

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 418 833**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2005 E 05752765 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1750751**

54 Título: **Formulaciones líquidas de interferón estabilizadas**

30 Prioridad:

01.06.2004 EP 04076626
06.10.2004 US 616378 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.08.2013

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:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 418 833 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).

DESCRIPCION

Formulaciones líquidas de interferón estabilizadas

Campo de la invención

5 La invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen un interferón, más particularmente a formulaciones de interferón-beta que comprenden un agente amortiguador del pH, un aminoácido y un antioxidante.

Antecedentes de la invención

10 Los interferones son citoquinas, es decir proteínas solubles que transmiten mensajes entre células y juegan un papel esencial en el sistema inmune ayudando a destruir microorganismos que causan infección y reparando cualquier daño resultante. Los interferones son secretados de forma natural por las células infectadas y se identificaron por primera vez en 1957. Su nombre deriva del hecho de que "interfieren" en la replicación y la producción de virus.

15 Los interferones exhiben actividad tanto antivírica como antiproliferativa. Sobre la base de las propiedades bioquímicas e inmunológicas, los interferones que se producen de manera natural en el ser humano se agrupan en tres clases principales: interferón-alfa (leucocito), interferón-beta (fibroblasto) e interferón-gamma (inmune). El alfa-interferón está actualmente aprobado en los Estados Unidos y en otros países para el tratamiento de la leucemia de las células pilosas, verrugas venéreas, sarcoma de Kaposi (un cáncer que aflige comúnmente a los pacientes que padecen del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y de hepatitis crónica no A y no B.

20 Además, los interferones (IFNs) son glicoproteínas producidas por el cuerpo en respuesta a una infección vírica. Inhiben la multiplicación de los virus en células protegidas. Los IFNs, que consisten en una proteína de bajo peso molecular, son notablemente no específicos en su acción, es decir el IFN producido por un virus es efectivo contra una amplia gama de otros virus. Sin embargo, son específicos de la especie, es decir el IFN producido por una especie sólo estimulará actividad antivírica en células de la misma especie o de especies estrechamente relacionadas. Los IFNs fueron el primer grupo de citoquinas en ser explotados por sus potenciales actividades antitumorales y antivíricas.

25 Los tres IFNs principales se denominan IFN- α , IFN- β e IFN- γ . Tales clases principales de IFNs fueron inicialmente clasificadas según sus células de origen (leucocitos, fibroblastos o células T). Sin embargo, llegó a ser evidente que una célula podría producir varios tipos. Por tanto, el IFN de leucocitos ahora se llama IFN- α , el IFN de fibroblastos es IFN- β y el IFN de células T es IFN- γ . También existe un cuarto tipo de IFN, el IFN de linfoblastoides, producido en la línea celular "Namalwa" (derivada del linfoma de Burkitt), el cual parece que produce una mezcla tanto de IFN de leucocitos como de fibroblastos.

30 La unidad de interferón o unidad internacional para el interferón (U o IU, para la unidad internacional) ha sido referida en la bibliografía como una medida de la actividad de un IFN, definida como la cantidad necesaria para proteger el 50% de las células contra el daño producido por un virus. El ensayo que puede usarse para medir la bioactividad es el ensayo de inhibición del efecto citopático que está descrito (Rubinstein et al., 1981; Familletti, P.C., et al., 1981). En este ensayo antivírico del interferón, la cantidad necesaria para producir un efecto citopático del 50% es aproximadamente 1 unidad/mL. Las unidades se determinan con respecto al patrón internacional de referencia para Hu-IFN-beta proporcionado por el National Institutes of Health (Pestka, S. 1986).

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

40 Las proteínas clasificadas como IFNs- α son el grupo más diverso que contiene aproximadamente 15 tipos. Hay un grupo de genes IFN- α en el cromosoma 9, que contiene al menos 23 miembros, de los cuales 15 son activos y se transcriben. Los IFN- α s maduros no están glicosilados.

45 Los IFNs- α e IFN- β son todos de la misma longitud (165 ó 166 aminoácidos) con actividades biológicas similares. Los IFN- γ tienen una longitud de 146 aminoácidos, y se parecen a las clases α y β menos estrechamente. Sólo los IFNs- γ pueden activar macrófagos o inducir la maduración de las células T asesinas. Estos nuevos tipos de agentes terapéuticos pueden llamarse algunas veces agentes modificadores de la respuesta biológica (BRMs), porque tienen un efecto sobre la respuesta del organismo al tumor, influyendo sobre el reconocimiento vía inmunomodulación.

50 El interferón de fibroblastos de ser humano (IFN- β) tiene actividad antivírica y también puede estimular a las células asesinas naturales contra las células neoplásicas. Es un polipéptido de aproximadamente 20.000 Da inducido por virus y RNAs de doble hebra. A partir de la secuencia de nucleótidos del gen del interferón de fibroblastos, clonado mediante tecnología de DNA recombinante (Derynk et al. 1980) se dedujo la secuencia completa de aminoácidos de la proteína. Tiene una longitud de 166 aminoácidos.

Shepard et al. (1981) describieron una mutación en la base 842 (Cis \rightarrow Tir en la posición 141) que abolió su actividad antivírica, y un clon variante con una supresión de los nucleótidos 1119-1121.

Mark et al. (1984) insertaron una mutación artificial reemplazando la base 469 (T) con (A) causando un cambio de aminoácido de Cis → Ser en la posición 17. Se informó que el IFN-β resultante era tan activo como el IFN-β “natural” y estable durante el almacenamiento a largo plazo (-70°C).

5 Rebif® (Serono – interferón-β recombinante de ser humano), el último desarrollo en terapia de interferones para la esclerosis múltiple (MS), es interferón(IFN)-beta-1a, producido a partir de líneas de células de mamíferos. Su Nombre Internacional no registrado (INN) es “interferón-beta-1a”.

Cook Stuart D. presenta una revisión acerca de interferones-beta como las terapias aprobadas más ampliamente usadas para la esclerosis múltiple.

10 Como con todos los productos farmacéuticos, un obstáculo importante que ha de superarse en el uso de IFN-beta como agente terapéutico es la pérdida de utilidad farmacéutica que puede proceder de su inestabilidad en las formulaciones farmacéuticas.

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

20 La estabilización de polipéptidos en composiciones farmacéuticas sigue siendo un área en la cual los ensayos de prueba y error juegan un papel importante (revisado por Wang (1999) Int. J. Pharm. 185:129-188; Wang y Hanson (1988) J. Parenteral Sci. Tech. 42:S3-S26). Los excipientes que se añaden a las formulaciones farmacéuticas de polipéptidos para aumentar su estabilidad incluyen agentes de amortiguación del pH, azúcares, tensioactivos, aminoácidos, polietilenglicoles y polímeros, pero los efectos estabilizantes de estos aditivos químicos varían dependiendo de la proteína.

25 Lam Xanthe M. et al., describen la interacción entre alcohol bencílico e IFN-gamma. Con el fin de evitar la desestabilización del interferón es necesaria la minimización de la concentración de alcohol bencílico y la selección de acetato como el agente de amortiguación del pH.

30 Las formulaciones actuales de IFN-beta emplean el uso de HSA como un agente potenciador de la solubilidad de IFN-beta. Sin embargo, el uso de HSA tiene algunos inconvenientes. HSA es un producto de la sangre de ser humano y por lo tanto tiene que cosecharse en sujetos humanos. Aunque se toman medidas para reducir el riesgo, el uso de productos derivados de sangre de ser humano, tales como HSA, conlleva la introducción potencial de virus de ser humano tales como HIV y HCV.

35 El documento US 5762923A describe una composición acuosa de IFN-alfa exenta de HSA la cual comprende además alcohol bencílico y un detergente no iónico tal como Polysorbate 20 en cantidades suficientes para estabilizar el IFN-alfa, así como un agente de amortiguación del pH ácido tal como acetato de amonio, el cual proporciona un pH de 4,5 a 6,0, y un agente isotónico, por ejemplo un aminoácido, preferiblemente arginina, lisina, histidina y metionina.

