve la función biológica de la molécula. Está claro que se pueden hacer también unas inserciones y supresiones de aminoácidos en las secuencias más arriba definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o supresiones implican solamente a unos pocos aminoácidos, p.ej. por debajo de treinta, y de manera preferida por debajo de diez, y no eliminan ni desplazan a unos aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, p.ej. residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas por dichas supresiones y/o inserciones entran dentro del alcance del presente invento.

De manera preferida, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla I. De manera más preferida, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla II; y de manera sumamente preferida los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla III.

Tabla I
Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
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
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
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

5 **Tabla II**
Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

10 **Tabla III**
Grupos sumamente preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
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
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Unos ejemplos de la producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas, que se pueden usar para obtener muteínas de IFN-beta, para su uso en el presente invento incluyen cualesquiera etapas de método conocidas, tal como se presentan en las patentes de los EE.UU. US 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, concedidas a Mark y colaboradores; en la patente US 5.116.943 concedida a Koths y colaboradores, en la patente US 4.965.195 concedida a Namen y colaboradores; en la patente US 4.879.111 concedida a Chong y colaboradores; y en la patente US 5.017.691 concedida a Lee y colaboradores; y proteínas con lisina sustituida presentados en la patente US 4.904.584 (concedida a Shaw y colaboradores). Unas específicas muteínas de IFN-beta han sido descritas, por ejemplo por Mark y colaboradores, 1984.

5 El término "proteína fusionada" se refiere a un polipéptido que comprende un IFN-beta, o una muteína del mismo, que se ha fusionado con otra proteína, que *p.ej.* tiene un prolongado período de tiempo de permanencia en fluidos corporales. Un IFN-beta se puede fusionar por lo tanto con otra proteína, otro polipéptido u otro compuesto similar, *p.ej.* una inmunoglobulina o un fragmento del mismo.

15 El concepto de "derivados funcionales", tal como se usa en el presente contexto, cubre unos derivados de IFN-beta y sus muteínas y proteínas fusionadas, que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales que se presentan como cadenas laterales en los residuos o en los grupos terminales de N o de C, por unos medios conocidos en la especialidad, y se incluyen en el invento siempre y cuando que ellos sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir que ellos no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de IFN-beta, y no confieren propiedades tóxicas a unas composiciones que lo contienen. Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de poli(etilén glicol), que pueden enmascarar a sitios antigénicos y prolongar la permanencia de un IFN-beta en fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo obtenidas por reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acílicos de grupos amino libres de los residuos de aminoácidos formados con restos de acilo (*p.ej.* grupos de alcanóilo o aroílo carboxílico) o derivados O-acílicos de grupos hidroxilo libres (por ejemplo los de los residuos serilo o treonilo) formados con restos de acilo.

25 Como "fracciones activas" de un IFN-beta, o de muteínas y proteínas fusionadas, el presente invento cubre cualquier fragmento o cualesquiera precursores de la cadena de polipéptidos de la molécula de proteínas a solas o en común con moléculas asociadas o residuos enlazados con ellas, *p.ej.* residuos de azúcares o fosfatos, o aglomerados de la molécula de una proteína o los residuos de azúcares por sí mismos, con la condición de que dicha fracción no ha de tener una actividad significativamente reducida en comparación con la del correspondiente IFN.

30 El término "sales" en el presente contexto se refiere tanto a unas sales de grupos carboxilo como a unas sales por adición de ácidos de grupos amino de las proteínas más arriba descritas o a unos compuestos análogos a éstas. Unas sales de un grupo carboxilo pueden ser formadas por unos medios conocidos en la especialidad e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de zinc, y similares, y sales con bases orgánicas tal como las formadas, por ejemplo, con unas aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales por adición de ácidos incluyen, por ejemplo, sales con ácidos inorgánicos, 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 dichas sales debe de retener la actividad biológica de las proteínas (IFN-beta) relevantes para el presente invento, es decir la capacidad de fijarse al correspondiente receptor e iniciar la señalización del receptor.

De acuerdo con el presente invento, es aun más particularmente preferido el uso de un IFN-beta humano recombinante y de los compuestos del invento.

45 Una clase especial de variante de interferón ha sido descrita recientemente. Los denominados "interferones de consenso" son unas variantes de IFN no presentes en la naturaleza (documento US 6.013.253). De acuerdo con una forma preferida de realización del invento, los compuestos del invento se usan en combinación con un interferón de consenso.

50 Tal como se usa en el presente contexto, un interferón de consenso humano (IFN-con) significará un polipéptido no presente en la naturaleza, que predominantemente incluye aquellos residuos de aminoácidos que son comunes para un subconjunto de IFN-alfas representativos de la mayoría de las secuencias de subtipos de interferones de leucocitos humanos que se presentan en la naturaleza y que incluyen, en una o más de aquellas posiciones en las

que no hay un aminoácido común para todos los subtipos, un aminoácido que predominantemente se presenta en esa posición y en ningún caso incluye cualquier residuo de aminoácido que no sea existente en esa posición en por lo menos un subtipo presente en la naturaleza. El IFN-con abarca, pero no está limitado a, las secuencias de aminoácidos designadas por IFN-con1, IFN-con2 y IFN-con3 que se describen en los documentos U.S. 4.695.623, 4.897.471 y 5.541.293. Unas secuencias de ADN que codifican un IFN-con se pueden producir tal como se ha descrito en las patentes antes mencionadas, o por otros métodos clásicos.

En otra forma preferida de realización, la proteína fusionada comprende una fusión de una Ig. La fusión puede ser directa, o producida a través de un corto péptido engarzador que puede ser tan corto como con una longitud de 1 a 3 residuos de aminoácidos o más largo, por ejemplo con una longitud de 13 residuos de aminoácidos. Dicho engarzador puede ser un tripéptido de la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia de engarzador de 13 aminoácidos Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introducida dentro de la secuencia de un IFN-beta, y la secuencia de inmunoglobulina. La resultante proteína de fusión puede tener propiedades mejoradas, tal como un prolongado período de tiempo de permanencia en fluidos corporales (semi vida), una actividad específica aumentada, un nivel de expresión aumentado, o se facilita la purificación de la proteína de fusión.

En otra forma de realización preferida, un IFN-beta es fusionado con la región constante de una molécula de Ig. De manera preferida, es fusionado con unas regiones de cadenas pesadas, tales como los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana, por ejemplo. Otras isoformas de moléculas de Ig son también apropiadas para la generación de proteínas de fusión de acuerdo con el presente invento, tales como las isoformas IgG2, IgG3 o IgG4, u otras clases de Ig, tales como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión puede ser monoméricas o multiméricas, hetero- u homomultiméricas.

En otra forma de realización preferida, el derivado funcional comprende por lo menos un resto unido a uno o más grupos funcionales, que aparece(n) como una o más cadenas laterales en los residuos de aminoácidos. De manera preferida, el resto es un resto de poli(etilen glicol) (PEG). Una PEGilación se puede llevar a cabo por métodos conocidos, tales como los que han sido descritos por ejemplo en el documento de solicitud de patente internacional WO99/55377.

La dosificación administrada, en forma de una sola dosis o de múltiples dosis, a un individuo variará dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, la ruta de administración, las condiciones y las características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), la extensión de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado.

Unas dosificaciones normalizadas de IFN-beta humano varían entre 80 000 UI/kg y 200.000 UI/kg por día o entre 6 MUI (millones de unidades internacionales) y 12 MUI por persona y por día o entre 22 y 44 µg (microgramos) por persona. De acuerdo con el presente invento, un IFN-beta puede ser administrado de manera preferida en una dosificación de alrededor de 1 a 50 µg, de manera más preferida de alrededor de 10 a 30 µg o de alrededor de 10 a 20 µg por persona y por día.

La administración de los ingredientes activos de acuerdo con el presente invento puede efectuarse por una ruta intravenosa, intramuscular o subcutánea. La ruta preferida de administración para un IFN-beta es la ruta subcutánea.

Un IFN-beta se puede administrar diariamente o una vez cada dos días o con menos frecuencia. De manera preferida un IFN-beta es administrado una vez, dos veces o tres veces por semana.

La ruta preferida de administración es una administración por vía subcutánea, administrada p.ej. tres veces por semana. Otra ruta preferida de administración es la administración por vía intramuscular, que puede ser p.ej. aplicada una vez por semana.

De manera preferida, se administran de 22 a 44 µg o de 6 MUI a 12 MUI de IFN-beta tres veces por semana por inyección subcutánea.

Un IFN-beta se puede administrar por vía subcutánea, en una dosificación de 25 a 30 µg o 8 MUI a 9,6 MUI, una vez cada dos días. 30 µg o 6 MUI de IFN-beta se pueden administrar adicionalmente por vía intramuscular una vez por semana.

El término "estabilidad" se refiere a la estabilidad física, química y conformacional de las formulaciones de interferón del presente invento (lo que incluye el mantenimiento de la potencia biológica). La inestabilidad de una formulación de proteína puede ser causada por una degradación o aglomeración de las moléculas de proteínas para formar unos polímeros de mayor orden, una desglucosilación, una modificación de la glucosilación, una oxidación o cualquier otra

modificación estructural que reduzca por lo menos una actividad biológica de un polipéptido de interferón incluido en el presente invento.

Una solución o formulación “estable” es una en la que el grado de degradación, modificación, aglomeración, pérdida de actividad biológica y fenómenos similares, de proteínas presentes en ella se controle de una manera aceptable, y no aumente de una manera inaceptable en el transcurso del tiempo. De manera preferida, la formulación retiene por lo menos un o alrededor de 60 %, de manera más preferida por lo menos un o alrededor de 70 %, de manera sumamente preferida por lo menos un o alrededor de 80 % de la actividad del interferón marcado durante un período de desde 12 a 24 meses. Las composiciones de IFN-beta exentas de HSA, estabilizadas, del invento tienen de manera preferida una vida útil de por lo menos alrededor de 6 meses, 12 meses, 18 meses, de manera más preferida de por lo menos 20 meses, de manera todavía más preferida de por lo menos alrededor de 22 meses, de manera sumamente preferida de por lo menos alrededor de 24 meses cuando se almacenan a 2-8°C.

Unos métodos para vigilar la estabilidad de las composiciones farmacéuticas de IFN-beta, exentas de HSA, están disponibles en la especialidad, incluyendo los métodos que se describen en los ejemplos aquí divulgados. Por lo tanto, la formación de aglomerados de IFN-beta durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida del invento se puede determinar con facilidad midiendo el cambio en IFN-beta soluble en solución en el transcurso del tiempo. La cantidad de un polipéptido soluble en solución puede ser cuantificada por un cierto número de ensayos analíticos adaptados para la detección de un IFN-beta. Dichos ensayos influyen, por ejemplo, una espectroscopia (RP)-HPLC (cromatografía de fase líquida de alto rendimiento de fase inversa (polimerasa inversa) y una espectroscopia de absorción de rayos UV, tal como se describen en los Ejemplos presentados seguidamente.

La determinación de aglomerados tanto solubles como insolubles durante un almacenamiento en formulaciones líquidas se puede conseguir, por ejemplo, usando una ultracentrifugación analítica, tal como se señala en los Ejemplos siguientes con el fin de distinguir entre la porción del polipéptido soluble que está presente en forma de aglomerados solubles y la porción que está presente en la forma molecular biológicamente activa no aglomerada.

La expresión “uso de múltiples dosis” se pretende que incluya el uso de un/una vial, ampolla o cartucho único/a de una formulación de interferón para más de una inyección, por ejemplo para 2, 3, 4, 5, 6 o más inyecciones. Las inyecciones se hacen de manera preferida durante un periodo de por lo menos de o alrededor de 12 horas, 24 horas, 48 horas, etc., de manera preferida en un período de o alrededor de 12 días. Las inyecciones pueden ser espaciadas en el tiempo, por ejemplo, por un período de tiempo de 6, 12, 24, 48 o 72 horas.

El término “tampón” o “tampón fisiológicamente aceptable” se refiere a unas soluciones de compuestos que se conocen por ser seguras para el uso farmacéutico o veterinario en unas formulaciones y que tienen el efecto de mantener o controlar el pH de la formulación dentro del intervalo de valores del pH, deseado para la formulación. Unos tampones apropiados para controlar el pH desde un pH moderadamente ácido a un pH moderadamente básico incluyen, pero no se limitan a, unos compuestos tales como fosfatos, acetatos, citratos, arginina, TRIS e histidina. El término “TRIS” se refiere al 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol y a cualquier sal farmacológicamente aceptable del mismo. Unos tampones preferibles son los tampones de acetatos con una solución salina o una sal aceptable.

Un “agente de isotonicidad” es un compuesto que es tolerado fisiológicamente y que confiere una tonicidad apropiada a una formulación con el fin de evitar la circulación neta de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con la formulación. Unos compuestos, tales como glicerol, se usan corrientemente para tales finalidades en unas concentraciones conocidas. Otros apropiados agentes de isotonicidad incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos o proteínas (p.ej. glicina o albúmina), sales (p.ej. cloruro de sodio) y azúcares (p.ej. dextrosa, manitol, sacarosa y lactosa). De manera preferida, el agente de isotonicidad es manitol.

El término “agente antioxidante” se refiere a un compuesto que impide que unos radicales libres de oxígeno o de derivados de oxígeno interactúen con otras sustancias. Los agentes antioxidantes se encuentran entre un cierto número de excipientes corrientemente añadidos a los sistemas farmacéuticos para intensificar la estabilidad física y química. Los agentes antioxidantes son añadidos para reducir al mínimo o retardar los procesos de oxidación que aparecen con algunos fármacos o excipientes después de una exposición al oxígeno o en la presencia de radicales libres. Estos procesos pueden ser catalizados frecuentemente por la luz, la temperatura, el hidrógeno sobre la concentración, la presencia de metales trazas o por los peróxidos. Se usan frecuentemente en fármacos como agentes antioxidantes sulfitos, bisulfitos, tiourea, metionina, sales del ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), hidroxitolueno butilado (BHT), e hidroxianisol butilado (BHA). Se ha encontrado que la sal de sodio del EDTA aumenta la actividad de los agentes antioxidantes por formación de quelatos con unos iones metálicos que en caso contrario catalizarían la reacción de oxidación. El agente antioxidante de acuerdo con el presente invento es metionina.

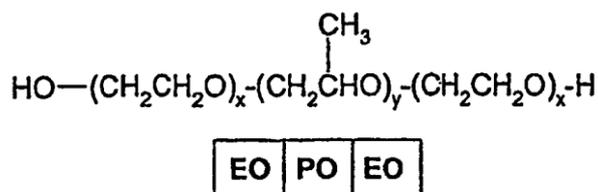
El término “bacteriostático” se refiere a un compuesto o a unas composiciones que se añaden a una formulación para actuar como un agente antibacteriano. Una formulación conservada que contiene interferón del presente invento cumple de manera preferida las pautas estatutarias o reguladoras para que la efectividad conservadora sea

un método de usos múltiples que sea viable comercialmente. Unos ejemplos de agentes bacteriostáticos incluyen fenol, *m*-cresol, *p*-cresol, *o*-cresol, cloro-cresol, alcohol bencílico, alquil-parabenos (de metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal. De manera preferida, el agente bacteriostático es alcohol bencílico.

5 El término "agente tensioactivo" se refiere a un compuesto soluble que reduce la tensión superficial de 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. Se han usado algunas veces agentes tensioactivos en las formulaciones farmacéuticas, incluyendo el suministro de fármacos y polipéptidos de baja masa molecular, con el fin de modificar la absorción del fármaco o su suministro a los tejidos
10 dianas. Unos agentes tensioactivos bien conocidos incluyen los polisorbatos (derivados de poli(oxietileno); Tween) así como Pluronic.

De acuerdo con el invento, se ha encontrado que formulando un interferón beta con Pluronic® F68 (de BASF, el Pluronic F68 es conocido también como Poloxamer 188) se obtienen unas formulaciones estables que reducen al mínimo la pérdida de principio activo causada por una adsorción sobre las superficies del vial y/o del dispositivo de suministro (p.ej. una jeringa, una bomba, un catéter, etc.). Se ha encontrado también que formulando un interferón
15 beta con Pluronic® F68 (de BASF, el Pluronic F68 es conocido también como Poloxamer 188) se obtiene una formulación estable, que es más resistente a la oxidación y a la formación de aglomerados de proteínas.

