

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 054**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/19** (2006.01)

**A61K 47/12** (2006.01)

**A61K 38/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2007 E 07870524 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 2097068**

54 Título: **Formulaciones de los conjugados de PEG-interferón alfa**

30 Prioridad:

**24.11.2006 IN MU19362006**

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

**22.11.2013**

73 Titular/es:

**CADILA HEALTHCARE LIMITED (100.0%)  
ZYDUS TOWER SATELLITE CROSS ROADS  
AHMEDABAD 380 015, GUJARAT, IN**

72 Inventor/es:

**BANDYOPADHYAY, SANJAY;  
NATARAJAN, VENKATESAN;  
MENDIRATTA, SANJEEV KUMAR y  
PATEL, PANKAJ RAMANBHAI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 431 054 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Formulaciones de los conjugados de PEG-interferón alfa

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a las nuevas formulaciones liofilizadas y estabilizadas de conjugados de PEG-interferón alfa y los procedimientos para su preparación.

**Antecedentes de la invención.**

10 La principal desventaja en el uso terapéutico de la mayoría de los compuestos biológicos es que se administran a través de ruta parenteral, p.ej. de forma intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), etc., lo que significa que la liberación en el paciente se asocia con dolor y malestar. Es más, a causa de sus muy cortas vidas medias, los biológicos requieren frecuentes administraciones en el paciente con el fin de mantener los niveles sanguíneos terapéuticos del fármaco. Muchos tipos de inyecciones que no se pueden auto administrar, requieren viajes frecuentes a la clínica, además de añadir incomodidad al paciente. Existen múltiples tipos de ejemplos de fármacos biológicos que requieren de una frecuente administración. El interferón alfa-2a (Roferon, Roche) y el interferón alfa-2b (Intron A, Shering AG), las dos formas recombinantes del interferón alfa, usados en el tratamiento de las hepatitis crónicas B y C tienen una vida media menor a 12 h (McHutchison, et al., Engl. J.Med. 1998, 339, 1485-1492; Glue, et al., Clin. Pharmacol. Ther. 2000, 68, 556-567) y en consecuencia requieren una administración de 3 veces a la semana. Se requieren también inyecciones repetidas con interferón beta-1b (Betaseron) para tratar a los pacientes con esclerosis múltiple (EM). La dosificación recomendada es mediante ruta subcutánea administrada cada dos días. Otro ejemplo de un medicamento que requiere inyecciones repetidas es la filgrastima (factor estimulante de colonias de granulocitos, o G-CSF), donde se dan las inyecciones cada día con una duración del tratamiento de dos semanas.

25 Un método muy exitoso y bien aceptado que supera los inconvenientes descritos de frecuentes inyecciones de altas dosis con el fin de mantener los niveles de umbral del medicamento en el cuerpo es el de incrementar la vida media in-vivo de la proteína terapéutica mediante su conjugación con un polímero, preferiblemente polietilenglicol (PEG). Las moléculas de PEG con sus largas cadenas no solamente crean un escudo protector alrededor de la molécula pegilada del fármaco en solución acuosa reduciendo de esta forma la inmunogenicidad de la proteína farmacológica mientras también las protegen de la acción de las proteasas, sino que también ayudan además a incrementar la vida media del fármaco circulante mediante el aumento de su volumen hidrodinámico el cual reduce su pérdida por los mecanismos de filtración del entramado del glomérulo renal. La parte del PEG se elimina sin ningún cambio estructural tras su separación de la molécula de proteína, y su aclaramiento es proporcional al peso molecular. Desde los años 1970 se ha publicado la conjugación de proteínas a PEG. Por regla general, la fracción de PEG se ancla a la proteína mediante una activación del PEG, en primer lugar, para hacerla reaccionar después con la cadena lateral del residuo de lisina y/o el grupo amino N-terminal de la proteína. El PEG que se usa más frecuentemente es el PEG monofuncional porque su fracción es más resistente a la agregación y al entrecruzamiento. Uno de estos ejemplos se describe en Davis et al. in US Pat. No. 4,179,337. Los conjugados PEG-proteína se forman mediante la reacción de un material biológicamente activo con un exceso de concentración molar de un polímero altamente activado que posee un grupo amino terminal de unión sin tener en cuenta dónde se pueda anclar el polímero a la proteína, y dando lugar a una composición peptídica fisiológicamente activa, soluble en agua y no-inmunogénica. La pegilación de los interferones se ha publicado en U.S. Pat. Nos. 4,766,106 and 4,917,888 el cual describe entre otros, interferón beta conjugado con polímeros activados incluyendo mPEG-2,4,6-tricloro-S-triazina, m-PEG-N-succinimidil glutarato o mPEG-N-succinimidil succinato. Una de estas descripciones en U.S. Pat. No. 5,951,974 relata la conjugación del interferón a un polímero substancialmente no-antigénico a un sitio de histidina. Otra de estas descripciones en U.S. Pat.No. 5,981,709 describe un polímero de interferón alfa conjugado con una relativamente alta vida media circulante.