40 El documento EP 1250932A describe una composición farmacéutica estabilizada de IFN-alfa exenta de HSA que comprende un sistema de amortiguación del pH para mantener el pH en 4,5-9,0, un tensioactivo, un agente isotónico y un agente antioxidante tal como hidroxietil almidón 40 como agente estabilizante.

El documento EP 12224940A describe una formulación líquida de IFN-alfa, la cual está tamponada a pH 5-8, mucho más preferiblemente entre 6,2 y 6,8, con, por ejemplo, acetato o citrato, y que contiene al menos un aminoácido, por ejemplo arginina o metionina.

45 El documento US 2002/172661 A1 describe una composición líquida estabilizada de IFN-beta exenta de HSA que comprende un agente de amortiguación del pH, por ejemplo acetato o ácido aspártico, con un pH preferiblemente de 3,5-4,0, un agente antioxidante tal como EDTA, y otros agentes estabilizantes tales como los tensioactivos Tween 20, Tween 80 y Pluronic F68, y opcionalmente agentes potenciadores de la solubilidad que incluyen el aminoácido arginina.

50 Consecuentemente, hay una necesidad de composiciones farmacéuticas adicionales de IFN-beta que comprendan agentes estabilizantes fisiológicamente compatibles que mejoren la estabilidad de esta proteína y la estabilicen contra la formación de agregados, potenciando de este modo su utilidad farmacéutica. En particular, existe una necesidad de composiciones farmacéuticas líquidas alternativas de IFN-beta exentas de HSA.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida estabilizada exenta de HSA que comprende:

- a) Interferón-beta 1a recombinante de ser humano, 0,088 mg/mL;
- 5 b) Monohidrocloruro de L-lisina, 27,3 mg/mL;
- c) L-metionina, 0,12 mg/mL;
- d) Poloxamer 188, 0,5 mg/mL; y
- e) Acetato de sodio 10 mM a un pH de $4,7 \pm 0,2$.

10 Según una realización de la presente invención las composiciones también comprenden un agente bacteriostático, preferiblemente un agente bacteriostático seleccionado de fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabén (metil, etil, propil, butil y semejantes), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, dehidroacetato de sodio y timerosal.

Cuando se usa en la presente memoria, un "interferón" o "IFN" quiere decir interferón-beta 1a.

15 Cuando se usa en la presente memoria, el término "muteínas" se refiere a análogos de IFN en los cuales uno o más de los residuos aminoácidos de un IFN natural están reemplazados por diferentes residuos aminoácidos, o están suprimidos, o uno o más residuos aminoácidos están añadidos a la secuencia natural de IFN, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con el IFN tipo natural. Estas muteínas son preparadas mediante síntesis conocidas o mediante técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio, o por cualquier otra técnica conocida adecuada para tal fin. Las muteínas preferidas incluyen, por ejemplo, las descritas por Shepard et al. (1981) o Mark et al. (1984).

20 Cualquiera de tales muteínas tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicada de la de IFN, tal como para tener una actividad sustancialmente similar o incluso mejor que la de un IFN. La función biológica del interferón es bien conocida por los expertos en la técnica y los patrones biológicos están establecidos y disponibles, por ejemplo en el National Institute for Biological Standards and Control (http://immunology.org/links/NIBSC).

25 Se han descrito bioensayos para la determinación de la actividad de IFNs. Por ejemplo, puede llevarse a cabo un ensayo de IFNs como describieron Rubinstein et al., 1981. Así, puede determinarse si cualquier muteína dada tiene sustancialmente una actividad similar o incluso mejor que un IFN por medio de experimentación rutinaria.

30 Las muteínas de IFN, o los ácidos nucleicos que las codifican, incluyen una serie finita de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden ser obtenidas rutinariamente por un experto en la técnica, sin experimentación excesiva, basándose en las enseñanzas y guías presentadas en la presente memoria.

35 Los cambios preferidos en las muteínas son los que son conocidos como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de los polipéptidos o proteínas descritas en la presente memoria pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo, los cuales tienen propiedades físico-químicas suficientemente similares tal que la sustitución entre miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula, está claro que también pueden hacerse inserciones y supresiones de aminoácidos en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o supresiones sólo implican a unos pocos aminoácidos, por ejemplo, por debajo de treinta, y preferiblemente por debajo de diez, y no eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína.

40 Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la tabla I. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la tabla II; y mucho más preferiblemente los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la tabla III.

Tabla I
Grupos de aminoácidos sinónimos preferidos

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

Tabla II
Grupos de aminoácidos sinónimos más preferidos

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

Tabla III
Grupos de aminoácidos sinónimos mucho más preferidos

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

5 Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden usarse para obtener muteínas de IFN incluyen métodos conocidos, tales como los presentados en las patentes de EE.UU. 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, de Mark et al.; 5.116.943 de Koths et al., 4.965.195 de Namen et al.; 4.879.111 de Chong et al.; y 5.017.691 de Lee et al.; y las proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de EE.UU. nº 4,904.584 (Shaw et al.). Muteínas específicas de IFN-beta han sido descritas, por ejemplo, por Mark et al., 1984.

10 La expresión "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido que comprende un IFN, o una de sus muteínas, condensado con otra proteína la cual, por ejemplo, tiene un tiempo de residencia prolongado en los fluidos corporales. Así, un IFN puede estar condensado con otra proteína, polipéptido o semejante, por ejemplo, una inmunoglobulina o uno de sus fragmentos.

15 Cuando se usa en la presente memoria, la expresión "derivados funcionales" cubre los derivados de IFN, y sus muteínas y proteínas de fusión, las cuales pueden prepararse por medios conocidos en la técnica a partir de grupos funcionales que se encuentran como cadenas laterales en los residuos o en los grupos N- o C-terminales. Cuando se usan en la presente memoria, tales derivados continúan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir no destruyen la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad del IFN, y no confieren propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen. Estos derivados pueden, por ejemplo, incluir cadenas laterales de polietilenglicol, las cuales pueden enmascarar sitios antigénicos y prolongar la residencia del IFN en los fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxílicos, amidas de los grupos carboxílicos por reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, N-acil derivados de grupos amino libres de los residuos aminoácidos formados con restos acilo (por ejemplo, grupos alcanilo o aroilo carbocíclicos) u O-acil derivados de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de residuos de serilo o treonilo) formados con restos acilo.

20 Como "fracciones activas" de IFN, o muteínas y proteínas de fusión, la presente invención describe cualquier fragmento o precursor de la cadena de polipéptido de la molécula de proteína solo o junto con moléculas o residuos asociados unidos al mismo, por ejemplo, residuos de azúcares o fosfato, o agregados de la moléculas de proteína o de los residuos de azúcares por sí mismos, siempre que dicha fracción no tenga una actividad significativamente reducida en comparación con el correspondiente IFN.

30 En la presente memoria la expresión "sales" se refiere tanto a sales de grupos carboxilo y como a sales de adición de ácidos de grupos amino de las proteínas descritas anteriormente o sus análogos. Pueden formarse sales de un grupo carboxilo por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio,

amonio, férricas o de cinc, y semejantes, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y semejantes. Las sales de adición de ácidos incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Desde luego, cualquiera de tales sales

5 tiene que retener la actividad biológica de las proteínas (IFN) descrita en la presente invención, es decir, la capacidad para enlazarse al correspondiente receptor e iniciar la transmisión de la señal del receptor.

Según la presente invención, el IFN-beta 1a recombinante de ser humano es particularmente preferido.

Recientemente se ha descrito una clase especial de variante de interferones. Los denominados "interferones de consenso" son variantes de IFN no encontradas en la naturaleza (documento US 6.013.253).

10 Cuando se usa en la presente memoria, interferón de consenso (IFN-con) significará un polipéptido no encontrado en la naturaleza, el cual predominantemente incluye aquellos residuos aminoácidos que son comunes a una subserie de IFNs-alfa representativa de la mayoría de las secuencias de los subtipos de interferones de leucocitos de ser humano y que incluye, en una o más de aquellas posiciones en las que no hay ningún aminoácido común a todos los subtipos, un aminoácido que predominantemente se encuentra en esa posición y en ningún caso incluye

15 algún residuo aminoácido que no exista en esa posición en al menos un subtipo encontrado en la naturaleza. IFN-con engloba, pero no está limitado a, secuencias de aminoácidos designadas IFN-con1, IFN-con2 e IFN-con3, las cuales están descritas en los documentos US 4.695.623, 4.897.471 y 5.541.293. Pueden producirse secuencias de DNA que codifican IFN-con como se describe en las patentes anteriormente mencionadas, o mediante otros métodos estándar.