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



20

Los agentes tensioactivos Pluronic® son sintetizados en un proceso de dos etapas:

1. Un bloque hidrófobo con el deseado peso molecular se crea mediante la adición controlada de óxido de propileno a los dos grupos hidroxilo del propileno glicol; y
2. Se añade óxido de etileno para emparedar el bloque hidrófobo entre grupos hidrófilos.

25 En el Pluronic F68, el porcentaje de poli(oxietileno) (bloque hidrófilo) es de 80 %, y el peso molecular del bloque hidrófobo (poli(oxipropileno)) es de aproximadamente 1.967 Da.
HLB (balance de hidrófilo-lipófilo): 25

Se enumeran seguidamente unas típicas propiedades del Pluronic® F87:

- 30 Peso molecular medio: 7.700;
Punto de fusión/de vertido: 49°C ;
Forma física @ 20°C : sólida;
Viscosidad (según Brookfield) cps: 700 [líquidos a 25°C, pastas a 60°C y sólidos a 77°C];
Tensión superficial, dinas/cm @ 25°C;
35 en la conc. de 0,1 %: 44,0
en la conc. de 0,01 % : 47,0
en la conc. de 0,001%: 50,2
Tensión interfacial, dinas/cm @ 25°C frente a Nujol;
40 en la conc. de 0,1 %: 17,4
en la conc. de 0,01 %: 20,3
en la conc. de 0,01 %: 23,3
Humedecimiento según Draves, segundos a 25°C
en la conc. de 1,0 %: > 360
en la conc. de 0,1 %: > 360
45 Altura de la espuma
según Ross Miles, 0,1 %, mm @ 50°C: 80
según Ross Miles, 0,1 %, mm @ 26°C: 37
según Dynamic, 0,1 %, mm @ 400 ml/min: > 600
Punto de enturbiamiento en una solución acuosa, °C
50 en la conc. de 1 %: >100
en la conc. de 10%: >100

HLB (balance hidrófilo-lipófilo): 24

Se enumeran seguidamente unas típicas propiedades del Pluronic F88:

- Peso molecular medio: 11.400;
- 5 Punto de fusión/de vertido: 54°C ;
 Forma física @ 20°C: sólida;
- Viscosidad (según Brookfield) cps: 2.300 [líquidos a 25°C, pastas a 60°C y sólidos a 77°C];
- Tensión superficial, dinas/cm @ 25°C;
- 10 en la conc. de 0,1 % : 48,5
 en la conc. de 0,01 % : 52,6
 en la conc. de 0,001 % : 55,7

Se enumeran seguidamente unas típicas propiedades del Pluronic F68:

- Peso molecular medio: 8.400;
- Punto de fusión/de vertido: 52°C;
- 15 Forma física @ 20°C : sólida;
- Viscosidad (según Brookfield) cps: 1.000 [líquidos a 25°C, pastas a 60°C y sólidos a 77°C];
- Tensión superficial, dinas/cm @ 25°C;
- en la conc. de 0,1 % : 50,3
 en la conc. de 0,01 % : 51,2
 20 en la conc. de 0,001 % : 53,6
- Tensión interfacial, dinas/cm @ 25°C frente a Nujol;
- en la conc. de 0,1 % : 19,8
 en la conc. de 0,01 % : 24,0
 en la conc. de 0,001 % : 26,0
- 25 Humedecimiento según Draves, segundos a 25°C
 en la conc. de 1,0 % : > 360
 en la conc. de 0,1 % : > 360
- Altura de la espuma
- según Ross Miles, 0,1 %, mm @ 50°C: 35
 según Ross Miles, 0,1 %, mm @ 26°C: 40
 según Dynamic, 0,1 %, mm @ 400 ml/min: > 600
- Punto de enturbiamiento en una solución acuosa, °C
 en la conc. de 1% : >100
 en la conc. de 10 % : >100
- 35 HLB (balance hidrófilo-lipófilo): 29

El agente tensioactivo de acuerdo con el presente invento es el Pluronic® F68 (Poloxamer 188).

- 40 El Pluronic® F68 está presente de manera preferida en una concentración que es suficiente para mantener la estabilidad de un interferón beta durante el deseado período de tiempo de almacenamiento (por ejemplo de 12 a 24 meses), y también en una concentración que es suficiente para evitar unas pérdidas de proteínas debidas a la adsorción sobre unas superficies tales como las del vial, la ampolla o el cartucho o la jeringa.

De manera preferida, la concentración de Pluronic® F68 en formulaciones líquidas es de 0,01 mg/ml a 10 mg/ml, de manera más preferida de 0,05 mg/ml a 5 mg/ml, de manera más particularmente preferida de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml, y de manera sumamente preferida de 1 mg/ml.

- 45 De manera preferida, la concentración de IFN-beta en la formulación es de 10 µg/ml a 800 µg/ml, de manera más preferida de 20 µg/ml a 500 µg/ml, de manera más particularmente preferida de 30 a 300, de manera sumamente preferida de 22, 44, 88 o 264 µg/ml.

- 50 De manera preferida, las formulaciones del presente invento tienen un pH comprendido entre aproximadamente 3,0 y a o alrededor de 5,0, de manera más preferida a $3,5 \pm 0,2$ o $4,5 \pm 0,2$. Un tampón preferido es de acetato, siendo iones de signo contrario preferidos los iones de sodio o de potasio. Unos tampones de acetato y solución salina son bien conocidos en la especialidad. Las concentraciones del tampón en la solución total pueden variar entre 5 mM, 9,5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM y 500 mM. De manera preferida, la concentración del tampón es de 10 mM. Es particularmente preferido un tampón 10 mM en iones de acetato con un pH de $3,5 \pm 0,2$ o de $4,5 \pm 0,2$.

- 55 De manera preferida, en la composición del invento el agente antioxidante metionina está presente en una concentración de 0,01 a 5,0 mg/ml, de manera más preferida entre 0,05 y 0,3 mg/ml, de manera sumamente preferida de 0,1 mg/ml.

De manera preferida, la concentración del agente de isotonicidad (por ejemplo manitol) en formulaciones líquidas es de 0,5 mg/ml a 500 mg/ml, de manera más preferida de 1 mg/ml a 250 mg/ml, de manera más particularmente preferida de 10 mg/ml a 100 mg/ml, de manera sumamente preferida de 55 mg/ml.

El invento incluye unas formulaciones líquidas. El disolvente preferido es agua para inyección.

- 5 Las formulaciones líquidas pueden ser de una sola dosis o de múltiples dosis. Las formulaciones líquidas de interferón beta del invento, que están destinadas a un uso con múltiples dosis, comprenden de manera preferida un agente bacteriostático, tal como fenol, *m*-cresol, *p*-cresol, *o*-cresol, cloro-cresol, alcohol bencílico, alquil-parabenos (con metilo, etilo, propilo, butilo y radicales similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal. Son particularmente preferidos fenol, alcohol bencílico y *m*-cresol, el más preferido es alcohol bencílico. El agente bacteriostático se usa en una cantidad que proporcionará una concentración que sea efectiva para mantener a la formulación esencialmente exenta de bacterias (apropiada para administrar una inyección) durante el período de inyección de múltiples dosis, que puede ser desde en o alrededor de 12 o 24 horas hasta en o desde alrededor de 12 días, de manera preferida desde en o alrededor de 6 hasta en o alrededor de 12 días. El agente bacteriostático está presente de manera preferida en una concentración de 0,1 % (masa de agente bacteriostático/masa de disolvente) a 2,0 %, de manera más preferida de 0,2 % a 1,0 %. En el caso del alcohol bencílico, se prefieren particularmente unas concentraciones de 0,2 o 0,3 %. Sin embargo, el uso de un agente conservante, p.ej. alcohol bencílico, no está limitado a formulaciones de múltiples dosis, sino que éste puede ser añadido también a formulaciones de una sola dosis.

- 20 El intervalo de concentraciones de interferón beta en las formulaciones del invento incluye unas cantidades que proporcionan, después de su reconstitución, unas concentraciones de desde aproximadamente 1,0 µg/ml hasta aproximadamente 50 µg/ml, aunque unas concentraciones más bajas y más altas son operativas y son dependientes del vehículo de suministro pretendido, p.ej. las formulaciones de soluciones diferirán entre un parche transdérmico, la vía pulmonar, la vía transmucosal o métodos osmóticos o de micro bombas. La concentración de interferón está de manera preferida desde en alrededor de 5,0 µg/ml hasta en o alrededor de 2 mg/ml, de manera más preferida desde en o alrededor de 10 µg/ml hasta en o alrededor de 1 mg/ml, de manera sumamente preferida desde en o alrededor de 30 µg/ml hasta en o alrededor de 100 µg/ml.

De manera preferida, las formulaciones del invento retienen por lo menos un o alrededor de 60 %, de manera más preferida por lo menos un o alrededor de 70 %, de manera sumamente preferida por lo menos un o alrededor de 80 % de la actividad de interferón existente en el momento de envasar por un período de tiempo de 24 meses.

- 30 En otra forma de realización adicional preferida, el invento proporciona un método para producir una composición farmacéutica líquida como anteriormente se ha descrito.

Todavía en otra forma de realización preferida, el invento proporciona un método para la producción de una composición farmacéutica envasada, que comprende colocar una solución que comprende el ingrediente activo y los excipientes tal como se ha descrito anteriormente.

- 35 Todavía en otra forma de realización preferida, el invento proporciona un artículo de manufactura para el uso farmacéutico humano, que comprende un vial que comprende las composiciones farmacéuticas que anteriormente se han descrito, y un material escrito que señala que dicha solución puede ser mantenida durante un período de tiempo de o alrededor de veinticuatro horas o mayor después del primer uso. De manera preferida, el material escrito señala que la solución puede ser mantenida hasta en o alrededor de 12 días.

- 40 Después del primer uso de una formulación de múltiples dosis, ella puede ser mantenida y usada durante al menos en o alrededor de 24 horas, de manera preferida por lo menos en o alrededor de 4, 5 o 6 días, de manera más preferida durante hasta 12 días. Después del primer uso de la formulación ésta se almacena de manera preferida por debajo de la temperatura ambiente (es decir, por debajo de o alrededor de 25°C), de manera más preferida por debajo de alrededor de 10°C, de manera más preferida de o alrededor de 2-8°C, de manera sumamente preferida de o alrededor de 4-6°C.

Las formulaciones del presente invento se pueden preparar por un procedimiento que comprende añadir las cantidades calculadas de los excipientes a la solución tamponada y luego añadir el interferón beta.

- 50 La solución resultante es luego colocada dentro de viales, ampollas o cartuchos. Unas variaciones de este proceso podrían ser reconocidas por una persona con experiencia ordinaria en la especialidad. Por ejemplo, el orden en que se añaden los componentes, el hecho de si se usan aditivos adicionales, la temperatura y el pH con el que se prepara la formulación, son todos ellos unos factores que pueden ser optimizados para la concentración y los medios de administración que se usan.

En el caso de una formulación para el uso de múltiples dosis, el agente bacteriostático puede ser añadido a la solución que contiene el ingrediente activo (interferón) o alternativamente se puede mantener dentro de un vial o cartucho dispuesto por separado y subsiguientemente se puede mezclar con la solución que contiene el ingrediente activo en el momento del uso.

- 5 Las formulaciones del invento se pueden administrar usando unos dispositivos reconocidos. Unos ejemplos que comprenden estos sistemas de vial único incluyen unos dispositivos auto-inyectores o inyectores de pluma estilográfica para el suministro de una solución tal como Rebiject®.

10 Los productos actualmente reivindicados incluyen un material de envasado. El material de envasado proporciona, además de la información requerida por las agencias reguladoras, las condiciones en las que se puede usar el producto. El material de envasado del presente invento proporciona al paciente instrucciones, si es que se necesitan, para preparar la solución final y para el uso de dicha solución final durante un período de veinticuatro horas o mayor para el producto húmedo/seco en los dos viales. Para el producto en forma de una solución de vial único, la etiqueta indica que dicha solución puede ser usada durante un período de tiempo de veinticuatro horas o mayor. Los productos actualmente reivindicados son útiles para su uso como un producto farmacéutico para seres humanos.

15 Las formulaciones conservadas y estables pueden ser proporcionadas a los pacientes en forma de soluciones transparentes. La solución puede ser para un único uso o se puede volver a usar múltiples veces y puede ser suficiente para un único ciclo o múltiples ciclos de tratamiento del paciente y proporciona por lo tanto un régimen de tratamiento más conveniente que el actualmente disponible.

- 20 El interferón beta en cualquiera de las formulaciones o soluciones estables o conservadas que aquí se describen, puede ser administrado a un paciente de acuerdo con el presente invento a través de una diversidad de métodos de suministro que incluyen una inyección por vía SC o IM; transdérmica, pulmonar, transmucosal, por implante, bomba osmótica, cartucho, micro bomba, por vía oral, o por otros medios apreciados por el profesional experto, tal como es bien conocido y reconocido en la especialidad.

- 25 El término "vial" se refiere ampliamente a un depósito apropiado para retener al interferón beta en una forma sólida o líquida en un estado estéril contenido. Ejemplos de un vial, como se usa en el presente contexto, incluyen ampollas, cartuchos, envases blister, u otros recipientes que son apropiados para el suministro del interferón al paciente por medio de una jeringa, una bomba (incluyendo la osmótica), un catéter, un parche transdérmico y una atomización por vía pulmonar o transmucosal. Los viales apropiados para envasar productos destinados a una administración por vía parenteral, pulmonar, transmucosal o transdérmica son bien conocidos y reconocidos en la especialidad.

30 El término "tratamiento" dentro del contexto de este invento, se refiere a cualquier efecto beneficioso al progresar una enfermedad, incluyendo una atenuación, una reducción, una disminución o una minimización del desarrollo patológico después del comienzo de una enfermedad.

- 35 Las composiciones farmacéuticas del invento, que comprenden un IFN-beta o una isoforma, una muteína, una proteína fusionada, un derivado funcional, una fracción activa o una sal, son útiles en el diagnóstico, la prevención y el tratamiento (por vía local o sistémica) de unas indicaciones clínicas que responden una terapia con este polipéptido. Dichas indicaciones clínicas incluyen, por ejemplo, trastornos o enfermedades del sistema nervioso central (SNC), del cerebro y/o la columna espinal, incluyendo una esclerosis múltiple; enfermedades autoinmunitarias, incluyendo una artritis reumatoide, una psoriasis, la enfermedad de Crohn; y unos cánceres incluyendo los de mama, próstata, vejiga, riñón y colon.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 45 Figura 1: Ella informa sobre el porcentaje de formas oxidadas, que están presentes en formulaciones de múltiples dosis de interferón beta-1a que tienen diferentes concentraciones de alcohol bencílico después de un almacenamiento a 40°C.

- 50 Figura 2: Ella informa sobre el porcentaje de formas oxidadas, que están presentes en formulaciones de múltiples dosis de interferón beta-1a que tienen diferentes concentraciones de alcohol bencílico después de un almacenamiento a 25°C.

Figura 3: Ella informa sobre el porcentaje de formas oxidadas, que están presentes en formulaciones de múltiples dosis de interferón beta-1a que tienen diferentes concentraciones de alcohol bencílico después de un almacenamiento a 2-8°C.

- 55 Figura 4: Ella informa sobre el porcentaje de aglomerados totales, que están presentes en formulaciones de múltiples dosis de interferón beta-1a que tienen diferentes concentraciones de alcohol bencílico después de un almacenamiento a 40°C.

Figura 5: Ella informa sobre el porcentaje de aglomerados totales, que están presentes en formulaciones de múltiples dosis de interferón beta-1a que tienen diferentes concentraciones de alcohol bencílico después de un almacenamiento a 25°C.

5 Figura 6: Ella informa sobre el porcentaje de aglomerados totales, que están presentes en formulaciones de múltiples dosis de interferón beta-1a que tienen diferentes concentraciones de alcohol bencílico después de un almacenamiento a 2-8°C.