45 Algunas proteínas pegiladas terapéuticas disponibles comercialmente incluyen, ADAGEN (adenosindeaminasa bovina pegilada), la cual se usa para tratar el síndrome de inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X; PEGASYS ( interferón alfa 2a pegilado), el cual se usa en el tratamiento de la hepatitis C; PEG-Intron (interferón alfa 2b pegilado) para la hepatitis C crónica; Oncaspar (L-aspariginasa pegilada) para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda en pacientes que son hipersensibles a la forma nativa no modificada de la L-asparaginasa; y, Neulasta (metionil factor estimulante de colonias de granulocitos humano recombinante pegilado) para la neutropenia inducida por quimioterapia del cáncer.

55 El virus de la hepatitis C (HCV) constituye una de las mayores causas de enfermedad hepática en el mundo. Casi 200 millones de personas están afectadas en todo el mundo. El interferón en combinación con ribavirina ha mostrado ser efectivo en la disminución de la carga viral de los pacientes con hepatitis C crónica, sin embargo, se necesita administrarlo 3 veces a la semana. El PEG-interferón alfa es un conjugado covalente de interferón alfa 2b recombinante con monometoxiPEG en una proporción molar 1:1 (Glue P et al., Clin Pharmacol Ther. 2000; 68; 556-567). La vida media promedio de absorción del PEG-interferón alfa 2b es 5 veces mayor que la del interferón alfa 2b no-pegilado. La vida media promedio de eliminación es de 40 horas en pacientes con infección de hepatitis C. Otro producto es el PEG-interferón alfa 2a, el cual tiene una molécula de cadena ramificada de 40 kDa con cada rama de

PEG con un peso molecular promedio de 20 kDa. Las dos cadenas de monometoxy PEG están unidas mediante enlaces uretano hidrolíticamente estables a una molécula de lisina conectora, uno en el grupo amino alfa de la lisina y el otro en el grupo amino  $\epsilon$  de la lisina. La vida media promedio de absorción del PEG-interferón alfa es 10 veces mayor que el interferón alfa no pegilado. La vida media promedio de eliminación es de alrededor de 60 horas en pacientes con infección de hepatitis C. Ambos productos perfeccionados solamente necesitan ser administrados en un régimen de una vez a la semana.