20 También se describen en la presente memoria proteínas de fusión que comprenden IFN y una Ig de fusión. La fusión puede ser directa o vía un péptido corto de enlace el cual puede ser tan corto como 1 a 3 residuos aminoácidos de longitud o más largo, por ejemplo, 13 residuos aminoácidos de longitud. Dicho agente enlazante puede ser un tripéptido de la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia enlazante de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gli-Ala-Gli-Leu-Val-Leu-Gli-Gli-Gln-Phe-Met introducida entre la secuencia de IFN y la

25 secuencia de inmunoglobulina. La proteína de fusión resultante puede tener mejores propiedades, tales como un tiempo de residencia prolongado en los fluidos corporales (vida media), una mayor actividad específica, un mayor grado de expresión, o se facilita la purificación de la proteína de fusión.

También se describe en la presente memoria un IFN condensado con la región constante de una molécula de Ig. Preferiblemente, está condensado con regiones de las cadenas pesadas, como los dominios CH2 y CH3 de IgG1 de ser humano, por ejemplo. Otras isoformas de moléculas de Ig también son adecuadas para la generación de

30 proteínas de fusión, tales como las isoformas IgG2, IgG3 ó IgG4, u otras clases de Ig como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monoméricas o multiméricas, hetero- u homo-multiméricas.

La dosificación administrada, como dosis únicas o múltiples, a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, que incluyen propiedades farmacocinéticas, la ruta de administración, las afecciones y características del

35 paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), extensión de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

La dosificación de IFN-beta en el tratamiento de la MS reincidente-remitente depende del tipo de IFN-beta usado.

Cuando IFN es IFN-beta 1b recombinante producido por E. coli, comercialmente disponible con la marca comercial Betaseron®, puede preferiblemente administrarse subcutáneamente cada segundo día con una dosificación de

40 aproximadamente 250 a 300 µg u 8 MIU a 9,6 MIU por persona.

Según la presente invención, cuando IFN es IFN-beta 1a recombinante producido por células de ovario de hámster chino (células CHO), comercialmente disponibles con la marca comercial Avonex®, puede preferiblemente administrarse intramuscularmente una vez a la semana con una dosificación de aproximadamente 30 µg a 33 µg ó 6

MIU a 6,6 MIU por persona.

45 Según la presente invención, cuando IFN es IFN-beta 1a recombinante producido por células de ovario de hámster chino (células CHO), comercialmente disponibles con la marca comercial Rebif®, puede preferiblemente administrarse subcutáneamente tres veces a la semana (TIW) con una dosificación de aproximadamente 22 a 44 µg o 6 MIU a 12 MIU por persona.

La administración de ingredientes activos puede ser por ruta intravenosa, intramuscular o subcutánea. La ruta preferida de administración de IFN es la ruta subcutánea. Una ruta más preferida de administración es la

50 administración intramuscular, la cual puede, por ejemplo, aplicarse una vez a la semana.

IFN también puede administrarse diariamente o cada dos días, de menos frecuente. Preferiblemente, IFN se administra una, dos o tres veces por semana.

El término "estabilidad" se refiere a la estabilidad física, química y conformacional de las formulaciones de interferón de la invención (incluyendo el mantenimiento de la potencia biológica). La inestabilidad de una formulación de

55

proteínas puede ser causada por degradación química o agregación de las moléculas de proteína para formar polímeros de mayor orden, desglicosilación, modificación de la glicosilación, oxidación o cualquier otra modificación estructural que reduce al menos una actividad biológica de un polipéptido interferón incluido en la presente invención.

5 Una disolución o formulación “estable” es una en la que el grado de degradación, modificación, agregación, pérdida de actividad biológica y alteraciones semejantes, de proteínas en la misma está aceptablemente controlado y no aumenta inaceptablemente con el tiempo. Preferiblemente, la formulación retiene al menos 60 ó aproximadamente 60%, más preferiblemente al menos 70 ó aproximadamente 70%, mucho más preferiblemente al menos 80 ó aproximadamente 80% de la actividad del interferón marcado en un período de 12 a 24 meses. Las composiciones de IFN estabilizadas exentas de HSA de la invención tienen preferiblemente una vida media de al menos 6 meses, 12 meses, 18 meses, más preferiblemente al menos 20 meses, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 22 meses, mucho más preferiblemente al menos aproximadamente 24 meses cuando se almacenan a 2-8°C.

15 En la técnica están disponibles métodos para monitorizar la estabilidad de las composiciones farmacéuticas de IFN exentas de HSA de la invención, incluyendo los métodos descritos en los ejemplos descritos en la presente memoria. Así, la formación de agregados de IFN durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida de la invención puede determinarse fácilmente midiendo el cambio del IFN soluble en disolución a lo largo del tiempo. La cantidad de polipéptido soluble en disolución puede cuantificarse mediante varios ensayos analíticos adaptados para la detección de IFN. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, (RP)-HPLC de fase inversa y espectroscopía de absorción UV, como se describe en los ejemplos siguientes.

20 La determinación tanto de agregados solubles como insolubles durante el almacenamiento en formulaciones líquidas puede, por ejemplo, conseguirse usando ultracentrifugación analítica como se señala en los ejemplos siguientes para distinguir entre la porción del polipéptido soluble que está presente como agregados solubles y la porción que está presente en forma no agregada, en forma molecular biológicamente activa. Además, la ultracentrifugación por gradiente de velocidad es capaz de detectar tanto oligómeros con enlaces covalentes como no covalentes tanto cuantitativa como cualitativamente. Asimismo, un nuevo método de exclusión molecular (SE)-HPLC (descrito en los ejemplos), denominado “NEW SEC” en la presente memoria, es capaz de detectar tanto oligómeros enlazados covalente como no covalentemente tanto cuantitativa como cualitativamente.

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

30 El término “aminoácido” se refiere a un aminoácido o a una combinación de aminoácidos, en la que cualquier aminoácido dado está presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, todos pueden estar presentes en sus formas de sal, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras que otros están presentes en sus formas de sal. Los aminoácidos preferidos son los que portan una cadena lateral cargada, en la presente memoria denominados “aminoácido(s) de cadena lateral cargada”, tales como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Más preferiblemente, el aminoácido es lisina. Puede usarse cualquier estereoisómero (es decir, isómero L, D, o DL) de un aminoácido particular, o combinaciones de estos estereoisómeros, en tanto y cuanto el aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Preferiblemente, se usa el estereoisómero L. También pueden usarse análogos de estos aminoácidos preferidos. La expresión “análogo de aminoácido” se refiere a un derivado del aminoácido que se encuentra en la naturaleza. Análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina y N-monoetil L-arginina. Como con los aminoácidos preferidos, los análogos de aminoácidos se usan en su forma de base libre o en su forma de sal. En la presente memoria a los aminoácidos también se les denomina agentes estabilizantes.

35 El o los aminoácidos usados en la presente formulación de la invención protegen al polipéptido terapéuticamente activo contra varias tensiones aumentando y/o manteniendo de este modo la estabilidad de la formulación de interferón-beta. En la presente memoria, el término “tensión” incluye, pero no se limita a, calor, congelación, pH, luz, agitación, oxidación, deshidratación, superficies, cizalla, congelación/descongelación, presión, metales pesados, compuestos fenólicos, agentes desnaturalizantes, etc. El término tensión engloba cualquier factor que module (es decir, reduzca, mantenga o aumente) la estabilidad de la formulación que contenga interferón-beta. El aumento y/o mantenimiento de la estabilidad con la adición de un aminoácido depende de la concentración. Esto es, mayores concentraciones de aminoácido conducen a una mayor y/o al mantenimiento de la estabilidad de la formulación que contiene interferón-beta de la presente invención cuando la formulación que contiene interferón-beta normalmente exhibe formación de agregados u oligómeros en ausencia del aminoácido. La determinación de la cantidad de un aminoácido particular a usar en la presente formulación de la invención con el fin de disminuir la formación de agregados u oligómeros y de este modo aumentar la estabilidad de la proteína monomérica, puede determinarse fácilmente sin experimentación excesiva usando métodos en general conocidos por un experto en la técnica.