10 Figura 7: Ella muestra el porcentaje de formas oxidadas, que están presentes en formulaciones de múltiples dosis de interferón beta-1a que contienen agentes bacteriostáticos alternativos después de un almacenamiento a 25°C.

Figura 8: Ella muestra el porcentaje de formas oxidadas, que están presentes en formulaciones de múltiples dosis de interferón beta-1a que contienen agentes bacteriostáticos alternativos después de un almacenamiento a 2-8°C.

15 Figura 9: Ella informa sobre el porcentaje de aglomerados totales, que están presentes en formulaciones de múltiples dosis de interferón beta-1a que contienen agentes bacteriostáticos alternativos.

20 Figura 10: Ella informa sobre el porcentaje de formas oxidadas, que están presentes en formulaciones de múltiples dosis de interferón beta-1a que contienen EDTA después de un almacenamiento a 25°C.

Figura 11: Ella informa sobre el porcentaje de aglomerados totales, que están presentes en formulaciones de múltiples dosis de interferón beta-1a que contienen EDTA después de un almacenamiento a 25°C.

25 Figura 12: Ella muestra la efectividad de la L-metionina al 0,012 % como agente antioxidante (a 2-8°C)

Figura 13: Ella muestra la efectividad de L-metionina al 0,012 % como agente antioxidante (a 25 ± 2°C).

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Formulación líquida de interferón beta-1a, de una sola dosis, exenta de HSA, en unas jeringas previamente llenadas

1.1 Estudios de compatibilidad preliminares

Unos experimentos preliminares se realizaron con el fin de verificar el efecto protector mostrado por algunos excipientes tales como agentes antioxidantes y tensioactivos, puesto que se esperaba que la eliminación de la albúmina de suero humano (HSA) a partir del producto actual pudiera haber afectado al producto en términos de oxidación, formación de aglomerados y adsorción a superficies.

40 El interferón beta-1a fue formulado en unas concentraciones de 44 mcg/ml y 88 mcg/ml en un tampón de acetato de sodio que contenía 54,6 mg/ml de manitol en combinación con varios excipientes tales como HSA al 0,4 %, L-metionina al 0,012 %, Tween 20 (al 0,005 %, 0,007 %, 0,01 %), Poloxamer 188 (al 0,05 %, 0,1 %, 0,5 %). Las diferentes combinaciones fueron expuestas a condiciones estresantes (ya sea un almacenamiento a 40°C o un tratamiento con vórtice) y ensayadas en cuanto a una oxidación (por una RP-HPLC = de fase inversa) y por una aglomeración (por una SE-HPLC = con exclusión de tamaños).

45 Las Tablas DEP-1 y -2 recopilan los niveles de oxidación y de aglomeración después de un almacenamiento a 40°C durante 2 semanas. La combinación del interferón beta-1a con ambos agentes tensioactivos ensayados (Tween 20 y Poloxamer 188) dio como resultado un aumento en el nivel de oxidación que, para cada tipo de agente tensioactivo, es dependiente de la concentración (Tabla DEP-1, combinaciones #4-6 y #7-9); en un nivel de 0,5 % de Poloxamer 188 (también mencionado como Pluronic F-68 o F-68), la sustancia de fármaco es degradada por completo (Tabla DEP-1, #9). Una mayor tasa de degradación se observa para el Tween 20, como se esperaba, debido a las especies químicas oxidantes (p.ej. peróxidos) que pueden estar presentes como residuos procedentes de la síntesis.

50 Ambos agentes tensioactivos en las diferentes concentraciones ensayadas no influyen sobre el nivel de la aglomeración después de un almacenamiento a 40°C (Tabla DEP-2).

Tabla DEP-1: Formas oxidadas (%) por una RP-HPLC después de un almacenamiento a 40°C

		T = 0	2 semanas
#1	IFN 44	3,0	6,5
#2	IFN 44 mcg + 0,4 % de HSA (actual)	2,4	5,5
#3	IFN 44 mcg + 0,012 % de L-Met	3,9	6,2
#4	IFN 44 mcg	3,5	6,0
#5	IFN 44 mcg	3,4	7,0
#6	IFN 44 mcg	3,5	8,7
#7	IFN 44 mcg	3,5	6,9
#8	IFN 44 mcg	3,3	8,0
#9	IFN 44 mcg	3,3	n.m.
#10	IFN 44 mcg + 0,012 % de L-Met + 0,007 % de Tween 20	3,5	6,9
#11	IFN 44 mcg + 0,012 % de L-Met	3,5	7,6

n.m. = no medible, puesto que está completamente aglomerado

Tabla DEP-2: Aglomerados totales (%) por una SE-HPLC después de un almacenamiento a 40°C

5

		T = 0	2 semanas
#1	IFN 44 mcg	2,6	2,8
#4	IFN 44 mcg	2,4	2,1
#5	IFN 44 mcg	2,8	2,0
#6	IFN 44 mcg	2,6	2,0
#7	IFN 44 mcg	2,5	2,9
#8	IFN 44 mcg	2,5	2,5
#9	IFN 44 mcg	2,6	2,9

La Tabla DEP-3 muestra que ambos agentes tensioactivos, el Tween 20 y el Poloxamer 188 (F-68), usados en su Concentración Micelar Crítica (CMC), ayudan a impedir una aglomeración inducida por un tratamiento con vórtice durante 5 min.

10 Tabla DEP-3: Aglomerados totales (%) por una SE-HPLC después de un tratamiento con vórtice durante 5 min

		T = 0	5' con vórtice
#1	IFN 44 mcg	1,6	2,5
#3	IFN 44 mcg + 0,012 % de L-Met	1,4	2,4
#10	IFN 44 mcg + 0,012 % de L-Met + 0,007 % de Tween 20	1,4	1,3
#11	IFN 44 mcg + 0,012 % de L-Met + 0,1 % de F-68	1,3	1,3

1.1.1 Características físico-químicas

15

Las características físico-químicas, de las que se sabe que son críticas para la calidad del producto de fármaco, son la magnitud de la oxidación y la cantidad de dímeros/aglomerados. Estas características han sido consideradas en los estudios de compatibilidad, recopilados anteriormente.

20 1.2 Excipientes

1.2.1 Tampón de acetato de sodio 10 mM, de pH 3,5

25

Un tampón de acetato de sodio 10 mM a un pH de 3,5, que contiene 54,6 mg/ml de manitol como agente de isotonicidad, estabiliza al producto, como se muestra durante el desarrollo previo para el producto actualmente comercializado (Rebif®) y tal como se describe en el documento EP 759.775.

1.2.2 Poloxamer 188

30

El Poloxamer 188 (o Pluronic F-68) está incluido en la formulación en un nivel de 0,1 % (Concentración Micelar Crítica) con el fin de impedir una adsorción de la sustancia de fármaco por la superficie de los recipientes durante el proceso de producción; unas concentraciones más altas pueden afectar negativamente a la estabilidad del producto (por una oxidación más alta); unas concentraciones más bajas pueden ser menos efectivas para limitar la adsorción.

35

La efectividad del Poloxamer 188 para impedir una adsorción de la sustancia de fármaco durante el proceso de producción fue demostrada con el siguiente estudio: Unas soluciones que contenían 44 mcg/ml de interferón beta-1a fueron combinadas con 3 concentraciones diferentes de un agente tensioactivo (Tween 20 o Poloxamer 188) o de un HSA, limitando al proceso de producción; las muestras fueron tomadas en diferentes etapas (de composición, filtración aséptica, llenado) y ensayadas por un método de RP-HPLC cuantitativa.

Se tomaron las siguientes muestras:

- antes de filtración (BF)
- después de una 1ª filtración (AF1)
- después de una 2ª filtración (AF2)
- después del llenado (producto acabado a T = 0)

Los resultados se informan en la Tabla DEP-4 y se expresan como recuperación (en %) frente al valor inicial (es decir, la solución formulada antes de la filtración): el Poloxamer 188 es más efectivo que el Tween 20, pero igual de efectivo que el HSA para impedir la adsorción de la sustancia de forma durante la producción.

Tabla DEP-4: % de recuperación de interferón beta-1a durante la producción

	No HSA/ no tensioactivo	HSA	0,003 % de Tween 20	0,007 % de Tween 20	0,02 % de Tween 20	0,05 % de F-68	0,1 % de F-68	0,2 % de F-68
AF1	97,8	97,5	98,2	97,7	99,1	98,3	98,6	98,9
AF2	94,5	97,3	96,3	96,6	97,6	97,0	98,4	98,3
T = 0	93,8	96,9	95,8	95,7	96,3	96,5	97,0	98,0

Diferentes calidades de Poloxamer 188, obtenidas a partir de diferentes suministradores. fueron investigadas en términos de los productos de oxidación después de unas condiciones aceleradas (2 semanas a 40°C) para definir la calidad que se ha de usar: El Poloxamer 188 procedente de BASF fue escogido puesto que él proporcionaba un nivel de oxidación más bajo y se suministraba como una calidad farmacéutica. Los resultados están recopilados en la Tabla DEP-5:

Tabla DEP-5 : % de formas oxidadas detectadas y en formulaciones que contienen 0,1 % de Poloxamer 188 (calidad y suministrador diferentes)

Suministrador	Calidad	T = 0	1 semana a 40°C	2 semanas a 40°C
BASF	Calidad farmacéutica	2,6	-	3,2
Fluka	Para GC	-	3,8	4,7
Sigma	Para bioquímica	-	3,2	4,4

1.2.3 L-metionina

La L-metionina (L-Met) es incluida en la formulación a un nivel de 0,012 % para limitar la oxidación. La efectividad en esta concentración es mostrada por medio de la comparación con una formulación que no contiene L-metionina; unas concentraciones más altas (0,05 %, 0,1 %) de L-metionina muestran un efecto comparable sobre la estabilidad. Los productos de oxidación detectados después de un almacenamiento a 40°C se muestran en la Tabla DEP-6.

Tabla DEP-6: % de formas oxidadas en formulaciones de interferón beta-1a que contienen diferentes niveles de L-metionina (L-Met)

	T = 0	1 semana a 40°C	4 semanas a 40°C
IFNβ-1a 44 mcg	2,8	3,8	7,6
IFNβ-1a 44 mcg + 0,012 % de L-Met	-	2,9	5,3
IFNβ-1a 44 mcg + 0,05 % de L-Met	-	3,0	5,1
IFNβ-1a 44 mcg + 0,1 % de L-Met	-	2,6	5,0

Durante el desarrollo de una formulación, la efectividad de la L-metionina como agente antioxidante fue confirmada por los datos de estabilidad durante 3 meses a 2-8°C y a 25 ± 2°C, generados en unas formulaciones con L-metionina en combinación con unos agentes tensioactivos: la L-metionina es efectiva como agente antioxidante en un nivel de 0,012 % y puede garantizar una estabilidad comparable con la observada para el actual producto (véanse las Figuras 12 y 13).

1.3 Producto de fármaco

1.3.1 Desarrollo de una formulación

El desarrollo de la nueva formulación de interferón beta-1a, exenta de HSA, se enfocó sobre la confirmación de los resultados de las investigaciones preliminares (efectividad de la L-metionina como agente antioxidante, inclusión de Poloxamer 188 para evitar pérdidas durante la producción) en el recipiente final.

Se prepararon unas soluciones de interferón beta-1a en unas cantidades de 44 mcg/ml y 88 mcg/ml, que contenían 54,6 mg/ml de manitol, en un tampón de acetato de sodio 10 mM a un pH de 3,5, y se incluyeron los siguientes excipientes:

- Tween 20 (0,003 %, 0,007 %, 0,02 %)
- Poloxamer 188 (0,05 %, 0,1 %, 0,2 %)
- L-metionina (0 %, 0,012 %)
- HSA (0,4 %, actual formulación, designada como "referencia")

La composición de las formulaciones que fueron investigadas se muestra en la Tabla DEP-7

Tabla DEP-7: Composición de las formulaciones que contienen interferón beta-1a

Formulación	IFN-β-1a (mcg)	Manitol (mg)	Tween 20 (mg)	Poloxamer 188 (mg)	HSA (mg)	L-metionina (mg)	Tampón de acetato 10 mM de pH 3,5
IFN-1	44	54,6	0,03	-	-	-	c.s. para 1 ml
IFN-2	44	54,6	0,07	-	-	-	c.s. para 1 ml
IFN-3	44	54,6	0,2	-	-	-	c.s. para 1 ml
IFN-4	44	54,6	-	0,5	-	-	c.s. para 1 ml
IFN-5	44	54,6	-	1	-	-	c.s. para 1 ml
IFN-6	44	54,6	-	2	-	-	c.s. para 1 ml
IFN-7 (ref)	44	54,6	-	-	4	-	c.s. para 1 ml
IFN-8	44	54,6	-	-	-	-	c.s. para 1 ml
IFN-9	44	54,6	0,2	-	-	0,12	c.s. para 1 ml
IFN-10	44	54,6	-	2	-	0,12	c.s. para 1 ml
IFN-11	88	54,6	-	1	-	0,12	c.s. para 1 ml

10 c.s. = lo suficiente

Las formulaciones se produjeron de acuerdo con el procedimiento que se describe seguidamente:

15 90 ml de cada una de las formulaciones se produjeron en condiciones asépticas, formulando la cantidad requerida de excipientes disueltos en WFI (acrónimo de Water For Injection = agua para inyección) con la sustancia de fármaco (interferón beta-1a); luego las formulaciones fueron filtradas a través de una membrana de 0,22 µm (filtradas dos veces a través de dos filtros de membranas) y 0,5 ml de cada solución se llenaron en jeringas de vidrio Hypak de 1 ml de capacidad. El tamaño de cada tanda fue de aproximadamente 180 jeringas.

Luego las formulaciones fueron almacenadas a 2-8°C, 25 ± 2°C y 40 ± 2°C, y ensayadas en cuando a su estabilidad durante hasta 12 semanas (durante hasta 6 semanas para las muestras almacenadas a 40 ± 2°C).

20 Los siguientes ensayos y métodos analíticos se usaron durante el desarrollo (para detalles sobre estos ensayos véase el Ejemplo 2):

- bioactividad (bioensayo CPE)
- ensayo (método de RP-HPLC)
- productos de oxidación (método de RP-HPLC)
- 25 - dímeros/aglomerados (métodos de SE-HPLC y SDS-PAGE)
- pH (método potenciométrico)
- osmolalidad (medición crioscópica)

Los resultados y su evaluación se recopilan en las tablas DEP-8 hasta DEP-17.

Tabla DEP-8 : Bioidentidad (MUI/ml)

2-8°C					
	Momento 0	4 Semanas	8 Semanas	12 Semanas	
IFN-1	11,7	12,4	11,6	11,0	
IFN-2	11,5	12,1	11,9	11,1	
IFN-3	11,3	10,0	9,9	9,7	
IFN-4	11,8	11,8	12,4	11,1	
IFN-5	12,1	12,3	12,6	11,6	
IFN-6	12,1	12,2	11,4	10,7	
IFN-7	12,1	12,4	12,6	11,1	
IFN 8	11,2	11,4	11,5	10,8	
IFN-9	11,2	12,4	12,7	11,9	
IFN-10	12,0	13,0	12,4	11,6	
25°C					
	Momento 0	2 Semanas	4 Semanas	8 Semanas	12 Semanas
IFN-1	11,7	11,2	11,5	11,0	10,7
IFN-2	11,5	11,8	11,3	11,1	10,7
IFN-3	11,3	10,7	10,6	10,4	8,9
IFN-4	11,8	10,8	11,8	12,2	11,6
IFN-5	12,1	12,3	12,5	12,0	10,9
IFN-6	12,1	12,9	12,0	11,5	10,5
IFN-7	12,1	11,2	12,7	12,8	11,3
IFN 8	11,2	11,1	11,5	11,6	10,9
IFN-9	11,2	11,0	12,1	11,5	10,9
IFN-10	12,0	11,7	11,8	12,5	11,6
40°C					
	Momento 0	2 Semanas	4 Semanas	6 Semanas	
IFN-1	11,7	9,4	9,4	9,6	
IFN-2	11,5	10,0	9,7	9,6	
IFN-3	11,3	7,8	7,2	6,0	
IFN-4	11,8	10,9	11,4	13,0	
IFN-5	12,1	12,1	13,1	12,1	
IFN-6	12,1	11,6	12,7	11,4	
IFN-7	12,1	11,0	12,2	12,0	
IFN 8	11,2	11,0	11,6	12,0	
IFN-9	11,2	10,1	9,1	7,1	
IFN-10	12,0	12,3	12,0	11,0	

5 Las pendientes calculadas mediante un análisis por regresión lineal y recopiladas en la Tabla DEP-9 muestran una disminución en la actividad biológica para todas las formulaciones que contienen Tween 20 (#1, 2, 3, 9) y almacenadas a 40°C; también se observa una disminución en la bioactividad para las formulaciones #3 y 6 (concentración más alta de agentes tensioactivos) después de un almacenamiento a 25°C y 2-8°C.