Mientras algunos conjugados polímero-proteína son estables en forma líquida, otros no lo son. Por ejemplo, a diferencia del caso del PEG-interferón alfa 2a donde la pegilación da lugar a un enlace uretano estable, el cual es ante todo estable en medio acuoso, el producto de PEG-interferón alfa 2b, el cual primitivamente contiene un PEG unido a un residuo de histidina (His 34), es altamente inestable en la forma líquida. Con estos conjugados polímero-proteína se tienen que utilizar técnicas como la liofilización/deshidratación por congelación- un proceso donde se sublima el agua de una composición tras su congelación- el cual puede dar lugar a una forma estable al biológico por encima de un periodo de tiempo deseado. Así, para preparar una formulación estable de PEG-interferón alfa 2b, se necesita liofilizar cuidadosamente la formulación con el(los) agente(s) crioprotector(es) o lioprotector(es) adecuados, y agentes estabilizantes, que estabilicen los conjugados de interferón alfa pegilados para prevenir la despegilación durante el proceso de liofilización- un fenómeno comúnmente asociado con el producto de PEG-interferón alfa. Es más, además de agentes crioprotectores y agentes estabilizantes la formulación liofilizada contiene también incrementadores de volumen que aumentan la cantidad de material sólido en el vial.

Una forma específica en la que se ha resuelto el problema de la inestabilidad del enlace uretano del residuo de His 34 en el caso del PEG-interferón alfa 2b es utilizando una formulación que se ha descrito en U.S. Pat. 6,180,096, donde los conjugados de PEG-IFN alfa 2b se liofilizan en presencia de tampón, agentes crioprotectores, un agente estabilizante y un disolvente en cuya formulación contiene un disacárido sacarosa, como agente crioprotector, junto con fosfato sódico monobásico dihidrato y fosfato sódico dibásico anhidro, como tampón, con polisorbato 80 como agente estabilizante, y agua como disolvente. Mientras la formulación de arriba es comercialmente satisfactoria en el tratamiento de la Hepatitis C, está sin embargo asociada con varios problemas, algunos de los cuales se explican detalladamente en otra solicitud de patente, WO2006/020720, por la misma compañía, la cual utiliza ciclos de liofilización más largos que conducen a un elevado coste de fabricación y a un alto contenido de humedad asociado a la formulación comercial, como alguna de las razones para hallar y comunicar una nueva formulación en WO2006/020720. En WO2006/020720, los inventores describen otra formulación liofilizada de PEG-IFN alfa 2b, donde el agente crioprotector comprende al menos un 60% de trehalosa, los componentes tamponadores incluyen fosfato sódico monobásico dihidrato y fosfato sódico dibásico anhidro, y donde la formulación contiene además polisorbato 80 como agente estabilizante y agua como disolvente. La necesidad de formulaciones adicionales para la protección de los conjugados de PEG-IFN alfa 2b no puede estar mejor enfatizada que por el hecho de que los cesionarios de la patente US patent 6,180,096 (formulación comercial), y los solicitantes de WO2006/020720 son la misma compañía, Shering Corporation, la cual está continuando con el desarrollo y descubrimiento de más formulaciones liofilizadas de PEG-IFN alfa 2b.

La necesidad de más formulaciones de PEG-IFN alfa 2b de las que existen se crea con el fin no solamente de proteger al conjugado de PEG-interferón alfa durante el proceso de liofilización, sino también de conseguir un almacenaje a largo plazo a temperatura ambiente cuando el liofilizado se encuentra en el envase adecuado. El proceso de tales formulaciones ha de ser fácil de manejar y ser más efectivo en relación a costo que aquellos que se usan en las formulaciones actuales (basadas en sacarosa). La formulación comercial actual de PEG-IFN alfa 2b, la cual esta fundamentada en la sacarosa (como se describe en la patente US patent 6,180,096), tiene un ciclo de liofilización un poco largo de casi 5 días. La formulación descrita en la presente invención utiliza un ciclo de liofilización el cual es significativamente más corto en tiempo -aproximadamente alrededor de 24-48 horas- el cual ayudará a reducir el coste de fabricación de este medicamento.

La presente invención proporciona nuevas formulaciones liofilizadas y estabilizadas de conjugados de PEG-interferón alfa y el proceso para su preparación.

#### **Realizaciones de la invención.**

El objetivo principal de la invención es el de proporcionar nuevas formulaciones liofilizadas y estabilizadas de conjugados de PEG-interferón alfa.

En una realización de la invención se facilita un proceso para la preparación de las nuevas formulaciones de conjugados de PEG-interferón alfa.