La expresión “agente amortiguador del pH” o “agente amortiguador del pH fisiológicamente aceptable” se refiere a disoluciones de compuestos que se sabe son seguras para el uso farmacéutico o veterinario en formulaciones y que tienen el efecto de mantener o controlar el pH de la formulación en el intervalo de pH deseado para la formulación. Agentes amortiguadores del pH, aceptables para controlar el pH en un pH moderadamente ácido a moderadamente básico, incluyen, pero no se limitan a, compuestos tales como fosfatos, acetatos, citratos, arginina, TRIS e histidina. “TRIS” se refiere a 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol y a cualquiera de sus sales farmacológicamente aceptables. Los agentes preferibles amortiguadores del pH son agentes amortiguadores del pH acetatos con disolución salina o una sal aceptable.

Un “agente isotónico” es un compuesto que es fisiológicamente tolerado e imparte una tonicidad adecuada a una formulación para impedir el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con la formulación. Para tales fines, normalmente se usan compuestos tales como glicerina en concentraciones conocidas. Otros agentes isotónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, manitol, aminoácidos o proteínas (por ejemplo, glicina o albúmina), sales (por ejemplo, cloruro de sodio) y azúcares (por ejemplo, dextrosa, manitol, sacarosa y lactosa).

La expresión “agente antioxidante” se refiere a un compuesto que impide que el oxígeno o los radicales libres derivados de oxígeno interaccionen con otras sustancias. Los agentes antioxidantes están entre varios excipientes comúnmente añadidos a sistemas farmacéuticos para potenciar la estabilidad física y química. Los agentes antioxidantes se añaden para minimizar o retardar los procesos oxidantes que se producen con algunos fármacos o excipientes tras la exposición al oxígeno o en presencia de radicales libres. Estos procedimientos pueden con frecuencia ser catalizados por luz, temperatura, hidrógeno o concentración, presencia de metales en cantidades traza o de peróxidos. Como agentes antioxidantes en fármacos se usan frecuentemente sulfitos, bisulfitos, tiourea, metionina, sales del ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisól butilado (BHA). Se ha encontrado que EDTA de sodio refuerza la actividad de los agentes antioxidantes quelando iones metálicos que de otra manera catalizarían la reacción de oxidación. El agente antioxidante más preferido es metionina. En la presente memoria, a los agentes antioxidantes también se los denomina agentes estabilizantes.

La metionina puede estar presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Puede usarse cualquier estereoisómero (es decir, isómero L, D, o DL) de metionina en tanto y cuanto la metionina esté presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Preferiblemente, se usa el estereoisómero L. También pueden usarse análogos de metionina. La expresión “análogo de metionina” se refiere a un derivado de la metionina que se encuentra en la naturaleza. Los análogos de metionina también pueden usarse en su forma de base libre o en su forma de sal. En la presente memoria a los aminoácidos también se les denomina agentes estabilizantes.

El aumento y/o mantenimiento de la estabilidad con la adición de agentes antioxidantes (por ejemplo, metionina) depende de la concentración. Esto es, mayores concentraciones de agentes antioxidantes conducen a una mayor y/o al mantenimiento de la estabilidad de la formulación que contiene interferón-beta de la presente invención cuando la formulación que contiene interferón-beta normalmente exhibe oxidación o formación de agregados u oligómeros en ausencia del agente antioxidante. La determinación de la cantidad de un agente antioxidante (por ejemplo, metionina) a usar en la presente formulación de la invención, con el fin de disminuir la oxidación o formación de agregados u oligómeros, puede realizarse fácilmente sin experimentación excesiva usando métodos en general conocidos por un experto en la técnica.

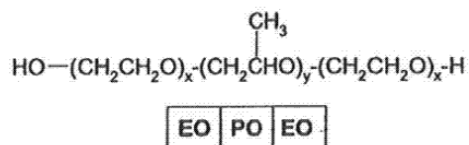
La expresión “agente bacteriostático” se refiere a un compuesto o a composiciones añadidas a una formulación para que actúen como un agente antibacteriano. Ejemplos de agentes bacteriostáticos incluyen fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabén (metil, etil, propil, butil y semejantes), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, dehidroacetato de sodio y timerosal. Preferiblemente, el agente bacteriostático es alcohol bencílico.

El término “tensioactivo” se refiere a un compuesto soluble que reduce la tensión superficial de los líquidos, o reduce la tensión interfacial entre dos líquidos o un líquido y un sólido, tensión superficial que es la fuerza que actúa sobre la superficie de un líquido tendiendo a minimizar el área de la superficie. Algunas veces, los tensioactivos se han usado en formulaciones farmacéuticas, incluyendo la liberación de fármacos y polipéptidos de baja masa molecular, con el fin de modificar la absorción del fármaco o su liberación en los tejidos diana. Tensioactivos bien conocidos incluyen polisorbatos (derivados de polioxitileno; Tween) así como Pluronic.

Se ha encontrado que formulando interferón con un tensioactivo seleccionado de Pluronic® F77, Pluronic F87, Pluronic F88 y Pluronic® F68, particular y preferiblemente Pluronic F68 (BASF, Pluronic F68 también se conoce como Poloxamer 188), se obtiene una formulación estable que minimiza la pérdida del principio activo provocada por adsorción sobre las superficies del vial y/o dispositivo de administración (por ejemplo, una jeringa, bomba, catéter, etc.). También se ha encontrado que formulando interferón con un tensioactivo seleccionado de Pluronic® F77, Pluronic F87, Pluronic F88 y Pluronic® F68, particular y preferiblemente Pluronic F68 (BASF, Pluronic F68 también se conoce como Poloxamer 188), se obtiene una formulación estable, la cual es más resistente a la oxidación y a la formación de agregados de proteínas.

ES 2 418 833 T3

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



Los tensioactivos Pluronic se sintetizan por un procedimiento de dos etapas:

- 5 1. Se crea un hidrófobo del peso molecular deseado mediante la adición controlada de óxido de propileno a los dos grupos hidroxilo de propilenglicol; y
2. Se añade óxido de etileno para emparejar el hidrófobo entre los grupos hidrófilos.

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

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

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

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

Las propiedades típicas de Pluronic F77 se listan a continuación:

- Peso molecular promedio: 6600;
- Punto de fusión/vertido: 48°C;
- Forma física @ 20°C: sólido;
- 20 Viscosidad (Brookfield) cps: 480 (líquidos a 25°C, pastas a 60°C y sólidos a 77°C);
- Tensión superficial, dinas/cm @ 25°C,
 - Concentración 0,1%: 47,0.
 - Concentración 0,01%: 49,3.
 - Concentración 0,001%: 52,8.
- 25 Tensión interfacial, dinas/cm @ 25°C vs. Nujol;
 - Concentración 0,1%: 17,7.
 - Concentración 0,01%: 20,8.
 - Concentración 0,001%: 25,5.
- Humectación (ensayo de Draves), segundos a 25°C
- 30 Concentración 1,0%: > 360
- Concentración 0,1%: > 360
- Altura de la espuma
 - Ross Miles, 0,1%, mm @ 50°C: 100
 - Ross Miles, 0,1%, mm @ 26°C: 47
- 35 Dinámica, 0,1% mm @ 400 mL/min: > 600
- Punto de turbidez en disolución acuosa, °C
 - Concentración 1: > 100

Concentración 10%: > 100.

HLB (balance hidrófilo-lipófilo): 25.

Las propiedades típicas de Pluronic F87 se listan a continuación:

Peso molecular promedio: 7700;

5 Punto de fusión/vertido: 49°C;

Forma física @ 20°C: sólido;

Viscosidad (Brookfield) cps: 700 (líquidos a 25°C, pastas a 60°C y sólidos a 77°C);

Tensión superficial, dinas/cm @ 25°C,

Concentración 0,1%: 44,0.