Tabla DEP-9: Análisis por regresión lineal para la bioidentidad (pendientes expresadas en MUI/ml x semana)

	IFN-1	IFN-2	IFN-3	IFN-4	IFN-5	IFN-6	IFN-7	IFN-8	IFN-9	IFN-10
2-8°C	-0,07	-0,04	-0,12	-0,04	-0,03	-0,13	-0,06	-0,03	0,06	-0,06
25°C	-0,08	-0,08	-0,17	0,03	-0,10	-0,17	-0,02	-0,01	-0,02	0,00
40°C	-0,32	-0,29	-0,83	0,20	0,05	-0,05	0,06	0,16	-0,67	-0,17

Tabla DEP-10: Ensayo (mcg/jeringa) por RP-HPLC

2-8°C					
	Momento 0	4 Semanas	8 Semanas	12 Semanas	
IFN-1	23,4	21,5	22,8	21,2	
IFN-2	22,9	21,4	22,2	21,1	
IFN-3	22,4	20,8	20,8	20,2	
IFN-4	22,9	22,4	23,1	21,2	
IFN-5	23,6	23,3	21,7	22,2	
IFN-6	23,1	21,4	22,9	21,2	
IFN-7	23,0	22,8	23,4	22,0	
IFN 8	21,2	20,0	23,5	20,0	
IFN-9	23,0	21,7	21,6	22,1	
IFN-10	22,8	22,6	22,7	23,2	
IFN-11	45,6	43,9	44,3	44,7	
25°C					
	Momento 0	2 Semanas	4 Semanas	8 Semanas	12 Semanas
IFN-1	23,4	20,5	20,7	20,7	20,1
IFN-2	22,9	21,2	19,8	20,8	19,7
IFN-3	22,4	19,9	19,1	17,6	16,6
IFN-4	22,9	21,5	22,2	22,5	21,1
IFN-5	23,6	23,4	23,0	23,6	21,4
IFN-6	23,1	22,6	20,7	22,0	20,5
IFN-7	23,0	23,1	22,9	23,2	22,6
IFN 8	21,2	20,8	19,8	20,8	19,7
IFN-9	23,0	20,5	20,2	18,2	18,6
IFN-10	22,8	22,2	22,6	22,0	22,3
IFN-11	45,6	45,2	44,6	43,4	44,8
40°C					
	Momento 0	2 Semanas	4 Semanas	6 Semanas	
IFN-1	23,4	18,8	17,8	16,6	
IFN-2	22,9	18,5	16,2	15,4	
IFN-3	22,4	15,1	11,2	10,4	
IFN-4	22,9	20,1	19,8	18,7	
IFN-5	23,6	21,8	21,0	19,6	
IFN-6	23,1	20,7	18,8	18,7	
IFN-7	23,0	20,6	18,8	16,7	
IFN 8	21,2	19,6	18,3	18,1	
IFN-9	23,0	16,8	12,7	13,1	
IFN-10	22,8	20,5	19,8	19,9	
IFN-11	45,6	43,4	41,5	40,1	

Las pendientes calculadas por un análisis por regresión lineal y recopiladas en la Tabla DEP-11 muestran una pérdida más alta en el contenido de proteínas para las formulaciones que contienen Tween 20 (#1, 2, 3, 9) almacenadas a 40°C; la misma tendencia se observa a 25°C así como para las formulaciones #5 y 6. Una disminución significativa del contenido de proteínas se produce a 2-8°C para las formulaciones #1, 2, 3 (con Tween 20), 4, 5 (con Poloxamer 188) y 9 (con Tween 20 y L-metionina).

5

Tabla DEP-11: Análisis por regresión lineal para el ensayo (pendientes expresadas como mcg/jeringa x semana)

	IFN-1	IFN-2	IFN-3	IFN-4	IFN-5	IFN-6	IFN-7	IFN-8	IFN-9	IFN-10	IFN-11
2-8°C	-0,13	-0,11	-0,16	-0,11	-0,14	-0,11	-0,06	0,00	-0,07	0,03	-0,06
25°C	-0,19	-0,20	-0,44	-0,09	-0,15	-0,18	-0,03	-0,09	-0,34	-0,04	-0,10
40°C	-1,10	-1,20	-2,00	-0,64	-0,64	-0,76	-1,00	-0,53	-1,70	-0,47	-0,92

Tabla DEP-12: % de formas oxidadas por RP-HPLC

2-8°C					
	Momento 0	4 Semanas	8 Semanas	12 Semanas	
IFN-1	2,8	2,8	3,3	3,4	
IFN-2	2,5	2,9	3,4	3,4	
IFN-3	2,7	3,0	4,2	4,5	
IFN-4	2,6	2,6	3,6	3,2	
IFN-5	2,8	2,8	3,6	3,2	
IFN-6	2,5	3,1	4,5	4,4	
IFN-7	1,5	1,5	1,7	1,3	
IFN 8	2,8	2,9	3,2	3,1	
IFN-9	3,3	3,4	3,4	3,6	
IFN-10	3,0	3,2	3,0	3,0	
IFN-11	2,6	2,9	2,9	2,9	
25°C					
	Momento 0	2 Semanas	4 Semanas	8 Semanas	12 Semanas
IFN-1	2,8	3,0	3,1	4,2	4,3
IFN-2	2,5	3,0	3,1	3,4	4,6
IFN-3	2,7	3,5	3,9	6,7	6,8
IFN-4	2,6	3,0	3,1	4,7	4,8
IFN-5	2,8	3,0	3,1	4,4	4,5
IFN-6	2,5	3,0	3,2	5,3	5,7
IFN-7	1,5	1,7	1,9	2,0	2,3
IFN 8	2,8	3,1	2,9	4,1	4,3
IFN-9	3,3	3,4	3,5	3,9	4,4
IFN-10	3,0	3,0	3,2	3,3	3,5
IFN-11	2,6	2,8	3,1	3,2	3,4
40°C					
	Momento 0	2 Semanas	4 Semanas	6 Semanas	
IFN-1	2,8	6,0	8,3	12,4	
IFN-2	2,5	3,7	8,7	10,7	
IFN-3	2,7	8,8	12,3	16,9	
IFN-4	2,6	4,1	6,7	10,3	
IFN-5	2,8	3,7	7,2	9,6	
IFN-6	2,5	4,9	7,6	13,3	
IFN-7	1,5	2,8	3,9	11,8	
IFN 8	2,8	3,8	7,6	10,7	
IFN-9	3,3	5,7	8,6	12,8	
IFN-10	3,0	3,6	9,3	9,7	
IFN-11	2,6	3,2	5,3	6,8	

Las pendientes, calculadas mediante un análisis por regresión lineal, y recopiladas en la Tabla DEP-13, muestran que las formulaciones que contienen Tween 20 tienen una tasa de oxidación más rápida cuando se compara con las formulaciones que contienen Poloxamer 188 y un nivel de oxidación dependiente de la concentración de Tween 20.

- 5 La efectividad de la L-metionina para limitar la oxidación a las diferentes temperaturas ensayadas se muestra también por comparación de la formulación #9 (Tween 20 + L-metionina) con la #3 (Tween 20), y de la formulación #10 (Poloxamer 188 + L-metionina) con la #6 (Poloxamer 188)

Tabla DEP-13: Análisis por regresión lineal para las formas oxidadas (pendientes expresadas como % de formas oxidadas/semana)

	IFN-1	IFN-2	IFN-3	IFN-4	IFN-5	IFN-6	IFN-7	IFN-8	IFN-9	IFN-10	IFN-11
2-8°C	0,06	0,08	0,17	0,07	0,05	0,17	-0,01	0,03	0,02	0,00	0,02
25°C	0,14	0,16	0,38	0,21	0,16	0,29	0,06	0,14	0,09	0,04	0,06
40°C	1,60	1,50	2,30	1,30	1,20	1,80	1,60	1,40	1,60	1,30	0,74

Tabla DEP-14: Aglomerados totales (%) por SE-HPLC o SDS-PAGE

2-8°C					
	Momento 0	4 Semanas	8 Semanas	12 Semanas	
IFN-1	0,8	0,5	0,7	0,5	
IFN-2	0,8	0,4	0,7	0,3	
IFN-3	1,1	0,6	0,9	1,2	
IFN-4	1,2	0,9	1,4	1,7	
IFN-5	1,0	1,4	0,9	1,6	
IFN-6	1,1	1,8	0,9	1,5	
IFN-7*	≤3 %	<3 %	<3 %	<4,5 %	
IFN 8	1,2	1,6	1,2	2,0	
IFN-9	1,7	1,4	1,7	1,2	
IFN-10	1,4	1,3	1,3	1,3	
IFN-11	1,4	0,9	0,4	1,7	
25°C					
	Momento 0	2 Semanas	4 Semanas	8 Semanas	12 Semanas
IFN-1	0,8	0,4	0,2	0,2	0,3
IFN-2	0,8	0,4	0,1	0,3	0,0
IFN-3	1,1	0,6	0,3	0,3	0,5
IFN-4	1,2	1,2	0,6	0,9	0,9
IFN-5	1,0	0,6	0,8	0,4	0,9
IFN-6	1,1	0,7	0,9	0,6	0,8
IFN-7*	≤3 %	<3 %	<3 %	<3 %	<4,5 %
IFN 8	1,2	0,8	0,9	0,4	0,9
IFN-9	1,7	0,6	0,9	0,6	0,5
IFN-10	1,4	0,5	0,7	0,5	0,5
IFN-11	1,4	1,1	0,9	0,5	1,4
40°C					
	Momento 0	2 Semanas	4 Semanas	6 Semanas	
IFN-1	0,8	0,5	0,4	0,9	
IFN-2	0,8	0,6	0,6	0,8	
IFN-3	1,1	0,7	0,5	0,6	
IFN-4	1,2	1,4	0,6	1,1	
IFN-5	1,0	0,9	1,1	1,4	
IFN-6	1,1	1,1	1,2	1,4	
IFN-7*	≤3 %	<3 %	≤3 %	<4,5 %	
IFN 8	1,2	0,8	0,7	0,6	
IFN-9	1,7	0,8	1,0	0,6	
IFN-10	1,4	0,8	1,4	1,0	
IFN-11	1,4	1,3	1,2	1,8	

* por SDS-PAGE

5 Las pendientes, calculadas mediante un análisis por regresión lineal, y recopiladas en la Tabla DEP-15, muestran que no se produce ningún aumento significativo en el contenido total de aglomerados después de un almacenamiento a las diferentes temperaturas.

Tabla DEP-15: Análisis por regresión lineal para los aglomerados totales (pendientes expresadas como % de aglomerados totales/semana)

	IFN-1	IFN-2	IFN-3	IFN-4	IFN-5	IFN-6	IFN-8	IFN-9	IFN-10	IFN-11
2-8°C	-0,01	-0,03	0,01	0,04	0,04	0,01	0,05	-0,03	-0,01	0,01
25°C	-0,04	-0,05	-0,04	-0,03	-0,01	-0,03	-0,03	-0,07	-0,05	-0,01
40°C	0,01	0,01	-0,09	-0,07	0,07	0,05	-0,10	-0,15	-0,03	0,07

Tabla DEP 16: Valores del pH a 2-8°C

2-8°C						
	Momento 0	4 semanas	8 semanas	12 semanas	24 semanas	104 semanas
IFN-1	3,7	3,7	3,7	3,7	-	-
IFN-2	3,7	3,7	3,7	3,7	-	-
IFN-3	3,7	3,7	3,6	3,6	-	-
IFN-4	3,7	3,8	3,7	3,6	-	-
IFN-5	3,7	3,7	3,7	3,7	-	-
IFN-6	3,6	3,7	3,7	3,7	-	3,7
IFN-7	3,6	3,5	3,6	3,6	-	3,6
IFN 8	3,6	3,6	3,7	3,7	-	3,7
IFN-9	3,6	3,7	3,6	3,7	-	-
IFN-10	3,6	3,7	3,7	3,7	-	3,7
IFN-11	3,5	3,6	3,6	3,6	3,6	-
25°C						
	Momento 0	2 Semanas	4 Semanas	8 Semanas	12 Semanas	24 Semanas
IFN-1	3,7	3,6	3,8	3,6	3,7	-
IFN-2	3,7	3,6	3,8	3,6	3,7	-
IFN-3	3,7	3,6	3,8	3,7	3,7	-
IFN-4	3,7	3,6	3,8	3,7	3,7	-
IFN-5	3,7	3,7	3,6	3,7	3,7	-
IFN-6	3,6	3,7	3,7	3,6	3,7	-
IFN-7	3,6	3,6	3,5	3,6	3,6	-
IFN 8	3,6	3,7	3,6	3,7	3,7	-
IFN-9	3,6	3,7	3,7	3,6	3,6	-
IFN-10	3,6	3,7	3,7	3,7	3,6	-
IFN-11	3,5	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
40°C						
	Momento 0	2 Semanas	4 Semanas	6 Semanas		
IFN-1	3,7	3,6	3,7	3,7		
IFN-2	3,7	3,6	3,7	3,8		
IFN-3	3,7	3,6	3,7	3,8		
IFN-4	3,7	3,6	3,7	3,8		
IFN-5	3,7	3,7	3,6	3,7		
IFN-6	3,6	3,7	3,6	4,0		
IFN-7	3,6	3,6	3,6	3,6		
IFN 8	3,6	3,6	3,7	3,7		
IFN-9	3,6	3,6	3,7	3,7		
IFN-10	3,6	3,7	3,7	3,6		
IFN-11	3,5	3,6	3,5	3,6		

No se observa ningún desplazamiento del pH después de un almacenamiento

Tabla DEP-17: Osmolaridad (OSM/kg)

IFN-1	0,348
IFN-2	0,345
IFN-3	0,345
IFN-4	0,346
IFN-5	0,354
IFN-6	0,358
IFN-7	0,399
IFN 8	0,354
IFN-9	0,369
IFN-10	0,366
IFN-11	0,361

5

La osmolaridad de las formulaciones ensayadas es apropiada.

Basándose en los resultados de las formulaciones, se selecciona la siguiente formulación exenta deHSA:

- 44 o 88 mcg/ml de interferón beta-1a en un tampón de acetato de sodio de pH 3,5, que contiene
- 54,6 mg/ml de manitol,
- 1 mg/ml de Poloxamer 188
- 0,12 mg/ml de L-metionina.

1.3.2 Excedentes

No se emplearon excedentes

1.3.3 Propiedades fisicoquímicas y biológicas

Estas características han sido consideradas en los estudios del desarrollo de formulaciones como se han descrito anteriormente.

1.4 Desarrollo del proceso de producción

1.4.1 Desarrollo del proceso de producción

El actual proceso de producción fue adaptado a la preparación a la la escala de laboratorio de las tandas de la nueva formulación: la sustancia de fármaco se compuso directamente con los ingredientes; luego se realizó una doble filtración con el fin de imitar al proceso realizado a la escala industrial que prevé una filtración en condiciones asépticas seguida por una filtración en línea antes del llenado de las jeringas. Luego las jeringas fueron llenadas manualmente con la solución estéril final.

Tanto las etapas de filtración como el llenado de las jeringas se realizaron bajo un flujo laminar.