#### **Descripción de la invención.**

La presente invención se refiere a nuevas formulaciones liofilizadas y estabilizadas de conjugados de PEG-interferón alfa y el(los) proceso(s) para su preparación. Las formulaciones comprenden la formulación de los conjugados de PEG-Interferón alfa con el(los) tampón(es) adecuado(s), agente(s) crioprotector(es) adecuado(s), agente estabilizante(es) adecuado(s) y un disolvente, opcionalmente con otros excipientes adecuados, los cuales son liofilizados con posterioridad.

Se apreciará que la presente invención no está limitada por las concentraciones de los componentes en las nuevas formulaciones como se describe en la especificación.

Los conjugados de PEG-Interferón alfa conforme a la presente invención son moléculas de Interferón alfa y sus variantes unidas covalentemente a una o más molécula/s de PEG. Los conjugados de PEG-Interferón alfa de la presente invención pueden abarcar el interferón alfa 2a, el interferón alfa 2b o el interferón alfa 2c y sus variantes adecuadas. Preferiblemente, el conjugado de PEG-Interferón alfa es Interferón alfa 2b monopegilado.

Los polímeros son moléculas que comprenden unidades químicas que se repiten, unidas por enlace covalente. A menudo, el peso molecular aproximado del polímero se designa con un número seguido del nombre de la unidad química repetida. Por ejemplo, "PEG<sub>12000</sub>" o "Polietilenglicol (12000)" se refiere a un polímero de polietilenglicol que tenga una media de peso molecular de aproximadamente 12.000 daltons.

La conjugación de los polímeros a las proteínas podría dar lugar a única molécula de polímero conjugada a una proteína o a dichas conjugaciones múltiples para una única proteína. El grado de conjugación depende de las condiciones de reacción y del resultado deseado. En la realización de preferencia, el conjugado de PEG-Interferón alfa en las formulaciones de la presente invención consta de un único Interferón alfa 2b conjugado a una única molécula de PEG. En una realización preferida concreta, el conjugado de PEG-Interferón alfa en las formulaciones de la presente invención consiste en un único Interferón alfa 2b conjugado a una única molécula de PEG<sub>12000</sub>. En una realización preferida particular, la molécula de Interferón alfa 2b está ligada a la molécula de PEG<sub>12000</sub> mediante un enlace uretano. Se conocen en la técnica algunos procesos de preparación de conjugados de PEG-IFN y tales procesos y los productos derivados de dichos procesos se consideran estar comprendidos dentro del alcance de la presente invención. Se pueden encontrar ejemplos de dicho(s) proceso(s) para la producción de este conjugado polímero-proteína en U.S. Pat. No. 5612460 (Zalipsky) and U.S. Pat. No. 5711944 (Gilbert et al). Sin limitar el campo de la presente invención, la concentración preferida de conjugado PEG-Interferón alfa es de 0,03 a 2,0 mg de Interferón por mililitro.

Cuando se une una única molécula de interferón alfa con una única molécula de PEG-12000 el conjugado resultante de PEG-Interferón alfa podría estar en forma de un único isómero o en una mezcla de isómeros posicionales. En la realización de la presente invención una de estas mezclas de isómeros posicionales podría significar que el conjugado de PEG-Interferón alfa está unido a través del residuo de histidina de la molécula de interferón alfa, mientras que el otro conjugado de PEG-interferón alfa se encontraría unido a través de otro sitio de la molécula de interferón, por ejemplo el residuo de lisina.

Se podría usar la liofilización con el fin de conservar el conjugado de PEG-interferón alfa en la forma más estable. La liofilización es un proceso de secado por congelación de una composición donde se trata una mezcla acuosa con el fin de eliminar el agua. Comúnmente, el proceso implica la sublimación del agua de las soluciones acuosas, por regla general bajo condiciones de presión reducida. Tras la liofilización, el(los) conjugado(s) de PEG-Interferón alfa se pueden guardar durante largos periodos de tiempo.