10 Concentración 0,01%: 47,0.

Concentración 0,001%: 50,2.

Tensión interfacial, dinas/cm @ 25°C vs. Nujol;

Concentración 0,1%: 17,4.

Concentración 0,01%: 20,3.

15 Concentración 0,001%: 23,3.

Humectación (ensayo de Draves), segundos a 25°C

Concentración 1,0%: > 360

Concentración 0,1%: > 360

Altura de la espuma

20 Ross Miles, 0,1%, mm @ 50°C: 80

Ross Miles, 0,1%, mm @ 26°C: 37

Dinámica, 0,1% mm @ 400 mL/min: > 600

Punto de turbidez en disolución acuosa, °C

Concentración 1: > 100

25 Concentración 10%: > 100

HLB (balance hidrófilo-lipófilo): 24.

Las propiedades típicas de Pluronic F88 se listan a continuación:

Peso molecular promedio: 11400;

Punto de fusión/vertido: 54°C;

30 Forma física @ 20°C: sólido;

Viscosidad (Brookfield) cps: 2300 (líquidos a 25°C, pastas a 60°C y sólidos a 77°C);

Tensión superficial, dinas/cm @ 25°C,

Concentración 0,1%: 48,5.

Concentración 0,01%: 52,6.

35 Concentración 0,001%: 55,7.

Tensión interfacial, dinas/cm @ 25°C vs. Nujol;

Concentración 0,1%: 20,5.

Concentración 0,01%: 23,3.

Concentración 0,001%: 27,0.

Humectación (ensayo de Draves), segundos a 25°C

5 Concentración 1,0%: > 360

Concentración 0,1%: > 360

Altura de la espuma

Ross Miles, 0,1%, mm @ 50°C: 80

Ross Miles, 0,1%, mm @ 26°C: 37

10 Dinámica, 0,1% mm @ 400 mL/min: > 600

Punto de turbidez en disolución acuosa, °C

Concentración 1: > 100

Concentración 10%: > 100

HLB (balance hidrófilo-lipófilo): 28.

15 Las propiedades típicas de Pluronic F68 se listan a continuación:

Peso molecular promedio: 8400;

Punto de fusión/vertido: 52°C;

Forma física @ 20°C: sólido;

Viscosidad (Brookfield) cps: 1000 (líquidos a 25°C, pastas a 60°C y sólidos a 77°C);

20 Tensión superficial, dinas/cm @ 25°C,

Concentración 0,1%: 50,3.

Concentración 0,01%: 51,2.

Concentración 0,001%: 52,6.

Tensión interfacial, dinas/cm @ 25°C vs. Nujol;

25 Concentración 0,1%: 19,8.

Concentración 0,01%: 24,0.

Concentración 0,001%: 26,0.

Humectación (ensayo de Draves), segundos a 25°C

Concentración 1,0%: > 360

30 Concentración 0,1%: > 360

Altura de la espuma

Ross Miles, 0,1%, mm @ 50°C: 35

Ross Miles, 0,1%, mm @ 26°C: 40

Dinámica, 0,1% mm @ 400 mL/min: > 600

35 Punto de turbidez en disolución acuosa, °C

Concentración 1: > 100

Concentración 10%: > 100

HLB (balance hidrófilo-lipófilo): 29.

En las formulaciones descritas en la invención también pueden usarse otros polímeros que tengan propiedades similares a los de los listados anteriormente. El tensioactivo preferido es Pluronic F68, también conocido como Poloxamer 188.

Pluronic, particularmente Pluronic F68, está preferiblemente presente en una concentración que sea suficiente para mantener la estabilidad del interferón durante el período de almacenamiento deseado (por ejemplo 12 a 24 meses) y también en una concentración que sea suficiente para impedir las pérdidas de proteínas debido a la adsorción sobre las superficies, tales como el vial, la ampolla o cartucho o la jeringa.

Preferiblemente, la concentración de Pluronic, particularmente Pluronic F68, en formulaciones líquidas es 0,01 o aproximadamente 0,01 mg/mL a 10 o aproximadamente 10 mg/mL, más preferiblemente 0,05 o aproximadamente 0,05 mg/mL a 5 o aproximadamente 5 mg/mL, más particular y preferiblemente 0,1 o aproximadamente 0,1 mg/mL a 2 o aproximadamente 2 mg/mL, mucho más preferiblemente 0,5 o aproximadamente 0,5 mg/mL. Según la presente invención, la concentración de Pluronic F68 es 0,5 mg/mL.

Preferiblemente, la concentración de IFN-beta 1a en la formulación es 10 o aproximadamente 10 µg/mL a 800 o aproximadamente 800 µg/mL, más preferiblemente 20 o aproximadamente 20 µg/mL a 500 o aproximadamente 500 µg/mL, más particular y preferiblemente 30 o aproximadamente 30 µg/mL a 300 o aproximadamente 300 µg/mL, mucho más preferiblemente 22, 44, 88 ó 264 µg/mL. Según la presente invención, la concentración de IFN-beta 1a recombinante es 0,088 mg/mL.

Preferiblemente, las formulaciones tienen un pH entre 3,5 o aproximadamente 3,5 y 5,5 o aproximadamente 5,5, más preferiblemente 4,7 o aproximadamente 4,7. Un agente amortiguador preferido es el acetato, siendo los contraiones preferidos sodio o potasio. Los agentes amortiguadores del pH de sales acetato son bien conocidos en la técnica. La concentración de agente amortiguador del pH en la disolución total puede variar entre 5 o aproximadamente 5 mM, 9,5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM y 500 mM. Preferiblemente, la concentración de agente amortiguador del pH es 10 o aproximadamente 10 mM. Según la presente invención, el agente amortiguador del pH es un agente amortiguador del pH acetato de sodio 10 mM con un pH de 4,7 ± 0,2.

Preferiblemente, el agente antioxidante, por ejemplo metionina, está presente en una concentración de 0,01 o aproximadamente 0,01 mg/mL a 5,0 o aproximadamente 5,0 mg/mL, más preferiblemente 0,05 o aproximadamente 0,05 mg/mL a 0,3 o aproximadamente 0,3 mg/mL, mucho más preferiblemente 0,12 o aproximadamente 0,12 mg/mL. Según la presente invención, el agente antioxidante es metionina y está presente en una concentración de 0,12 mg/mL.

Preferiblemente, el aminoácido, por ejemplo lisina, está presente en una concentración de 1 o aproximadamente 1 mg/mL a 100 o aproximadamente 100 mg/mL, más preferiblemente 10 o aproximadamente 10 mg/mL a 50 o aproximadamente 50 mg/mL, mucho más preferiblemente 27,3 o aproximadamente 27,3 mg/mL. Según la presente invención, el aminoácido es monohidrocloreto de L-lisina y está presente en una concentración de 27,3 mg/mL.

La invención proporciona formulaciones líquidas específicas exentas de HSA. El disolvente preferido es agua para inyectar.

Las formulaciones líquidas pueden ser monodosis o de múltiples dosis. Las formulaciones líquidas de interferones de la invención que se pretende sean para uso de múltiples dosis preferiblemente comprenden un agente bacteriostático, tal como fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabén (metil, etil, propil, butil y semejantes), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, dehidroacetato de sodio y timerosal. Son particularmente preferidos fenol, alcohol bencílico y m-cresol, y el más preferido es el alcohol bencílico. El agente bacteriostático se usa en una cantidad que dará una concentración que sea efectiva para mantener la formulación esencialmente exenta de bacterias (adecuada para inyectar) durante el período de inyecciones de múltiples dosis, el cual puede ser 12 o aproximadamente 12 ó 24 horas a 12 o aproximadamente 12 días. Preferiblemente, el agente bacteriostático está presente en una concentración de 0,1 o aproximadamente 0,1% (masa de agente bacteriostático/masa de disolvente) a 2,0 o aproximadamente 2,0%, más preferiblemente 0,2 o aproximadamente 0,2% a 1,0 o aproximadamente 1,0%. En el caso del alcohol bencílico, son particularmente preferidas concentraciones de 0,2 ó 0,3%.