Se da aquí a continuación una descripción de cada una de las etapas del proceso.

1.4.2 Cálculos preliminares

Cantidad de sustancia del fármaco interferón beta-1a D(mg), que se requiere para obtener una solución de 44 mcg/ml:

$$D(\text{mg}) = 44 \text{ mcg/ml} \times 90 \text{ ml} = 3.960 \text{ mcg} = 3,96 \text{ mg}$$

Volumen de sustancia del fármaco interferón beta-1a B(ml) que corresponde a la cantidad D(mg):

$$B(\text{ml}) = 3,96 \text{ mg} : \text{título a granel (mg/ml)}$$

Volumen de la solución de excipientes V(ml), que se requiere para obtener 90 ml de la solución de 44 mcg/ml.

$$V(\text{ml}) = 90 \text{ ml} - B(\text{ml})^*$$

* (d \equiv 1 g/ml)

1.4.3 Preparación de una solución 1 M de hidróxido de sodio

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

1.4.4 Preparación de un tampón de acetato de sodio 0.01 M de pH 3,5

Se añadió una cantidad apropiada de ácido acético glacial a WFI y el pH se ajustó a $3,5 \pm 0,2$ usando NaOH 1 M o ácido acético diluido al 50 %. La solución se completó hasta el volumen final usando WFI.

1.4.5 Preparación de la solución de excipientes

La cantidad calculada de excipientes (manitol, Tween 20 o Poloxamer 188 y L-metionina) se pesó y disolvió en la cantidad requerida de un tampón de acetato de sodio 0,01 M de pH 3.5; luego el pH se comprobó y se ajustó, si se necesitaba, a $3,5 \pm 0,2$ con NaOH 1 M o ácido acético diluido al 50 %; la solución se completó luego hasta el peso final con un tampón de acetato de sodio 0,01 M.

1.4.6 Composición de la solución de sustancia de fármaco

La cantidad requerida B(g) de la sustancia de fármaco de interferón beta-1a se añadió a la cantidad requerida de la solución de excipientes V(g) y se agitó suavemente hasta llegar a la homogeneidad.

1.4.7 1ª filtración de la solución de sustancia de fármaco

La solución preparada se filtró luego a través de una membrana de nylon de 0,2 µm (Ultipor N₆₆ 0,2 µm, Ø 2,5 cm, de Pall), se montó dentro de un soporte de acero inoxidable, bajo una presión de nitrógeno (max. 1 bar), y se recogió en un vaso de precipitados de vidrio.

1.4.8 2ª Filtración de la solución de sustancia de fármaco

5 La solución procedente de la anterior filtración se filtró luego de nuevo a través de una nueva membrana de nylon de 0,2 µm en las mismas condiciones.

1.4.9 Llenado de las jeringas

10 Unas jeringas de vidrio con una capacidad de 1 ml se llenaron asépticamente con 0,5 ml de la solución final.

1.4.10 Temperatura durante el proceso

Durante todo el proceso, la temperatura se mantenía lo más cerca que sea posible a unas condiciones refrigeradas usando WFI refrigerado y almacenando la solución de excipientes y las soluciones preparadas a 2-8°C.

15 Ejemplo 2 – Formulación líquida de interferón beta-1a de múltiples dosis, exenta de HSA, en cartuchos apropiados para un auto-inyector

La necesidad de desarrollar un producto de múltiples dosis en cartuchos surgió durante el desarrollo de una nueva formulación exenta de HSA que buscaba la eliminación del HSA a partir del producto actualmente comercializado en jeringas. La formulación de múltiples dosis aumentaría la conveniencia para los pacientes permitiendo una autoadministración mediante un auto-inyector.

20 Los agentes bacteriostáticos usados de manera sumamente corriente (0,3 % de m-cresol, 0,5 % de fenol y 0,9 % de alcohol bencílico) se estudiaron inicialmente en combinación con la sustancia activa y se compararon con la fórmula de una única dosis en una jeringa seleccionada dentro del marco del desarrollo de una sola dosis (44 o 88 mcg/ml de interferón beta-1a, 54,6 mg/ml de manitol, 1 mg/ml Poloxamer 188, 0,12 mg/ml de L-metionina en 10 mM de un tampón de acetato de sodio a un pH de 3,5); se observó lo siguiente:

- La inclusión de cada uno de los agentes bacteriostáticos, en las concentraciones corrientemente usadas para impedir una contaminación con microbios, determinó un aumento en la cantidad de formas oxidadas y favoreció un aumento espectacular en la aglomeración;
- 0,3 % de m-cresol y la combinación de 0,5 % de fenol con 0,1% de Poloxamer 188 determinaron un aumento espectacular en la aglomeración.

35 Basándose en la información obtenida durante la formulación previa, el desarrollo de la formulación se enfocó inicialmente sobre alcohol bencílico y fenol (sin Poloxamer 188) así como sobre agentes bacteriostáticos adicionales (cloro-butanol, fenil-etanol); se investigó también el EDTA en combinación con alcohol bencílico; la oxidación y la aglomeración del fármaco activo eran las rutas de degradación principales observadas; se mostró que la reducción de la cantidad de alcohol bencílico en la formulación aumentaba la vida útil del producto.

40 Todos los otros agentes conservantes investigados durante esta fase no dan como resultado ningún aumento significativo de la estabilidad del producto.

Al final del desarrollo de la formulación se identificaron las siguientes formulaciones candidatas de múltiples dosis:

- Formulación B - 264 mcg de interferón beta-1a, 163,8 mg de manitol, 3 mg de Poloxamer 188, 0,36 mg de L-metionina, 6 mg de alcohol bencílico en 3 ml de un tampón de acetato de sodio 10 mM de pH 3,5.
- Formulación A - 264 mcg de interferón beta-1a, 163,8 mg de manitol, 3 mg de Poloxamer 188, 0,36 mg de L-metionina en 2,7 ml de un tampón de acetato de sodio 11 mM de pH 3,5, que se tenían que mezclar con 0,3 ml de alcohol bencílico al 3 % en WFI, obteniendo de esta manera la formulación final de múltiples dosis.

45 Tres tandas a la escala de laboratorio se produjeron para cada formulación candidata y se observaron en cuanto a la estabilidad ensayada por unos métodos que indican una estabilidad durante hasta 6 meses; no se produjo ninguna degradación significativa para ambas formulaciones candidatas después de un almacenamiento a 2-8°C; la degradación principal que se produce en condiciones aceleradas (25°C) es una oxidación.

Al final del estudio, se identificaron dos formulaciones candidatas de múltiples dosis con un perfil comparable de estabilidad:

- La formulación B es una formulación de múltiples dosis, presta para el uso, que contiene 0,2 % de alcohol bencílico;
- La formulación A es una formulación de múltiples dosis, que contiene 0,3 % de alcohol bencílico, y que se obtiene después de haber mezclado el contenido de 2 cartuchos (uno que contiene el principio activo y los excipientes y otro que contiene la cantidad requerida de alcohol bencílico para llegar a la presentación final).

2.1 Meta del estudio

La meta de este estudio fue desarrollar una formulación de interferón de múltiples dosis, exenta de HSA, a razón de 264 mcg en cartuchos de 3 ml para permitir su administración mediante un autoinyector.

2.2 Parte experimental**2.2.1 Materiales**

- 10 Interferón beta-1a (de Serono S.A.)
 Manitol DAB, Ph Eur, BP, USP, FCC, E421 (de Merck)
 Ácido acético glacial al 100 % GR (de Merck)
 Gránulos de hidróxido de sodio GR (de Merck)
 Poloxamer 188 (Lutrol F 68 DAC, USP/NF, de BASF)
- 15 L-metionina para uso en bioquímica (de Merck)
 m-Cresol para síntesis (de Merck)
 Fenol para síntesis (de Merck)
 Alcohol bencílico Ph Eur, BP, NF (de Merck)
 Cloro-butanol (de Aldrich)
- 20 Fenil-etanol (de Sigma)
 Metil-parabeno de sodio BP, USP/NF (de Formenti)
 Propil-parabeno de sodio BP, USP/NF (de Formenti)
 Sal disódica de EDTA (de Fluka)
 1,2-Propanodiol extrapuro DAB, Ph Eur, BP, USP (de Merck)
- 25 Acetonitrilo (de Merck)
 Ácido trifluoroacético (de Baker)
 Ácido heptafluorobutírico (de Pierce)

2.2.2 Equipamiento

- 30 Sistemas de HPLC (de Waters)
 Software Millenium 32 (de Waters)
 Osmómetro (Osmomat 030-D, de Gonotec)
 Medidor del pH (mod. 654, de Metrohm)
 Pipetas calibradas (de Gilson)
- 35 Membranas de nylon Ultipor N66 de 0,2 µm, FTKNF, Ø 4,7 cm (de Pall)
 Membranas de nylon Ultipor N66 de 0,2 µm, NR14225, Ø 14,2 cm (de Pall)
 Soportes de acero inoxidable (de Sartorius)
 Depósito de acero inoxidable (de Sartorius)
 Columna C4 de 5 µm (0,46 x 25 cm) (de Baker)
- 40 Columna C4, Supelcosil LC-304 de 5 µm (0,46 x 25 cm) (de Supelco)
 Columna TSK, G2000SWXL (0,46 x 25 cm) (de TosoHaas)

2.3 Estudio previo a la formulación (pre-formulación)

- 45 Los agentes bacteriostáticos usados más corrientemente (0,3 % de m-cresol, 0,5 % de fenol y 0,9% de alcohol bencílico) se estudiaron inicialmente en combinación con la sustancia activa y con diferentes mezclas de excipientes en los recipientes finales (cartuchos de 3 ml): un tampón de acetato, una mezcla de un tampón de acetato y manitol, una mezcla de un tampón de acetato, manitol, L-Met y Poloxamer 188. La compatibilidad de la sustancia activa en los diferentes entornos se investigó en términos de oxidación (por una RP-HPLC) y de aglomeración (por una SE-HPLC) después de un almacenamiento a 40°C. Una recopilación de las formulaciones investigadas durante las diferentes etapas de esta fase preliminar se da en la Tab. 1.
- 50

El efecto de la inclusión de cada uno de los agentes bacteriostáticos se comparó con la fórmula de una sola dosis (= mono-dosis) (de referencia) seleccionada dentro del marco del desarrollo de una mono-dosis en jeringas (44 ó 88 mcg/ml de interferón beta-1a, 54,6 mg/ml de manitol, 1 mg/ml de Poloxamer 188, 0,12 mg/ml de L-metionina en un tampón de acetato de sodio 10 mM a un pH de 3,5).

Tab. 1: Composiciones de formulaciones de múltiples dosis de interferón beta-1a (pre-formulación)

Formulación	Composición
Referencia	Ace/Man/Plu/Met1
E	Ace/CR
F	Ace/PH
G	Ace/BA
H	Ace
I	Ace/Man/CR
J	Ace/Man/PH
K	Ace/Man/BA
L	Ace/Man
M	Ace/Man/PH
N	Ace/Man/Met1/PH
O	Ace/Man/Met2/PH
P	Ace/Man/Plu/PH
Q	Ace/Man/Plu/Met1/PH
R	Ace/Man/Plu/Met2/PH
S	Ace/Man/BA
T	Ace/Man/Met1/BA
U	Ace/Man/Met2/BA
V	Ace/Man/Plu/BA
W	Ace/Man/Plu/Met1/BA
X	Ace/Man/Plu/Met2/BA

Ace = tampón de acetato de sodio 10 mM de pH 3,5; Man = 54,6 mg/ml de manitol; Plu = 1 mg/ml de Poloxamer 188; Met1 = 0,12 mg/ml de L-metionina; Met2 = 0,24 mg/ml de L-metionina; CR = 3 mg/ml de m-cresol; PH = 5 mg/ml de fenol; BA = 9 mg/ml de alcohol bencílico.

5 2.4 Desarrollo de formulaciones

Basándose en la información obtenida durante la pre-formulación, el desarrollo de una formulación se enfocó inicialmente sobre el alcohol bencílico y el fenol; se investigaron también unos agentes conservantes adicionales (cloro-butanol, fenil-etanol) y EDTA combinado con alcohol bencílico. Se preparó también en cartuchos una formulación comparativa (MS-3) correspondiente a la nueva formulación de interferón beta-1a de una sola dosis, exenta de HSA.

La composición (en mg/ml) de las formulaciones producidas durante esta fase se informa en las Tablas 2 hasta 5):

Tab. 2: Formulaciones de interferón beta-1a de múltiples dosis que contienen alcohol bencílico (composición en mg/ml)

#	IFN	Manitol	Poloxamer 188	L-Met	Alcohol bencílico	Tampón de acetato
MS-3 (ref.)	0,088	54,6	1	0,12	-	c.s. hasta 1 ml
MS-13	0,088	54,6	1	0,12	1,5	c.s. hasta 1 ml
MS-14	0,088	54,6	-	0,12	1,5	c.s. hasta 1 ml
MS-15	0,088	54,6	1	0,12	3	c.s. hasta 1 ml
MS-16	0,088	54,6	-	0,12	3	c.s. hasta 1 ml
MS-17	0,088	54,6	1	0,12	4,5	c.s. hasta 1 ml
MS-18	0,088	54,6	-	0,12	4,5	c.s. hasta 1 ml
MS-1	0,088	54,6	1	0,12	9	c.s. hasta 1 ml
MS-2	0,088	54,6	-	0,12	9	c.s. hasta 1 ml

Tab. 3: Formulaciones de interferón beta-1a de múltiples dosis que contienen fenol (en mg/ml)

#	IFN	Manitol	Propilen glicol	Fenol	Tampón de acetato
MS-4	0,088	54,6	-	5	c.s. hasta 1 ml
MS-5	0,088	54,6	100	5	c.s. hasta 1 ml

Tab. 4: Formulaciones de interferón beta-1a de múltiples dosis que contienen cloro-butanol y fenil-etanol (en mg/ml)

#	IFN	Manitol	Poloxamer 188	L-Met	Cloro-butanol	Fenil etanol	Tampón de acetato
MS-35	0,088	54,6	1	0,12	1	-	c.s. hasta 1 ml
MS-34	0,088	54,6	1	0,12	-	1	c.s. hasta 1 ml
MS-34b	0,088	54,6	1	0,12	-	1	c.s. hasta 1 ml

5 **Tab. 5: Formulaciones de interferón beta-1a de múltiples dosis que contienen EDTA (en mg/ml)**

#	IFN	Manitol	L-Met	Poloxamer 188	EDTA	Alcohol bencílico	Tampón de acetato
MS-32	0,088	54,6	0,12	1	1	2	c.s. hasta 1 ml
MS-33	0,088	54,6	-	1	1	2	c.s. hasta 1 ml
MS-36	0,088	54,6	0,12	1	0,5	1	c.s. hasta 1 ml

Al final del desarrollo de las formulaciones se identificaron las siguientes formulaciones de múltiples dosis candidatas:

- 10
- Formulación B - 264 mcg de interferón beta-1a en 3 ml de un tampón de acetato a un pH de 3,5, que contiene 54,6 mg/ml de manitol, 1 mg/ml de Poloxamer 188, 0,12 mg/ml de L-metionina y 2 mg/ml de alcohol bencílico (0,2 % de alcohol bencílico)
 - Formulación A - 264 mcg de interferón beta-1a en 2,7 ml de un tampón de acetato a un pH de 3,5, que contiene 54,6 mg/ml de manitol, 1 mg/ml de Poloxamer 188 y 0,12 mg/ml de L-metionina, que se ha de mezclar con 0,3 ml de alcohol bencílico al 3 % en WFI, obteniendo de esta manera la formulación de múltiples dosis final (con 0,3 % de alcohol bencílico)
- 15

2.5 Ensayo de la eficacia conservante

20 Se escrutaron unas formulaciones de múltiples dosis, que contenían diferentes concentraciones de alcohol bencílico (desde 0,2 % hasta 0,9 %) para el ensayo de la eficacia conservante de acuerdo con las farmacopeas de EP y USP.