No obstante, los conjugados de PEG-Interferón alfa están sometidos a deterioro durante y después de la liofilización (US 6,180,096). Por lo tanto, existe la necesidad de formular unos conjugados de PEG-Interferón alfa adecuados así como de protegerlos de la degradación durante y después de la liofilización. Es más, sería útil también si estas formulaciones proporcionan solidez física a la formulación.

La presente invención protege los conjugados de PEG-Interferón alfa del daño incluyéndolos en formulaciones que previenen del daño durante y tras la liofilización. Mientras la presente invención no se limita a una formulación en particular, las formulaciones que se anticipan aquí utilizan tampón(es) adecuado(s), agentes estabilizante(s) adecuado(s), crioprotector(es) y lioprotector(es) adecuados, agente(s) de volumen y disolvente(s) adecuados, solos o en la combinación adecuada, opcionalmente con otros excipientes adecuados, además del conjugado de PEG-Interferón alfa. Con el fin de preparar las nuevas formulaciones de la presente invención, se pueden usar varias combinaciones posibles de los grupos seleccionados de tampones, agentes estabilizantes y crioprotectores como se describe más adelante.

Los tampones son convenientes para el mantenimiento del pH de la formulación. El sistema tamponador que se puede usar consta de fosfato sódico, succinato sódico, succinato potásico, cloruro de histidina, glicinato sódico y además, ya sean solos o en combinación adecuada, el cual suministra el intervalo de pH adecuado. El intervalo de pH preferido está entre 4,5 y 7,1, preferiblemente de 6,5 a 7,1 y más preferiblemente 6,8. Se prefiere el uso de un sistema tamponador de succinato sódico. La concentración molar preferida está en el intervalo desde 0,001 a 0,5 molar. Se podrían usar otros sistemas tamponadores para mantener el pH adecuado.

El término "crioprotectores" generalmente incluye agentes que proporcionan estabilidad a la proteína en el estrés inducido por congelación; sin embargo, el término también incluye agentes que suministran estabilidad, p. ej. a las formulaciones del fármaco a granel durante el almacenamiento del estrés inducido por la no-congelación. De modo ilustrativo, los agentes crioprotectores incluyen polioles, e incluyen sacáridos como sacarosa, lactosa, trehalosa, y manitol, además de incluir surfactantes como el polisorbato, o polietilenglicol y demás. El término "crioprotector" incluye agentes que proporcionan estabilidad a la proteína durante la extracción de agua en el sistema durante el

proceso de secado, presumiblemente manteniendo la conformación apropiada de la proteína a través de enlaces de hidrógeno. Los agentes crioprotectores pueden tener también efectos lioprotectores; por lo tanto, los términos "crioprotector" y "lioprotector" se usan aquí de modo intercambiable.

5 Un agente estabilizante es útil en la prevención de la adsorción del conjugado de PEG-Interferón alfa al vidrio y a las superficies de acero inoxidable de los equipamientos del proceso que se usan para fabricar y guardar la formulación. Se podrían usar como agentes adecuados de estabilización el dodecilsulfato sódico (SDS), polisorbatos (p. ej., Polisorbato 20, 40 o 80, ya sea solo o en combinación). Los ejemplos han de ser de la clase de los derivados de poli(oxi-1,2-etanodiol). Uno de estos agentes estabilizantes preferidos es el Polietileno 20 Sorbitan Mono-oleato, Polisorbato 80 (Tween 80) y a una concentración preferida de 0,01 hasta 1 mg/ml.

10 La presente invención no está limitada solamente a un agente crioprotector específico o a una cantidad específica. El agente crioprotector se podría usar solo o en combinaciones adecuadas. En otra realización, los agentes crioprotectores están presentes en una cantidad desde el 0,05% hasta el 90%, preferiblemente entre 0,05-50% y más preferiblemente en una cantidad de 0,15-20%, basado en el peso total de la solución de PEG-Interferón alfa. En un ejemplo específico, cuando se usa lactosa como agente crioprotector, la concentración preferida es de 10-10  
15 mg/ml.