Sin embargo, el uso de un agente conservante, por ejemplo alcohol bencílico, no está limitado a las formulaciones de múltiples dosis, sino que también pueden añadirse a formulaciones monodosis. Una realización de la presente invención consiste en formulaciones que contienen alcohol bencílico.

En otra realización de las formulaciones según la presente invención, el interferón beta está en al menos aproximadamente 96% o al menos aproximadamente 98% en su forma de monómero (menos que 4, más preferiblemente menos que 2% de agregados) a temperatura ambiente o a 2-8°C, que se mide mediante el análisis de la velocidad de sedimentación descrito más adelante.

Una formulación preferida descrita en la presente memoria consiste en interferón-beta 1a, alcohol bencílico, lisina, metionina, Pluronic F-68 y un agente amortiguador del pH tipo acetato en disolución acuosa, preferiblemente para ajustar el pH de 3,7 a 4,7.

5 El intervalo de interferón en las formulaciones incluye cantidades que dan tras la reconstitución concentraciones de 1,0 o aproximadamente 1,0 µg/mL a 50 o aproximadamente 50 mg/mL, aunque puede trabajarse con concentraciones mayores o menores y son dependiente del vehículo de administración pretendido, por ejemplo, las formulaciones en disolución diferirán del parche transdérmico y de los métodos pulmonares, transmucosales, u osmóticos o de microbombas. La concentración de interferón es preferiblemente 5,0 o aproximadamente 5,0 µg/mL a 2 o aproximadamente 2 mg/mL, más preferiblemente 10 o aproximadamente 10 µg/mL a 1 o aproximadamente 1 mg/mL, mucho más preferiblemente 30 o aproximadamente 30 µg/mL a 100 o aproximadamente 100 µg/mL.

10 Preferiblemente, las formulaciones de la invención retienen al menos 60 o aproximadamente 60%, más preferiblemente al menos 70 o aproximadamente 70%, mucho más preferiblemente al menos 80 o aproximadamente 80% de la actividad del interferón en el momento del envasado durante un período de 24 meses.

También se describe un método para fabricar una composición farmacéutica líquida como se describió antes.

15 También se describe un método para fabricar una composición farmacéutica envasada que comprende colocar una disolución que comprende el ingrediente activo y los excipientes como se describió antes.

También se describe un artículo de fabricación para uso farmacéutico en seres humanos, que comprende un vial que comprende las composiciones farmacéuticas que se describieron antes, y material escrito que detalla que tal disolución puede mantenerse durante un período de veinticuatro o aproximadamente veinticuatro horas o mayor después del primer uso. Preferiblemente, el material escrito especifica que la disolución puede mantenerse hasta 12 o aproximadamente 12 días.

20 Después del primer uso de una formulación de múltiples dosis, puede mantenerse y usarse durante al menos 24 o aproximadamente 24 horas, preferiblemente al menos 4, 5 ó 6 o aproximadamente 4, 5 ó 6 días, más preferiblemente hasta 12 días. Después del primer uso, la formulación se almacena preferiblemente por debajo de la temperatura ambiente (es decir, por debajo de 25 o aproximadamente 25°C), más preferiblemente por debajo de 10 o aproximadamente 10°C, más preferiblemente por debajo de 2-8 o aproximadamente 2-8°C, mucho más preferiblemente a 4-6 o aproximadamente 4-6°C.

25 Las formulaciones de la presente invención pueden prepararse mediante un procedimiento que comprende añadir las cantidades calculadas de los excipientes a la disolución amortiguadora del pH y a continuación añadir el interferón.

A continuación, la disolución resultante se coloca en viales, ampollas o cartuchos. Un experto en la técnica se dará cuenta de que son posibles variaciones de este procedimiento. Por ejemplo, el orden de los componentes a añadir, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los cuales se prepara la formulación, son todos factores que pueden optimizarse respecto a la concentración y el medio de administración usado.

35 En el caso de una formulación para usar en múltiples dosis, el agente bacteriostático puede añadirse a la disolución que contenga el ingrediente activo (interferón) o alternativamente puede mantenerse en un vial o cartucho separado y subsiguientemente mezclarse con la disolución que contiene el ingrediente activo en el momento del uso.

40 Las formulaciones de la invención pueden administrarse usando dispositivos reconocidos. Ejemplos que comprenden estos sistemas de viales únicos incluyen dispositivos auto-inyectores o inyectores tipo lápiz para la administración de una disolución tal como Rebiject®.

45 Los productos ahora reivindicados incluyen material de envasado. El material de envasado proporciona, además de la información requerida por las agencias reguladoras, las condiciones bajo las cuales puede usarse el producto. El material de envasado de la presente invención proporciona instrucciones al paciente, si se necesitan, para preparar la disolución final y para usar tal disolución final durante un período de veinticuatro horas o mayor para el producto de dos viales, húmedo/seco. Para el vial único, producto en disolución, la etiqueta indica que tal disolución puede usarse durante un período de veinticuatro horas o mayor. Los productos ahora reivindicados son útiles para usar como productos farmacéuticos para seres humanos.

50 Las formulaciones estables conservadas pueden darse a pacientes como disoluciones transparentes. La disolución puede ser de un único uso o puede volver a usarse múltiples veces y puede ser suficiente para un único ciclo o para múltiples ciclos de tratamiento a un paciente y proporcionar así un régimen de tratamiento más conveniente que los actualmente disponibles.

55 En el interferón en las formulaciones o disoluciones estables o conservadas descritas en la presente memoria, puede administrarse a un paciente según la presente invención vía una variedad de métodos de administración que incluyen inyección SC o IM; medios pulmonares, transmucosales, implantes, bombas osmóticas, cartuchos, microbombas, orales u otros medios apreciados por el experto como es bien conocido en la técnica.

El término “vial” se refiere a un reservorio adecuado para retener interferón en forma sólida o líquida en un estado estéril contenido. Ejemplos de un vial como se usa en la presente memoria incluyen ampollas, cartuchos, envases tipo ampolla, u otros de tales reservorios adecuados para la administración del interferón a un paciente vía una jeringa, bomba (incluyendo la osmótica), catéter, parche transdérmico, nebulizador pulmonar o transmucosal. Los viales adecuados para envasar productos para la administración parenteral, pulmonar, transmucosal o transdérmica son bien conocidos y reconocidos en la técnica.

El término “tratamiento” dentro del contexto de esta invención se refiere a cualquier efecto beneficioso sobre la progresión de la enfermedad, incluyendo la atenuación, reducción, decrecimiento o disminución del desarrollo patológico después del inicio de la enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria que comprenden IFN o una isoforma, muteína, proteína condensada, derivado funcional, fracción activa o sal son útiles en el diagnóstico, prevención y tratamiento (local o sistémico) de afecciones clínicas que responden a la terapia con este polipéptido. Tales afecciones clínicas incluyen por ejemplo, trastornos o enfermedades del sistema nervioso central (SCN), cerebro y/o médula espinal, que incluyen la esclerosis múltiple; enfermedades autoinmunes, que incluyen la artritis reumatoide, la psoriasis, la enfermedad de Crohn; y cánceres, que incluyen los cánceres de mama, próstata, vejiga, riñón y colon.

La referencia a etapas de métodos conocidos, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o convencionales no es de ninguna manera una admisión de que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención esté descrito, enseñado o sugerido en la técnica relevante.