Se realizaron unos ensayos preliminares seleccionando como indicadores *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*: la evidencia de que el pH ácido de la formulación tiene por si mismo un efecto bacteriostático sobre bacterias (*Staphylococcus aureus*) y el hecho de que se ha informado de que algunas cepas de *Candida albicans* sobreviven incluso a bajos valores del pH (pH alrededor de 2) condujeron a la selección de *Candida albicans* como el indicador crítico para el ensayo. Se aplicaron los criterios de aceptación para el ensayo de eficacia conservante que se describen en ambas farmacopeas de EP y USP.

25

2.6 Formulaciones candidatas

2.6.1 Formulación A

30 Se produjeron tres tandas a la escala de laboratorio de aproximadamente 140 cartuchos por tanda; la fórmula se da en la Tab. 6:

Tab. 6: Composición de la formulación A de interferón beta-1a de múltiples dosis

IFN β -1a	Manitol	Poloxamer 188	L-metionina	Acetato de sodio 11 mM de pH 3,5
97,8 mcg	60,7 mg	1,11 mg	0,13 mg	c.s. hasta 1 ml

35 El ingrediente activo se formuló juntamente con la solución de excipientes y luego se filtró a través de una membrana de nylon de 0,22 μ m; los cartuchos se llenaron con 2,7 ml de la solución final. Se tomaron muestras antes y después de la filtración y después de haber llenado para vigilar las pérdidas del principio activo durante el proceso.

40 Las muestras se almacenaron y se ensayaron en cuanto a la estabilidad a 2-8°C (6 meses) a 25 \pm 2°C (3 meses) y a 40 \pm 2°C (1 mes).

Seis tandas a la escala de laboratorio de alcohol bencílico al 3 % en WFI se produjeron para ser mezcladas con los cartuchos que contenían el ingrediente activo; la composición de las tandas está dada en la Tab. 7:

Tab. 7: Composición de alcohol bencílico al 3 % en WFI

Alcohol bencílico	WFI
30 mg	c.s. hasta 1 ml

La cantidad requerida de alcohol bencílico se añadió a WFI y luego se filtró a través de una membrana de Durapore de 0,22 µm; luego los cartuchos se llenaron con 0,5 ml y finalmente se esterizaron por autoclavado.

- 5 Las muestras se almacenaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y se ensayaron en cuanto al contenido de alcohol bencílico y al pH hasta durante 1 mes.

2.6.2 Formulación B

- 10 Se produjeron tres tandas a la escala de laboratorio de aproximadamente 500 cartuchos por tanda; la fórmula se da en la Tab. 8:

Tab. 8: Composición de la formulación B de interferón beta-1a de múltiples dosis

IFNβ-1a	Manitol	Poloxamer 188	L-metionina	Alcohol bencílico	Acetato de sodio 10 mM de pH 3,5
88 mcg	54,6 mg	1 mg	0,12 mg	2 mg	c.s. hasta 1 ml

- 15 El ingrediente activo se formuló juntamente con la solución de excipientes y luego se filtró a través de una membrana de nylon de 0,22 µm; los cartuchos se llenaron con 3 ml de una solución final. Se tomaron muestras, antes y después de la filtración y después de haber llenado para vigilar las pérdidas del principio activo durante el proceso.

Las muestras se almacenaron y se ensayaron en cuanto a la estabilidad a $2-8^\circ\text{C}$ (6 meses) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (3 meses) y a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ (3 semanas).

2.6.3 Ensayo de eficacia conservante

- 20 Ambas formulaciones candidatas se ensayaron en cuanto a la eficacia conservante de acuerdo con las farmacopeas de EP y USP.

2.7 Ensayos y métodos analíticos

- 25 Los ensayos y métodos analíticos seguidamente descritos se han usado para vigilar la estabilidad de las formulaciones a la escala de laboratorio:
pH (medición potenciométrica)

Ensayo de cuantificación de la proteína (por RP-HPLC)

- 30 La cuantificación de la proteína se efectuó en una columna C4, Wide-Pore Butyl de 5 µm (de Baker); la longitud de onda se ajustó a 214 nm y la elución se realizó a razón de 1 ml/min usando la fase móvil y el gradiente siguientes:

A = agua/ácido trifluoroacético al 0,1 % - B = acetonitrilo/ácido trifluoroacético al 0,1 % - C = acetonitrilo

Gradiente:

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

Tiempo de funcionamiento = 65 min.

- 50 Las muestras se analizaron inyectando 100 µl de unas muestras tal como estaban (muestras de 44 mcg/ml) o después de una dilución (1:1) en un placebo equivalente para muestras de 88 mcg/ml.

La cuantificación de las muestras se realizó frente a una curva patrón en el intervalo de 0,0125 mg/ml - 0,2 mg/ml preparada por un material patrón de referencia.

Formas oxidadas (por RP-HPLC)

5 La cuantificación de las formas oxidadas se realizó en una columna C4, con Supelcosil LC-304 (de Supelco) regulada termostáticamente a 40°C; la longitud de onda se ajustó a 208 nm y la elución se desarrolló a razón de 1 ml/min usando la fase móvil y el gradiente siguientes:

A = agua 60 % / acetonitrilo 40 % / ácido heptafluorobutírico 0,14 % - B = agua 20 % / acetonitrilo 80 % / ácido heptafluorobutírico 0,14 % - C = agua 20 % / acetonitrilo 80 % / ácido trifluoroacético 0,1 %.

10 Gradiente:

0'	70 % de A	30 % de B	0 % de C	
5'	70 % de A	30 % de B	0 % de C	
58'	62 % de A	38 % de B	0 % de C	Curva 6
63'	0 % de A	100 % de B	0 % de C	Curva 1
15 68'	0 % de A	0 % de B	100 % de C	Curva 1
69'	70 % de A	30 % de B	0 % de C	Curva 6

Tiempo de funcionamiento: 96 min (70 min+ equilibración durante 26 min)

20 Las muestras se analizaron tal como estaban por inyección de 200 µl (muestras de 88 mcg/ml) o de 400 µl (muestras de 44 mcg/ml).

Aglomerados totales (por SE-HPLC)

25 La detección del contenido total de aglomerados se realizó en una columna con TSK G2000SWXL (de TosoHaas); la elución se realizó en una modalidad isocrática a razón de 0,5 ml/min usando una mezcla de acetonitrilo y agua (30:70) + 0,2 % de ácido trifluoroacético; la longitud de onda se ajustó a 214 nm. El tiempo de funcionamiento era de 20 min.

Las muestras se analizaron tal como estaban por inyección de 100 µl (muestras de 88 mcg/ml) o de 200 µl (muestras de 44 mcg/ml).

30 **Actividad biológica (bioensayo in vitro)**

La actividad biológica se midió mediante un ensayo antivírico basado en la protección de células inducida por IFN-β (células WISH – tejido amniótico humano) frente al efecto citopático de un virus (el virus de la estomatitis vesicular).

Osmolalidad (medición crioscópica)

35 La determinación de la osmolalidad se realizó mediante una medición crioscópica basada en la depresión del punto de congelación, observada para la solución ensayada.

Ensayo de alcohol bencílico (GC)

40 El método GC para detectar alcohol bencílico usa el enfoque de calibración de un único punto, usando como referencia el alcohol bencílico que es suministrado por Merck. Además, se usa un patrón interno (alcohol fenil-etílico) para normalizar las áreas de pico de ambas muestras de ensayo; de la solución de muestra testigo y de la solución patrón. El método se lleva a cabo en una columna de acero inoxidable de 1,8 metros x 2 mm de acero ID con 10 % de Carbowax 20M sobre Supelcoport de 80/100 mallas. El detector es un FID, (acrónimo de flame ionization detector = detector de la ionización por la llama).

45 Los resultados se expresan como mg de alcohol bencílico por ml.

2.7.1 Resultados

2.7.1.1 Pre-formulación

50 Los niveles de formas oxidadas y de aglomerados totales que se detectaron en condiciones estresadas (a 40°C) se muestran en las Tablas 9 y 10:

Tab. 9: % de formas oxidadas en formulaciones de interferón beta-1a de múltiples dosis después de un almacenamiento a 40°C (por RP-HPLC)

Formulación	Composición	T = 0	3 días a 40°C	6 días a 40°C
Referencia	Ace/Man/Plu/Met1	3,0	-	4,2
E	Ace/CR	2,8	2,7	-
F	Ace/PH	2,6	3,5	-
G	Ace/BA	2,6	6,3	-
H	Ace	3,6	2,7	-
I	Ace/Man/CR	2,3	3,0	-
J	Ace/Man/PH	3,6	2,5	-
K	Ace/Man/BA	4,0	4,7	-
L	Ace/Man	2,9	2,3	-
M	Ace/Man/PH	2,9	-	6,3
N	Ace/Man/Met1/PH	2,7	-	5,3
O	Ace/Man/Met2/PH	2,5	-	4,9
P	Ace/Man/Plu/PH	2,3	-	6,8
Q	Ace/Man/Plu/Met1/PH	2,2	-	7,2
R	Ace/Man/Plu/Met2/PH	2,1	-	4,2
S	Ace/Man/BA	2,6	-	5,0
T	Ace/Man/Met1/BA	2,7	-	5,0
U	Ace/Man/Met2/BA	2,5	-	4,8
V	Ace/Man/Plu/BA	2,5	-	5,0
W	Ace/Man/Plu/Met1/BA	2,6	-	5,0
X	Ace/Man/Plu/Met2/BA	3,0	-	6,2

Ace = tampón de acetato de sodio 10 mM de pH 3,5; Man = 54,6 mg/ml de manitol; Plu = 1 mg/ml de Poloxamer 188; Met 1 = 0,12 mg/ml de L-metionina; Met 2 = 0,24 mg/ml de L-metionina; CR = 3 mg/ml de m-cresol; PH = 5 mg/ml de fenol; BA = 9 mg/ml de alcohol bencílico.

5

Tab. 10: % de aglomerados totales en formulaciones de interferón beta-1a de múltiples dosis después de un almacenamiento a 40°C (por RP-HPLC)

Formulación	Composición	T = 0	3 días a 40°C	6 días a 40°C
Referencia	Ace/Man/Plu/Met1	3,2	-	3,2
E	Ace/CR	1,8	9,4	8,5
F	Ace/PH	2,2	39,8	9,4
G	Ace/BA	2,0	4,7	7,2
H	Ace	2,8	2,5	1,7
I	Ace/Man/CR	2,4	15,6	20,1
J	Ace/Man/PH	2,0	2,3	2,1
K	Ace/Man/BA	2,3	3,6	4,5
L	Ace/Man	3,0	3,2	2,3
M	Ace/Man/PH	2,2	-	4,4
N	Ace/Man/Met1/PH	2,2	-	5,8
O	Ace/Man/Met2/PH	2,3	-	8,8
P	Ace/Man/Plu/PH	2,2	-	40,3
Q	Ace/Man/Plu/Met1/PH	2,3	-	46,3
R	Ace/Man/Plu/Met2/PH	2,3	-	35,9
S	Ace/Man/BA	2,5	-	3,4
T	Ace/Man/Met1/BA	2,6	-	5,4
U	Ace/Man/Met2/BA	1,4	-	3,0
V	Ace/Man/Plu/BA	2,9	-	4,8
W	Ace/Man/Plu/Met1/BA	2,9	-	5,8
X	Ace/Man/Plu/Met2/BA	1,6	-	5,8

Ace = tampón de acetato de sodio 10 mM de pH 3,5; Man = 54,6 mg/ml de manitol; Plu = 1 mg/ml de Poloxamer 188; Met 1 = 0,12 mg/ml de L-metionina; Met 2 = 0,24 mg/ml de L-metionina; CR = 3 mg/ml de m-cresol; PH = 5 mg/ml de fenol; BA = 9 mg/ml de alcohol bencílico.

10

La inclusión de cada uno de los agentes bacteriostáticos, en las concentraciones corrientemente usadas para impedir una contaminación por microbios, determinó un aumento en las formas oxidadas y favoreció un aumento espectacular en la aglomeración en comparación con la formulación de una sola dosis (de referencia).

15

La combinación de 0,5 % de fenol y 0,1 % de Poloxamer 188 afectó negativamente a la estabilidad del producto puesto que se produjo aproximadamente un 40 % de aglomeración (formulaciones P-Q-R). Se excluyó un 0,3 % de

m-cresol para el desarrollo adicional puesto que afectaba negativamente a la estabilidad del producto debido a un aumento en la aglomeración (formulación i).

2.7.1.2 Desarrollo de las formulaciones

5 Todos los datos de estabilidad (datos en bruto) se recogen en la sección de Tablas; se usó un análisis por regresión lineal para evaluar los datos.

2.7.1.2.1 Formulaciones que contienen alcohol bencílico

10 Una alta concentración de alcohol bencílico (0,9 %) afectaba negativamente a la estabilidad del producto en términos tanto de las formas oxidadas como del contenido de aglomerados, tal como se muestra en las Figuras 1 hasta 6:

- en condiciones estresadas (40°C), el aumento en la oxidación es más alto para las formulaciones que contienen 0,9 % de alcohol bencílico (MS-1 y MS-2), como se muestra en la Figura 1;
- en condiciones aceleradas (a 25°C), el aumento en la oxidación es más alto para todas las formulaciones que contienen alcohol bencílico en comparación con la formulación sin alcohol bencílico (MS-3, de referencia), como se muestra en la Figura 2;
- después de un almacenamiento a largo plazo (a 2-8°C), se observaron unas tasas de oxidación más altas para las formulaciones que contenían 0,9 % de alcohol bencílico (MS-1 y MS-2); se detectaron unas tasas de degradación comparables para unas formulaciones que contenían por debajo de 0,45 % de alcohol bencílico (Figura 3).

20 En cuanto al nivel de aglomerados se observó lo siguiente:

- en condiciones estresadas (a 40°C), se observó el aumento en la aglomeración para las formulaciones que contenían 0,9 % de alcohol bencílico (MS-1 y MS-2), como se muestra en la Figura 4;
- en condiciones aceleradas y a largo plazo (a 25°C y 2-8°C), no se observó ningún aumento en la aglomeración para ninguna de las formulaciones, como se muestra en las Figuras 5 y 6;
- se observó una disminución en la actividad biológica para unas formulaciones con 0,9 % de alcohol bencílico (MS-1 y MS-2) a 40°C; esto no se observa para las mismas muestras almacenadas a 25°C y a 2-8°C.
- no se observó ninguna disminución en el título después de un almacenamiento a todas las temperaturas.
- no se observó ningún desplazamiento del pH después de un almacenamiento a todas las temperaturas.

2.7.1.2.2 Formulaciones que contienen agentes bacteriostáticos alternativos (fenol, cloro-butanol, fenil-etanol)

30 El fenol (MS-4 y MS-5) afectaba negativamente a la estabilidad del producto en términos de las formas oxidadas mientras que el cloro-butanol (MS-35) y el fenil-etanol (MS-34 y MS-34b) mostraban una estabilidad comparable con la solución de referencia (MS-3, sin agente bacteriostático), tal como se muestra en las Figuras 7 y 8:

35 En cuanto al nivel de aglomerados totales se observó un aumento espectacular en la aglomeración en condiciones estresadas (40°C) para las formulaciones que contenían fenol (MS-4 y MS-5), como se muestra en la Figura 9; no se produjo ningún aumento en la aglomeración a bajas temperaturas (25°C y 2-8°C).

2.7.1.2.3 Formulaciones que contienen EDTA

40 La adición de EDTA a las formulaciones que contenían 0,1 %-0,2 % de alcohol bencílico (MS-32, MS-33, MS-36) no disminuía el nivel de oxidación (Figura 10); se observó un aumento del nivel de aglomerados en condiciones aceleradas para las formulaciones que contenían 0,1 % de EDTA y 0,2 % de alcohol bencílico (MS-32, MS-33) (Figura 11); se observó una degradación comparable a 2-8°C:

2.7.1.2.4 Resultados de la eficacia conservante

50 Los resultados del estudio de escrutinio mostraron que los criterios de las farmacopeas USP y EP son satisfechos por lo menos en unas concentraciones de alcohol bencílico que son iguales o mayores que 0,3 % (para *Candida albicans*).