El disolvente adecuado para la presente formulación es el agua, preferiblemente el disolvente puede ser agua de inyección.

Se podrían añadir excepcionalmente a la formulación otros excipientes adecuados. Dichos excipientes incluyen glicina a una concentración adecuada con el fin de promover la estabilización de la formulación.

20 Las nuevas formulaciones de los conjugados de PEG-Interferón alfa se preparan usando combinaciones adecuadas de tampón, agente estabilizante, agente(s) crioprotector(es) y/o lioprotector(es), opcionalmente con otros excipientes y apropiadamente liofilizados y almacenados como un polvo seco para ser reconstituido antes de su uso.

25 Las formulaciones así preparadas, contienen una cantidad efectiva de conjugados de PEG-Interferón alfa biológicamente activos y útiles en el tratamiento de varias enfermedades como la Hepatitis B y C y cáncer, etc. Se usan preferiblemente como soluciones acuosas inyectables.

30 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención ilustran los siguientes ejemplos no-limitantes y el medio de llevar a cabo la invención con el fin de obtener una dosificación farmacéutica estable de los conjugados de PEG-Interferón alfa. Se apreciará que los Ejemplos sean ilustrativos y cualquier otra modificación/adiciones etc. como que estén dentro del alcance de las personas expertas en la técnica y estén destinados a ser comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

### Ejemplos

35 Se prepararon varias formulaciones de proteína PEG-Interferón alfa-2b disuelta en tampón succinato sódico en presencia de lactosa, bajo distintas condiciones experimentales, para su liofilización en viales de vidrio con el fin de obtener una proteína conjugada estable de PEG-Interferón alfa-2b en su composición. Tras la liofilización, se guardaron las muestras a 5 °C ( $\pm 3$  °C) y se reconstituyeron con agua a distintos periodos de tiempo para su análisis. Las muestras reconstituidas se analizaron para determinar claridad visual, contenido proteico, actividad antiviral y nivel de interferón libre. En el ensayo antiviral, el conjugado fresco, no-formulado y purificado de PEG-Interferón alfa presenta una actividad específica en el intervalo de  $0,2 \times 10^8$  hasta  $0,8 \times 10^8$  UI por miligramo de proteína de interferón.

#### 40 Ejemplo 1

Se disolvió el conjugado de PEG-Interferón alfa preparado según técnicas conocidas en la materia en un medio acuoso que contenía tampón succinato sódico 10 mM a pH 6,8, lactosa (18 mg/ml), y polisorbato 80 (0,1 mg/ml), como se resume en la Tabla 1.

Tabla 1

Componentes de la formulación del conjugado de PEG-Interferón alfa sometido a liofilización	
Componentes	Concentraciones
PEG <sub>12000</sub> -interferón alfa-2b	0,178 mg/ml*
Succinato sódico, pH 6,8	10 mM
Lactosa	18 mg/ml
Polisorbato 80	0,1 mg/ml
Agua purificada	0,7 ml