La descripción precedente de las realizaciones específicas revelará así completamente la naturaleza general de la invención que otros pueden, aplicando el conocimiento dentro de la destreza de la técnica (que incluye el contenido de las referencias citadas en la presente memoria), modificarán y/o adaptarán fácilmente para varias aplicaciones tales como realizaciones específicas, sin experimentación excesiva, sin apartarse del concepto general de la presente invención. Se ha de entender que la fraseología o terminología de la presente memoria es con el fin de describir y no de limitar, tal que la fraseología o terminología de la presente memoria descriptiva es para ser interpretada por un experto en la técnica a la luz de las enseñanzas y guías presentadas en la presente memoria, en combinación con el conocimiento de un experto en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Métodos analíticos

Para la medida de las concentraciones de agregados y oligómeros de interferón-beta 1a de ser humano (r-h IFN-beta 1a o r-h β IFN-1^a) se usaron la cromatografía de exclusión molecular (SE)-HPLC, en la presente memoria denominada “NEW SEC”, y la ultracentrifugación por gradiente de velocidad (AUC). Los métodos de SE)-HPLC y AUC presentados a continuación son capaces de detectar oligómeros enlazadas tanto covalente como no covalentemente tanto cuantitativa como cualitativamente.

a. SE-HPLC- Ensayo de pureza

La detección del contenido de agregados totales se realiza en una columna TSK G2000SWXL (TosoHaas) o una BioSuite (Waters); la elución se realiza en modo isocrático a 0,5 mL/min usando una disolución amortiguadora del pH de acetato de sodio 50 mM, NaCl 50 mM, pH 3,8; la longitud de onda se ajusta a 215 nm. El tiempo de análisis es 30 min. Las muestras con una concentración de 88 μ g/mL se analizan como están inyectando 100 μ L.

b. Análisis por velocidades de sedimentación – AUC

1. Descripción del método

Se cargan muestras en células con piezas centradas de carbón de 2 canales con una longitud óptima de 12 mm. Las piezas centradas y las ventanas de zafiro se limpian con detergente y luego se empapan en agua para tratar de tener superficies lo más limpias posibles. El placebo correspondiente se carga en el canal de referencia (el instrumento funciona como un espectrofotómetro de doble rayo). Las células cargadas se limpian a continuación en un rotor analítico Beckman Optima XL-I, y se llevan a 20°C. A continuación, el rotor se lleva a 3000 rpm y se hace un barrido de las muestras (pico de absorbancia a 280 nm) para confirmar la carga óptima de células. Luego, el rotor se lleva a la velocidad final de análisis de 50000 rpm. Se registran 50 barridos por cada muestra a esta velocidad del rotor.

Los datos se analizan usando el método *c(s)* desarrollado por Peter Schuck en el N.I.H., e implantado en su programa de análisis SEDFIT (versión 8.7, Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modelling. *Biophys. J.* 78, 1606-1619).

En este enfoque, muchos datos primarios se ajustan directamente para derivar los coeficientes de distribución o sedimentación, a la vez que se modela la influencia de la difusión en los datos con el fin de reforzar la resolución. El método funciona asignando un coeficiente de difusión a cada valor del coeficiente de sedimentación basado en la

suposición de que todas las especies tienen la misma forma hidrodinámica global (definiéndose la forma por la relación del coeficiente friccional con respecto a la de una esfera, f/fo). A continuación, se varían los valores de f/fo para encontrar el mejor ajuste global de los datos para cada muestra. Las distribuciones se calculan usando una suavización de la entropía máxima de 0,51.

5 2. Parámetros analíticos

	- Tipo de rotor	Rotor de 8 agujeros
	- Velocidad del rotor	50000 rpm
	- Piezas centrales	Carbón epon
	- Longitud del canal	12 mm
10	- Temperatura durante el análisis AUC	20°C
	- Longitud de onda de detección	280 nm
	- Volumen de muestra	432 μ L
	- Volumen de referencia	442 μ L.

3. Equipamiento y paquete informático

- 15 Ultracentrífuga analítica modelo XL-I (Beckman Coulter).
Paquete informático SEDFIT versión (Peter Schuck – National Institutes of Health).
Paquete informático Origin versión 6.03 (Beckman Coulter).
Paquete informático Proteome Lab XL-A/XL-I versión 5.0 (Beckman Coulter).

c. Cuantificación de IFN- β -1a por RP-HPLC-QUANT-HPLC

- 20 El método de fase inversa descrito más adelante permite la cuantificación de IFN- β -1a en muestras.

La cuantificación de la proteína se realiza en una columna C4, Wide-Pore Butyl 5 μ m, 4,6x250 mm (Baker); la longitud de onda se ajusta a 214 nm y la elución se realiza a 1 mL/min usando la siguiente fase móvil y gradiente: A = agua/ácido trifluoroacético 0,1% - B = acetonitrilo/ácido trifluoroacético 0,1% - C = acetonitrilo.

Las muestras se analizan inyectando 50 μ L de la muestra como está (muestras de 88 μ L/mL).

25 **Tabla 4**

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

Tiempo de análisis = 65 min.

La cuantificación de las muestras se realiza frente a una curva patrón en el intervalo de 0,0125 mg/mL – 0,2 mg/mL preparada por un material de referencia estándar.

d. Pureza por (RP)-HPLC de fase inversa – DEF/OX

- 30 El método de fase inversa descrito más adelante permite la detección de formas oxidadas de IFN- β -1a, las cuales eluyen diferentemente de la molécula intacta.

La cuantificación de las formas oxidadas se realiza en una columna LC-304 Supercosil C4 (Supelco) termostataada a 40°C; la longitud de onda se ajusta a 208 nm y la elución se realiza a 1 mL/min usando la siguiente fase móvil y gradiente: 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%.

5 Gradiente:

Tabla 5

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

Tiempo de análisis = 96 min (70 min + 26 min para equilibrar)

Las muestras se analizaron como estaban inyectando 200 µL (muestras de 88 µg/mL).

e. Bioensayo de inhibición del efecto citopático - CPE

10 Biopotencia (actividad antivírica)

La actividad antivírica de IFN-β-1a se mide mediante el bioensayo de inhibición del efecto citopático (CPE).

La actividad biológica se mide mediante un ensayo antivírico basado en la protección de células (tejido amniótico de ser humano – células WISH) inducida por IFN-β frente al efecto citopático de un virus (Virus Vesicular Stomatitis).

15 El principio del bioensayo del interferón descansa en el hecho de que varios virus tales como el Virus Vesicular Stomatitis (VSV) causan la muerte celular que puede visualizarse por tinción vital.

20 El efecto citopático puede entonces usarse para cuantificar la protección celular por el interferón. El ensayo se realiza mediante la medida indirecta de la muerte celular, la cual se evalúa por las cantidades de colorante MTT (dimetiltiotetrazolio) tipo sal de tetrazolio absorbida por las células vivas. El método usa la determinación espectrofotométrica automática del porcentaje de células protegidas y de un ensayo de líneas paralelas de tres puntos para la evaluación estadística del título.

Procedimiento:

El ensayo se realiza en placas de microtitulación.

- a. Se añaden 50 µL de medio de cultivo celular (MEM/FBS al 5%) a cada pocillo.
- 25 b. Se añaden a los pocillos 100 µL de muestra de IFN-β-1a o de disolución estándar (60-100 IU hIFN-β/mL) y se realizan tres diluciones 1:1,5 en etapas de fila a fila en las placas.
- c. Se añaden 50 µL de una suspensión de células WISH ($0,78-0,82 \times 10^6$ células /mL) a cada pocillo y las placas se incuban a 37°C durante 18-20 horas en un incubador humidificado con CO₂ al 5%.
- d. Se añade una suspensión de VSV a cada pocillo excepto a los pocillos con las células testigo, rellenos con MEM/FBS al 2,5%.
- 30 e. Se incuban las placas durante 24 horas en incubador humidificado con CO₂ al 5%, a 37°C.
- f. Después de verificar mediante un microscopio invertido que: (1) al menos 80% del daño celular se consigue en la fila testigo de VSV, y (2) los valores medios de protección en porcentaje en presencia del patrón IFN-β caen en el intervalo de 84% para el patrón no diluido, 45% para la dilución 1:1,5 y 27% para la dilución 1:3. Los cultivos se tiñen con el colorante MTT específico.
- 35 g. La intensidad de la coloración se determina por lectura espectrofotométrica automática a 592 nm.
- h. Para cuantificar la actividad de IFN-β-1a, las lecturas de OD (densidad óptica) se analizan a continuación mediante un programa de ordenador (Colombo Software).