2.8 Formulaciones candidatas

55 La evaluación de todos los datos se realizó de la siguiente manera: un análisis por regresión lineal se realizó para cada una de las tandas, seguido por un análisis de la covarianza (valor de $P > 0,25$) para averiguar la variabilidad entre una tanda y otra tanda; no se realizó ningún análisis estadístico formal cuando no se observaba ninguna variabilidad después de un almacenamiento.

2.8.1 Candidata A**2.8.1.1 Recuperación durante la producción**

5 La recuperación de interferón beta-1a en las muestras en curso de tratamiento (antes y después de la filtración, producto acabado) recogidas durante la producción de la candidata A se recopila en la Tab. 11: no se registró ninguna pérdida significativa del ingrediente activo.

Tab. 11: % de recuperación de interferón beta-1a durante la producción de la candidata A

	RT-01	RT-02	RT-03
Después de la 1ª filtración	98.6	99.7	98.0
Después de la 2ª filtración	98.3	98.5	103.8
Producto acabado en el cartucho	98.4	97.5	100.7

2.8.1.2 Estabilidad del fármaco activo

10 Una pendiente y una ordenada en el origen comunes se calcularon para el nivel de formas oxidadas en las tres tandas almacenadas a diferentes temperaturas; los resultados de los análisis estadísticos se muestran en la Tab. 12

Tab. 12: Resultados de análisis estadísticos para la candidata A de interferón beta 1a de múltiples dosis (formas oxidadas)

15

2-8°C		25°C		40°C	
Pendiente agrupada (%/semana)	Ordenada en el origen agrupada (%)	Pendiente agrupada (%/semana)	Ordenada en el origen agrupada (%)	Pendiente agrupada (%/semana)	Ordenada en el origen agrupada (%)
0,063	2,73	0,322	2,67	2,206	2,51

No se observó una variabilidad significativa para el nivel de aglomerados totales ni para el ensayo; y por lo tanto no se realizó un análisis estadístico formal. El diferente nivel en los aglomerados para las tres tandas es debido al de diferente nivel en las masas a granel usadas para la producción.

2.8.2. Candidata B**2.8.1.1 Recuperación durante la producción**

25 La recuperación de interferón beta-1a en las muestras en curso de tratamiento (antes y después de la filtración, producto acabado) recogidas durante la producción de la candidata B se recopilan en la Tab. 15: no se registró ninguna pérdida significativa del ingrediente activo.

Tab. 15: % de recuperación de interferón beta-1a durante la producción de la candidata B

	MS-01	MS-02	MS-03
Después de la 1ª filtración	100,7	116,5	97,38
Después de la 2ª filtración	101,2	114,9	98,82
Producto acabado en el cartucho	100,6	112,0	95,76

2.8.2.2 Estabilidad del fármaco activo

30 El análisis estadístico realizado al nivel de las formas oxidadas mostró lo siguiente:

- una pendiente y una ordenada en el origen comunes se calcularon para las 3 tandas a 40°C: la pendiente agrupada es igual a 1,42 %/semana y la ordenada en el origen agrupada es igual a 2,72 %.
- no se podría calcular una pendiente común para las 3 tandas a 25°C (valor de P = 0,095), por lo tanto se usó el enfoque en el peor de los casos (tanda MS-03): se observó un aumento de 1,17 % en las formas oxidadas después de un almacenamiento durante 1 mes (0,27 %/semana);
- no se podría calcular ninguna pendiente común para las 3 tandas a 2-5°C (valor de P = 0,016), por lo tanto se usó el enfoque en el peor de los casos (tanda MS-03): se observó un aumento de 0,2 % en las formas oxidadas después de un almacenamiento durante 1 mes (0,047 %/semana).

35

40

No se observó ninguna variabilidad significativa a partir de los datos de estabilidad para el nivel de aglomerados totales ni para el ensayo; por lo tanto no se realizó ningún análisis estadístico formal.

No se observó ninguna disminución en la actividad biológica después de un almacenamiento, ni siquiera en condiciones estresadas (40°C)

2.9 Conclusiones

- 5 Al final del estudio se identificaron dos formulaciones de múltiples dosis candidatas con un perfil de estabilidad comparable:
- La formulación candidata B es una formulación de múltiples dosis, presta para el uso, que contiene 0,2 % de alcohol bencílico;
 - La formulación candidata A es una formulación de múltiples dosis, que contiene 0,3 % de alcohol bencílico, que se obtiene después de mezclar el contenido de 2 cartuchos (uno que contiene el principio activo y los excipientes y otro que contiene la cantidad requerida de alcohol bencílico para llegar a la presentación final).
 - Estas soluciones candidatas se ensayaron también a un pH más alto (4.5 ± 0.2), y no se han mostrado cambios significativos en el perfil de estabilidad. La Solicitante ha encontrado ahora que este pH ligeramente más alto de las formulaciones IFN aumenta la tolerabilidad local de las inyecciones subcutáneas. Por lo tanto, las anteriores 2 soluciones candidatas a un pH de 4,5 o 4,7 podrían ofrecer ventajas adicionales en términos de adaptabilidad del paciente.

Ejemplo 3: Método de producción para la formulación candidata A de múltiples dosis

- 20 En primer lugar se preparó la solución de hidróxido de sodio 1 N disolviendo 20 g de gránulos de hidróxido de sodio en 500 g de WFI.

Luego se preparó el tampón de acetato de sodio 0,011 M a un pH de $3,5 \pm 0,2$ añadiendo 1,32 g de ácido acético glacial a aproximadamente 1.800 g de WFI. El pH de la solución a un pH de $3,5 \pm 0,2$ se ajustó con NaOH 1 N. Luego se tomó la solución con un peso final de 2.000 g. El pH se ajustó nuevamente a $3,5 \pm 0,2$ con NaOH 1 N o con ácido acético diluido al 50 %. Luego se tomó la solución con un peso final de 2.000 g.

La solución final se preparó de la siguiente manera. La cantidad calculada de excipientes se pesó y se disolvió en la cantidad requerida de un tampón de acetato de sodio 11 mM a un pH de $3,5 \pm 0,2$, y el pH de la solución se controló y se ajustó (si era necesario); luego se añadió la cantidad requerida de r-h interferón beta-1a (producido por vía recombinante a partir de células CHO); el peso final se alcanzó añadiendo un tampón de acetato de sodio 11 mM a un pH de $3,5 \pm 0,2$.

1 ml de esta solución final se muestreó para ser ensayado mediante una RP HPLC cuantitativa (muestra BF = antes de la 1ª filtración).

La solución final se filtró luego a través de una membrana de 0,2 μm montada dentro de un soporte de acero inoxidable y la solución se recogió en un vaso de precipitados de vidrio.

- 35 1 ml de esta solución final se muestreó para ser ensayado por una RP HPLC cuantitativa.

La solución final filtrada tal como se ha descrito en el punto precedente se filtró a través de una 2ª membrana de 0,2 μm montada dentro de un soporte de acero inoxidable.

1 ml de esta solución final se muestreó para ser ensayado por una RP HPLC cuantitativa.

Unos cartuchos de vidrio con una capacidad de 3 ml se llenaron con 2,7 ml de la solución final, y se taponaron.

- 40 Esta solución está presta para ser mezclada con un cartucho que contiene la solución al 3 % de alcohol bencílico en WFI.

Ejemplo 4: Método de producción para la formulación candidata B de múltiples dosis

- 45 En primer lugar se preparó la solución de hidróxido de sodio 1 N disolviendo 20 g de gránulos de hidróxido de sodio en 500 g de WFI.

Luego se preparó el tampón de acetato de sodio 0,011 M a un pH de $3,5 \pm 0,2$ añadiendo 1,32 g de ácido acético glacial a aproximadamente 1.800 g de WFI. El pH de la solución se ajustó a un pH de $3,5 \pm 0,2$ con NaOH 1 N. Luego se tomó la solución con un peso final de 2.000 g. El pH se ajustó nuevamente a $3,5 \pm 0,2$ con NaOH 1 N o con ácido acético diluido al 50 %. Luego se tomó la solución con un peso final de 2.000 g.

- 50 La solución final se preparó de la siguiente manera.

ES 2 417 061 T3

La cantidad calculada de excipientes se pesó y se disolvió en la cantidad requerida de un tampón de acetato de sodio 10 mM a un pH de $3,5 \pm 0,2$, y el pH de la solución se controló y ajustó (si era necesario); luego se añadió la cantidad requerida de r-h interferón beta-1a (producido por vía recombinante a partir de células CHO); el peso final se alcanzó añadiendo un tampón de acetato de sodio 10 mM a un pH de $3,5 \pm 0,2$.

5 1 ml de esta solución final se muestreó para ser ensayado mediante una RP HPLC cuantitativa.

La solución final se filtró luego a través de una membrana de $0,2 \mu\text{m}$ montada dentro de un soporte de acero inoxidable y la solución se recogió en un vaso de precipitados de vidrio.

1 ml de esta solución final se muestreó para ser ensayado mediante una RP HPLC cuantitativa.

10 La solución final filtrada tal como se ha descrito en el punto precedente se filtró a través de una 2^{a} membrana de $0,2 \mu\text{m}$ montada dentro de un soporte de acero inoxidable.

1 ml de esta solución final se muestreo para ser ensayado mediante una RP HPLC cuantitativa.

Unos cartuchos de vidrio de 3 ml se llenaron con 3 ml de la solución final.

REFERENCIAS

1. Grupo de estudio The Lancet 1998; 352,1498-1504.
2. Clegg y Bryant, Exp. Opin. Pharmacother 2001; 2(4): 623-639
3. Derynk R. y colaboradores, Nature 1980; 285, 542-547.
- 5 4. Familletti, P. C., Rubinstein, S., y Pestka, S. 1981 "A Convenient and Rapid Cytopathic Effect Inhibition Assay for Interferon" [Un ensayo conveniente y rápido de la inhibición del efecto citopático para el interferón] in Methods in Enzymology, Vol. 78 (S. Pestka, coordinador de edición), Academic Press, Nueva York, 387-394;
- 10 5. Hultgren C, Milich DR, Weiland O, Sallberg M. (1998). The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th 2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. [El compuesto antivírico ribavirina modula el equilibrio de subconjuntos de células cooperantes T (Th) 1 / Th 2 en respuestas inmunitarias específicas para los virus de las hepatitis B y C] J Gen Virol 1998; 79: 2381-2391.
6. McCormick JB, King IJ, Webb PA, Scribner CL, Craven RB, Johnson KM, Elliott LH, Belmont-Williams R. Lassa fever. Effective therapy with ribavirin [Fiebre de Lassa Terapia eficaz con ribavirina]. N Engl J Med. 1986 Enero 2; 314(1):20-6.
- 15 7. Mark D.F. y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81 (18) 5662-5666 (1984).
8. Pestka, S. (1986) "Interferon Standards and General Abbreviations [Normas para interferones y abreviaturas generales], en Methods in Enzymology (S. Pestka, coordinador de edición), Academic Press, Nueva York 119, 14-23.
- 20 9. Rubinstein, S., Familletti, P.C., y Pestka, S. Convenient Assay for Interferons [Ensayo conveniente para interferones]. J. Virol 1981; 37, 755-758.
10. Shepard H. M. y colaboradores, Nature 1981; 294, 563-565.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica líquida estabilizada, exenta de HSA, que comprende un interferón beta (IFN-beta), en la que dicha formulación es una solución que comprende un tampón, un agente tensioactivo Poloxamer 188, un agente de isotonicidad y un agente antioxidante que es metionina.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho IFN-beta es un IFN-beta recombinante humano.
3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho tampón está presente en una cantidad suficiente para mantener el pH de dicha composición dentro de un intervalo de más o menos 0,5 unidades de un pH especificado, en donde el pH especificado es de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 5,0.
- 10 4. La composición de la reivindicación precedente, en la que dicho pH es de $3,5 \pm 0.2$.
5. La composición de la reivindicación precedente, en la que dicho pH es de $4,5 \pm 0.2$.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho tampón está presente en una concentración de 5 mM a 500 mM.
- 15 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho tampón está presente en una concentración de 10 mM.
8. El tampón de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho tampón es un tampón de acetato.
9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho agente de tonicidad es manitol.
- 20 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho agente de isotonicidad está presente en una concentración de 0,5 mg/ml a 500 mg/ml.
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho agente de isotonicidad está presente en una concentración de 55 mg/ml.
- 25 12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho agente tensioactivo Poloxamer 188 está presente en una concentración de 0,01 mg/ml a 10 mg/ml.
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho agente tensioactivo Poloxamer 188 está presente en una concentración de 1 mg/ml.
14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho agente antioxidante metionina está presente en una concentración de 0,01 a 5,0 mg/ml.
- 30 15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho agente antioxidante metionina está presente en una concentración de 0,1 mg/ml.
16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho interferón beta está presente en una concentración de 10 µg/ml a 800 µg/ml.
- 35 17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho interferón beta está presente en una concentración de 22, 44, 88 o 264 µg/ml.
18. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha composición es una solución acuosa.
19. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un agente bacteriostático.
- 40 20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho agente bacteriostático es alcohol bencílico.
21. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho agente bacteriostático está presente en una concentración de 0,1 % a 2,0 %.

22. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho agente bacteriostático está presente en una concentración de 0,2 % a 0,3 %.
- 5 23. Un método para preparar una composición farmacéutica líquida, estabilizada, exenta de HSA, de acuerdo con las reivindicaciones 1-22, en donde dicho método comprende añadir unas cantidades calculadas del agente tensioactivo Poloxamer 188, el agente antioxidante metionina y el agente de isotonicidad a la solución tamponada y luego añadir el interferón beta (IFN-beta).
24. Un recipiente herméticamente cerrado en condiciones estériles y apropiadas para un almacenamiento antes del uso, que comprende la formulación farmacéutica líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones desde 1 hasta 22.
- 10 25. El recipiente de la reivindicación 24, en donde dicho recipiente es una jeringa previamente llenada para la administración de una sola dosis.
26. El recipiente de la reivindicación 24, en donde dicho recipiente es un vial.
27. El recipiente de la reivindicación 24, en donde dicho recipiente es un cartucho para un auto-inyector.
- 15 28. El recipiente de la reivindicación 25 o 26 en donde dicho recipiente está destinado a la administración de una sola dosis o de múltiples dosis.
29. Un estuche para una administración de múltiples dosis de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones desde 18 hasta 21, en donde el estuche comprende un primer recipiente llenado con una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones desde 1 hasta 17 y un segundo cartucho llenado con una solución del agente bacteriostático.