\*Basado en peso de proteína

- 5 La liofilización se llevó a cabo mediante la colocación de la solución arriba especificada en envases de vidrio seguido de la carga de los envases de vidrio en un liofilizador a presión ambiental y a una temperatura entre 10 °C y 30 °C. Las muestras se congelaron gradualmente de manera controlada y a temperatura entre -40 °C y -50 °C durante un periodo de 3 a 12 hrs. Después, las muestras se sometieron a un primer secado de manera escalonada durante al menos 16 hrs a diferentes temperaturas que van desde -45 °C hasta 0 °C, mientras se mantiene una presión de vacío de 500 mTorr a 50 mTorr. Después de los primeros ciclos de secado, se llevaron a cabo segundos ciclos de secado durante al menos 6 hrs, bajo vacío a una presión entre 20 y 30 mTorr. Tras la finalización de los ciclos de liofilización, se descargaron los envases de vidrio que contenían las pastas liofilizadas a temperatura y presión ambientales.
- 10 Después de la liofilización, se recogieron los viales que contenían pasta sin defectos (como pastas colapsadas o pastas con tapa o pastas contraídas o pastas derretidas de nuevo) y se guardaron a 5 ( $\pm 3$ ) °C, hasta su posterior uso para el análisis. Las muestras se reconstituyeron con agua para el análisis a distintos periodos de tiempo, como se especifica en la Tabla 2. Las soluciones reconstituidas se chequearon para determinar claridad visual. La estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa en la formulación liofilizada se evaluó mediante comparación del contenido proteico, la actividad antiviral, y el nivel de interferón libre (grado de depegilación) presentes en la solución antes y después de la liofilización (Tabla 2).
- 15

Tabla 2

Estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa formulado tras liofilización							
Tiempo (meses)	Temp. ( $\pm 3$ °C)	Contenido proteico		Potencia (UI/mg)	% Humedad	% IFN libre	Claridad Visual
		( $\mu$ g/vial)	% inicial				
Inicial		125,13	100,1	$0,48 \times 10^8$	1,4	0,63	SC
3	5	nd	nd	$0,43 \times 10^8$	2,5	1,98	SC
6		nd	nd	$0,3 \times 10^8$	nd	2,34	SC
9		119,25	95,4	$0,56 \times 10^8$	nd	2,54	SC

nd- no determinado; SC, solución clara

Ejemplo 2

- 20 El conjugado de PEG-Interferón alfa se disolvió en medio acuoso que contenía tampón succinato sódico 10 mM de pH 6,8, lactosa (100 mg/ml) y polisorbato 80 (0,1 mg/ml), como se resume en la Tabla 3.

Tabla 3

Componentes de la formulación del conjugado de PEG-Interferón alfa sometido a liofilización	
Componentes	Concentraciones
PEG <sub>12000</sub> -interferón alfa-2b	0,178 mg/ml*
Succinato sódico, pH 6,8	10 mM
Lactosa	100 mg/ml
Polisorbato 80	0,1 mg/ml
Agua purificada	0,7 ml

\*Basado en peso de proteína

- 25 La liofilización se llevó a cabo mediante la colocación de las soluciones arriba especificadas en envases de vidrio en un liofilizador a presión ambiental y a temperatura entre 10 °C y 30 °C. Las muestras se congelan gradualmente de forma controlada a presión ambiental y a temperatura entre -40 °C y -55 °C durante un periodo de 3 a 12 hrs.
- Después, las muestras congeladas se someten a primeros ciclos de secado a una temperatura entre -35 °C y -45 °C mientras se mantiene una presión de vacío de 500 mTorr a 50 mTorr. Después de los primeros ciclos de secado, se llevaron a cabo segundos ciclos de secado durante al menos 6 hrs, bajo vacío a una presión entre 20 y 30 mTorr. Tras la finalización de los ciclos de liofilización, se descargaron los envases de vidrio que contenían las pastas liofilizadas a temperatura y presión ambientales.
- 30 Tras la liofilización, se recogieron los viales que contenían pasta sin defectos y se guardaron a 5 ( $\pm 3$ ) °C, hasta su uso para el análisis posterior. Las muestras se reconstituyeron con agua para el análisis a distintos periodos de tiempo, como se especifica en la Tabla 4. Las soluciones reconstituidas se chequearon para determinar claridad visual. La estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa en la formulación liofilizada se evaluó mediante comparación del contenido proteico, la actividad antiviral, y el nivel de interferón libre (grado de depegilación) presentes en la solución antes y después de la liofilización como se muestra en la Tabla 4.
- 35