Ejemplo 2 – Estabilización de formulaciones de interferón beta-1a exento de HSA

40 El siguiente experimento se llevó a cabo para verificar el efecto protector ejercido por una formulación que comprende un aminoácido (es decir, lisina) y un agente antioxidante (es decir, metionina) durante el almacenamiento

de una formulación de r-h IFN-beta 1a a varias temperaturas (2-8°C, 25°C y 40°C). Durante el desarrollo (véase el ejemplo 1) se usaron los siguientes ensayos y métodos analíticos:

- Actividad biológica (bioensayo in vitro)
- Pureza (método RP-HPLC)
- 5 - Productos de oxidación (método Deg-ox)
- Dímeros/agregados (NEW SEC-HPLC y AUC, ambos métodos son capaces de detectar oligómeros covalentes y no covalentes)
- Método RP-HPLC cuantitativo (Quant-HPLC)
- pH (método potenciométrico).

10 Los resultados se indican en las tablas 6 a 8.

1. Procedimiento:

- a. La formulación se fabricó usando una disolución madre almacenada/transportada a 2-8°C. La concentración de r-h IFN-beta 1a en la disolución madre fue aproximadamente 0,5 mg/mL.
- 15 a. La formulación, que comprende lisina (como se indicó en el punto 2) se fabricó diluyendo la sustancia fármaco en un vehículo alcanzando así la composición final (concentración de r-h IFN-beta 1a de 88 µg/mL).
- b. La disolución mezclada se filtró entonces asepticamente a través de una membrana de nilón de 0,2 micrómetros y se recogió en un recipiente estéril; las jeringas se rellenaron a continuación con 0,5 mL usando una máquina de llenado.
- 20 c. A continuación, la muestra se almacenó en cabinas termostáticas a 2-8°C, 25°C y 40°C y se ensayó según un plan de estabilidad usando varios métodos/ensayos hasta aproximadamente 2 meses de almacenamiento (1-3 semanas para muestras almacenadas a 40°C).

2. Composición de la formulación:

- a. r-h IFN-beta 1a 0,088 mg/mL
- 25 b. Monohidrocloruro de L-lisina (código 1.05701, Merck) 27,3 mg/mL
- c. L-metionina (1.05707, Merck) 0,12 mg/mL
- d. Pluronic F-68 0,5 mg/mL (Lutol F 68 DAC, USP/NF, Basf), 5163315
- e. Acetato de sodio 10 mM pH 4,7.

30 3. Resultados:

Tabla 6 – Almacenamiento a 2-8°C

2-8°C				
	T = 0	4w	6w	8w
Quant-HPLC (ug/jer)	39,0	38,2	39,8	39,2
HPLC deg-ox (% oxidado)	1,3	1,5	1,5	1,5
AUC (% de monómero)	98,7	-	98,8	-
New-SEC (% de monómero)	100,0	100,0	100,0	100,0
pH	4,7	4,7	-	4,7
Bioensayo (MIU/mL)	24,1	24,6	-	-
Osmolaridad (OSM/kg)	0,303	-	-	-

Tabla 7 – Almacenamiento a 25°C

25°C					
	T = 0	2w	4w	6w	8w
Quant-HPLC (ug/jer)	39,0	42,8	38,0	39,4	37,8
HPLC deg-ox (% oxidado)	1,3	1,5	1,4	2,3	2,3
AUC (% de monómero)	98,7	99,0	-	98,2	-
New-SEC (% de monómero)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PH	4,7	4,7	4,7	-	4,7
Bioensayo (MIU/mL)	24,1	-	24,0	-	-

Tabla 8 – Almacenamiento a 40°C

40°C			
	T = 0	1w	3w
Quant-HPLC (ug/jer)	39,0	37,8	34,9
HPLC deg-ox (% oxidado)	1,3	1,9	3,4
AUC (% de monómero)	98,7	99,6	.
New-SEC (% de monómero)	100,0	100,0	100,0
pH	4,7	4,7	4,6

4. Conclusiones:

5 Los estudios de almacenamiento muestran que una formulación o composición que comprende lisina, metionina y Pluronic F68 permanece estable a 2-8°C así como a 25°C hasta 8 semanas. Permanecen estables a 40°C hasta 3 semanas en términos de grado de porcentaje de monómero (el porcentaje de monómero es siempre mayor que 98%). Dos métodos diferentes confirman estos resultados (AUC y NEW-SE-HPLC). Así, la formulación comprende preferiblemente una combinación de un aminoácido y un agente antioxidante. Preferiblemente, además se añade un
10 tensioactivo a la composición.

Preferiblemente, el aminoácido es lisina y el agente antioxidante es metionina. Preferiblemente, el tensioactivo se selecciona de Tween (por ejemplo, Tween 20), Pluronic® F77, Pluronic F87, Pluronic F88 y Pluronic F68. Más preferiblemente, el tensioactivo es Pluronic F68.

15 Preferiblemente, la formulación se ajusta aun intervalo de pH de 3,5 a 5,5. Más preferiblemente, la formulación se ajusta a un pH de 4,7.

Preferiblemente, la lisina está presente en una concentración de aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL. Más preferiblemente, la lisina está presente en una concentración de aproximadamente 27,3 mg/L. Preferiblemente, el tensioactivo está presente en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL. Más preferiblemente, el tensioactivo está presente en una concentración de
20 aproximadamente 0,5 mg/L. Preferiblemente, el agente antioxidante está presente en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 5,0 mg/mL. Más preferiblemente, el agente antioxidante está presente en una concentración de aproximadamente 0,12 mg/L. Preferiblemente, el interferón está presente en una concentración de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 800 µg/mL. Más preferiblemente, el interferón está presente en una concentración de aproximadamente 88 µg/L.

25

30

REFERENCIAS

1. Derynk R. et al., Nature 1980; 285, 542-547.
2. Familletti, P. C., Rubinstein, S., and Pestka, S. 1981 "A Convenient and Rapid Cytopathic Effect Inhibition Assay for Interferon," in Methods in Enzymology, Vol. 78 (S. Pestka, ed.), Academic Press, New York, 387-394;
3. Mark D.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81 (18) 5662-5666 (1984).
4. Pestka, S. (1986) "Interferon Standards and General Abbreviations," in Methods in Enzymology (S. Pestka, ed.), Academic Press, New York 119, 14-23.
5. Rubinstein, S., Familletti, P.C., and Pestka, S. Convenient Assay for Interferons. J. Virol 1981; 37, 755-758.
6. Shepard H. M. et al., Nature 1981; 294, 563-565.
7. Cook Stuart D. "Advancing treatment with interferon beta-1b (Betaferon/Betaseron) in the next decade – thinking beyond the standard dose", Journal of Neurology Dec. 2003, vol. 250 Suppl. 4, pages IV15-IV20.
8. Lam Xanthe M. et al. "The effect of benzyl alcohol on recombinant human interferon-gamma", Pharmaceutical Research (New York), vol. 14, no. 6, 1997, pages 725-729.

5

10

15

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica líquida estabilizada exenta de HSA, que comprende:
 - a. Interferón-beta 1a recombinante de ser humano, 0,088 mg/mL;
 - b. Monohidrocloruro de L-lisina, 27,3 mg/mL;
 - 5 c. L-metionina, 0,12 mg/mL;
 - d. Poloxamer 188, 0,5 mg/mL; y
 - e. Acetato de sodio 10 mM a un pH de $4,7 \pm 0,2$.
2. La composición según la reivindicación 1, que además comprende un agente bacteriostático seleccionado de fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabén (metil, etil, propil, butil y semejantes), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, dehidroacetato de sodio y timerosal.
- 10 3. La composición según la reivindicación 2, en la que el agente bacteriostático es alcohol bencílico.
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el interferón está al menos en aproximadamente 96% o al menos en aproximadamente 98% como un monómero.
5. Un recipiente herméticamente sellado en condiciones estériles y apropiadas para el almacenamiento antes del uso, que comprende la formulación líquida farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 15 6. El recipiente según la reivindicación 5, en que dicho recipiente es una jeringa, un vial o un auto-inyector pre-rellenados.
7. Uso de una composición de IFN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la esclerosis múltiple.
- 20 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para usar en un método para el tratamiento de la esclerosis múltiple.