Figura 1

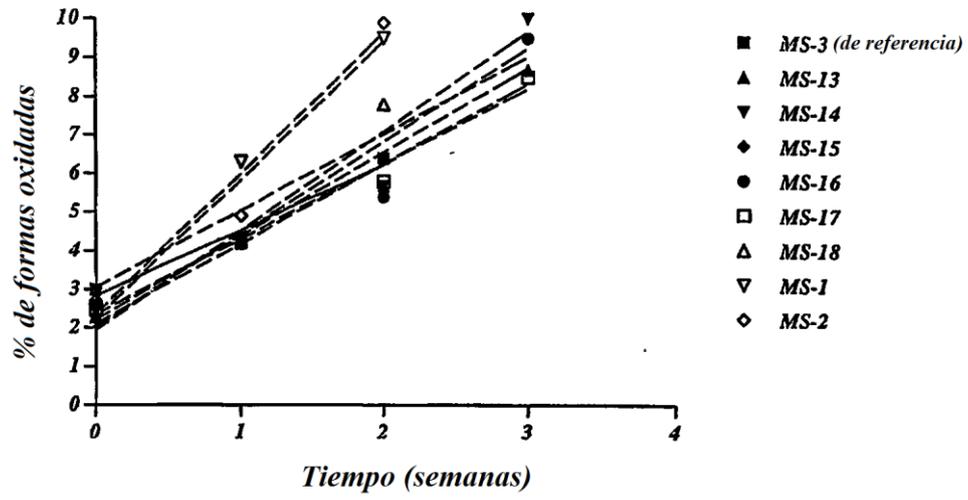


Figura 2

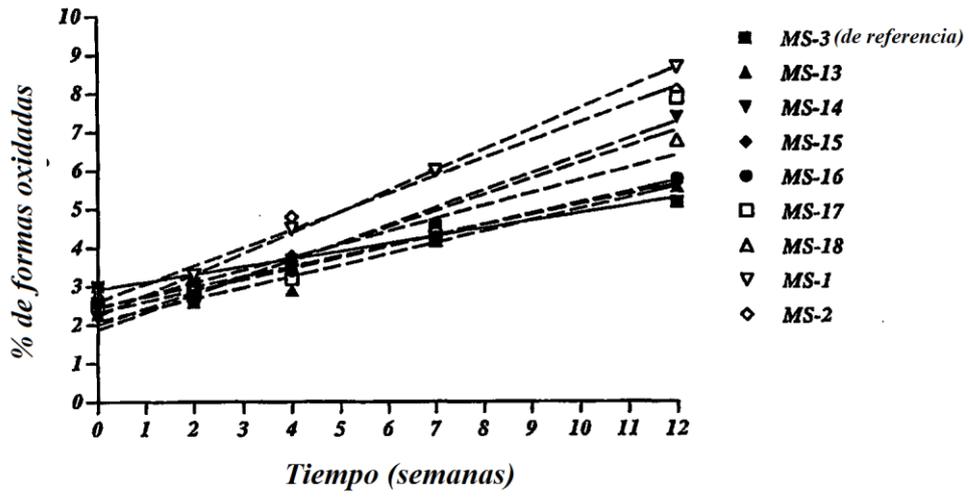


Figura 3

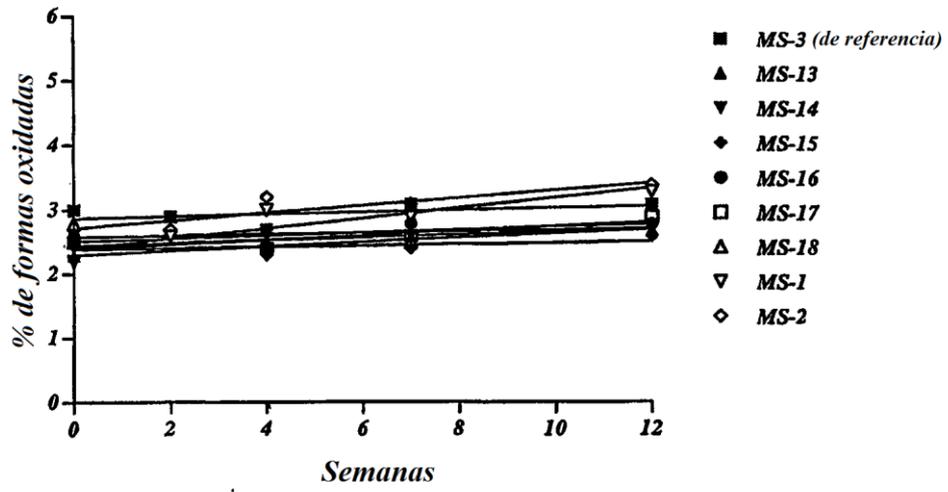


Figura 4

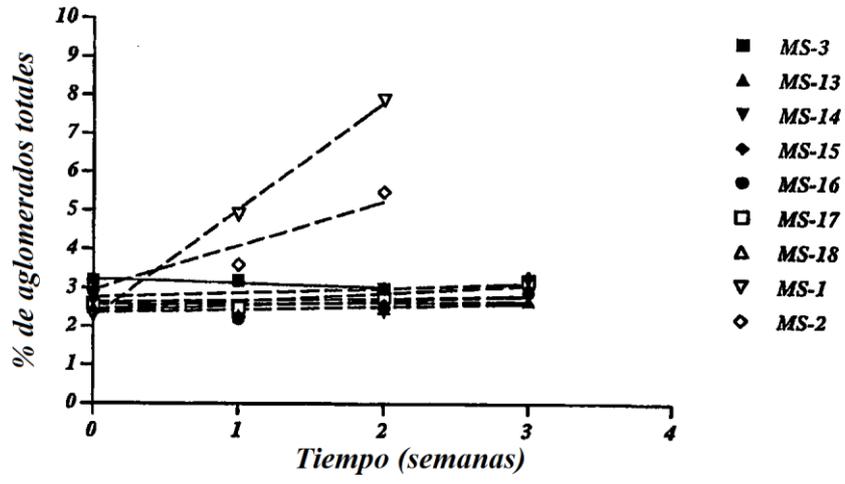


Figura 5

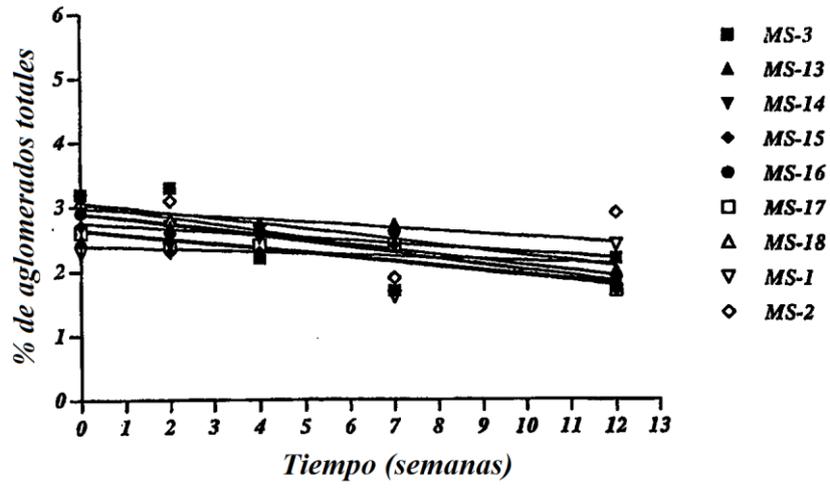


Figura 6

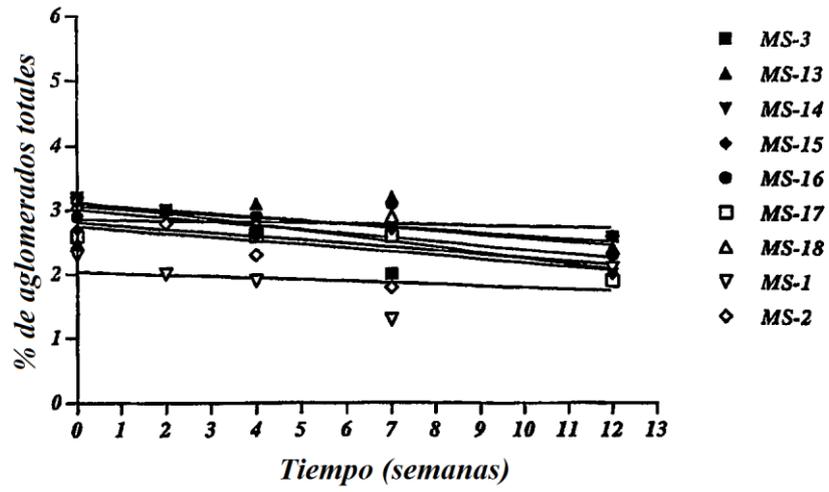


Figura 7

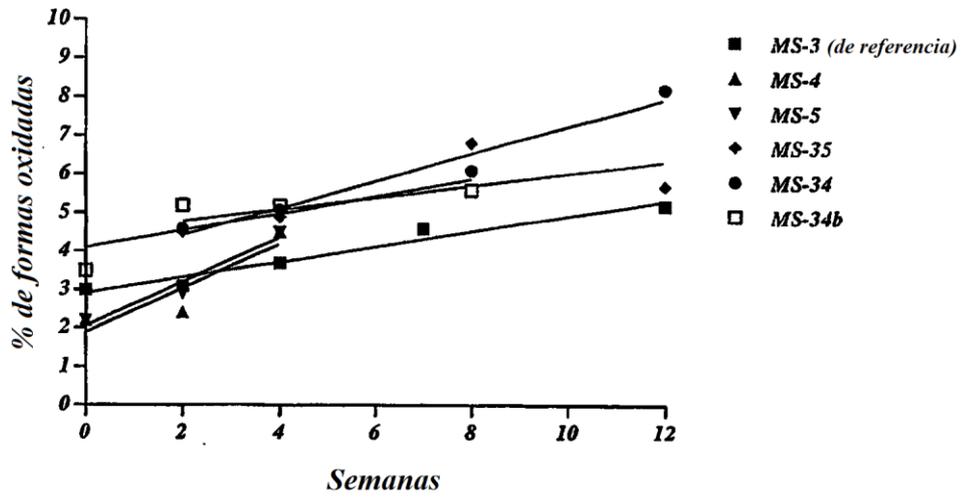


Figura 8

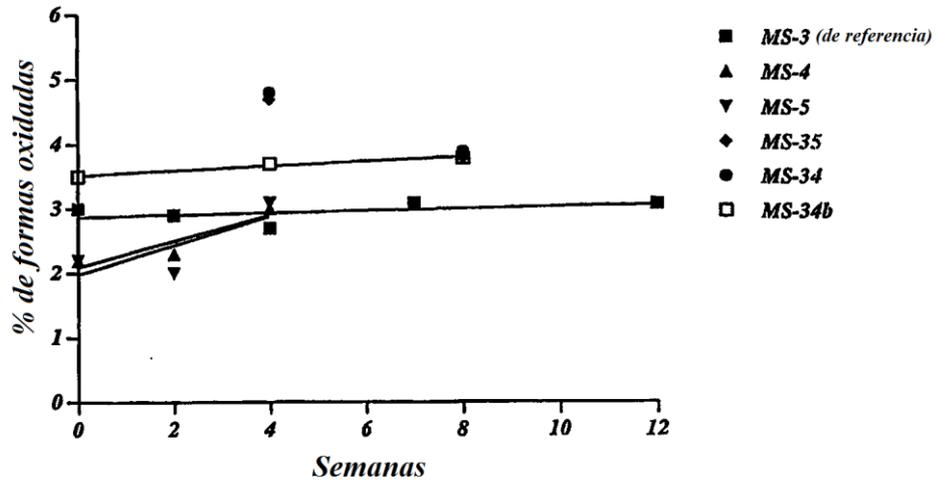


Figura 9

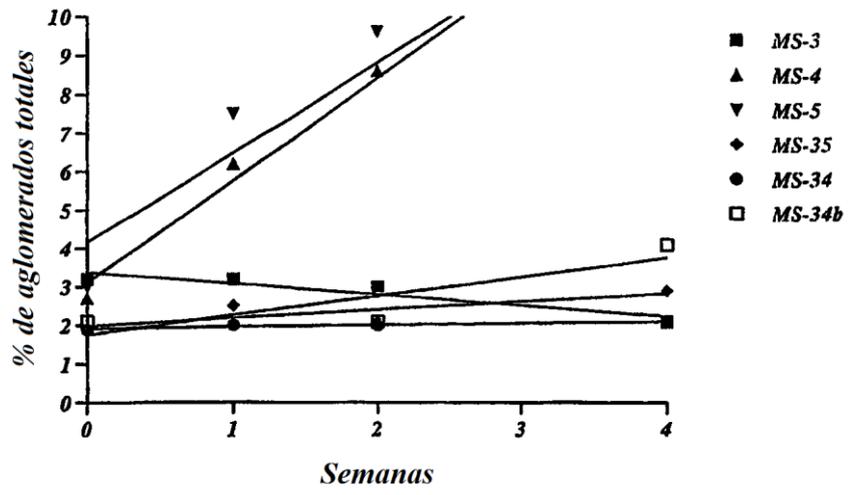


Figura 10

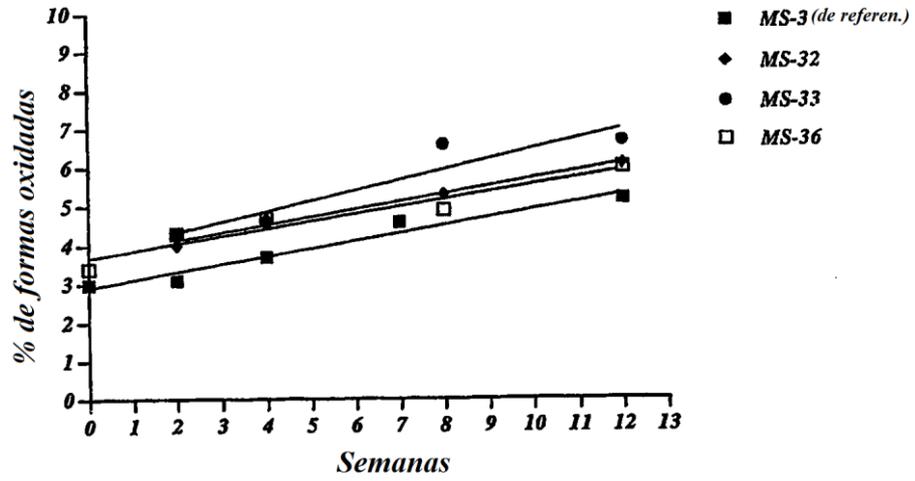


Figura 11

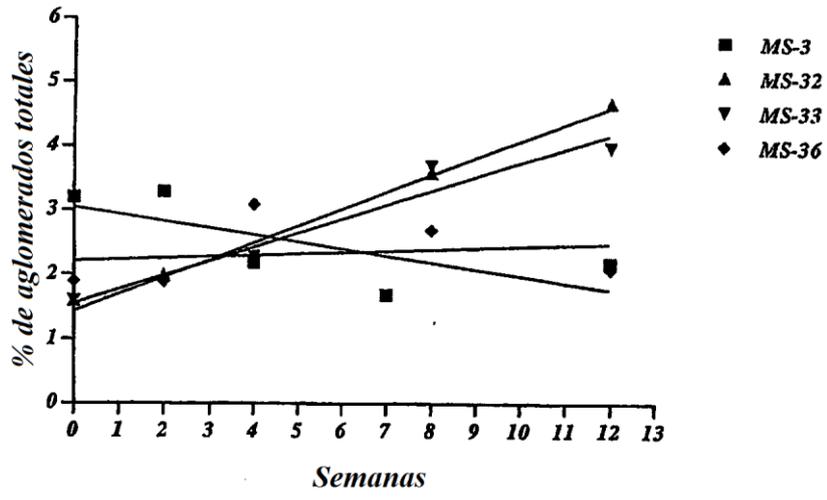


Figura 12

Efectividad de L-Met sobre los datos de estabilidad frente a la oxidación de IFN a 2-8°C

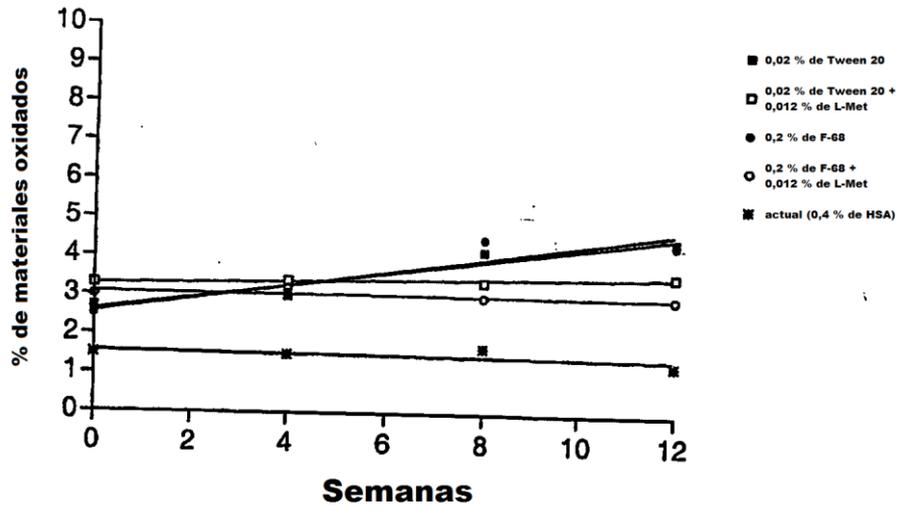


Figura 13

Efectividad de L-Met sobre los datos de estabilidad frente a la oxidación de IFN a 25°C