Tabla 4

Estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa formulado tras liofilización							
Tiempo (meses)	Temp. ( $\pm 3$ °C)	Contenido proteico		Potencia (UI/mg)	% Humedad	% IFN libre	Claridad Visual
		( $\mu$ g/vial)	% inicial				
Inicial		123,2	98,6	$0,58 \times 10^8$	0,25	0,84	SC
1		119	95,4	$0,35 \times 10^8$	nd	0,69	SC
3	5	116	93	$0,72 \times 10^8$	nd	0,79	SC

nd- no determinado; SC, solución clara

## Ejemplo 3

5 El conjugado de PEG-Interferón alfa se disolvió a 0,2 mg/ml en medio acuoso que contenía tampón succinato sódico 10 mM de pH 6,8, una mezcla de agentes crioprotectores que comprendía lactosa (57,1 mg/ml) y trehalosa (31,4 mg/ml), y polisorbato 80 (0,1 mg/ml), como se resume en la Tabla 5.

Tabla 5

Componentes de la formulación del conjugado de PEG-Interferón alfa sometido a liofilización	
Componentes	Concentraciones
PEG <sub>12000</sub> -interferón alfa-2b	0,178 mg/ml*
Succinato sódico, pH 6,8	10 mM
Lactosa	57,1 mg/ml
Trehalosa	31,4 mg/ml
Polisorbato 80	0,1 mg/ml
Agua purificada	0,7 ml

\*Basado en peso de proteína

10 La liofilización se llevó a cabo mediante la colocación de las soluciones arriba especificadas en envases de vidrio en un liofilizador a presión ambiental y a temperatura entre 10 °C y 30 °C. Las muestras se congelan gradualmente de forma controlada a presión ambiental y a temperatura entre -40 °C y -55 °C durante un periodo de 3 a 12 hrs. Después, las muestras congeladas se someten a primeros ciclos de secado a una temperatura entre -35 °C y -45 °C mientras se mantiene una presión de vacío de 500 mTorr a 50 mTorr. Después de los primeros ciclos de secado, se llevaron a cabo segundos ciclos de secado durante al menos 6 hrs, bajo vacío a una presión entre 20 y 30 mTorr. Tras la finalización de los ciclos de liofilización, los envases de vidrio que contenían las pastas liofilizadas se descargaron a temperatura y presión ambientales.

15 Tras la liofilización, se recogieron los viales que contenían pasta sin defectos y se guardaron a 5 ( $\pm 3$ ) °C, hasta su uso para el posterior análisis. Las muestras se reconstituyeron con agua de análisis a distintos periodos de tiempo, como se especifica en la Tabla 6. Las soluciones reconstituidas se chequearon para determinar su claridad visual. La estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa en la formulación liofilizada se evaluó mediante comparación del contenido proteico, la actividad antiviral, y el nivel de interferón libre (grado de depegilación) presentes en la solución antes y después de la liofilización como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa formulado tras liofilización							
Tiempo (meses)	Temp. ( $\pm 3$ °C)	Contenido proteico		Potencia (UI/mg)	% Humedad	% IFN libre	Claridad Visual
		( $\mu$ g/vial)	% inicial				
Inicial		123,2	98,56	$0,72 \times 10^8$	0,23	0,91	SC
1		115,18	92,2	$0,5 \times 10^8$	nd	0,78	SC
3	5	118,7	95	$0,51 \times 10^8$	nd	0,92	SC

nd- no determinado; SC, solución clara

## Ejemplo 4

El conjugado de PEG-Interferón alfa se disolvió en medio acuoso que contenía tampón succinato sódico 10 mM de pH 6,8, lactosa (40 mg/ml), trehalosa (16 mg/ml), glicina (1,05 mg/ml) y polisorbato 80 (0,1 mg/ml), como se resume

en la Tabla 7.

Tabla 7

Componentes de la formulación del conjugado de PEG-Interferón alfa sometido a liofilización	
Componentes	Concentraciones
PEG <sub>12000</sub> -interferón alfa-2b	0,178 mg/ml*
Succinato sódico, pH 6,8	10 mM
Lactosa	40 mg/ml
Trehalosa	16 mg/ml
Glicina	1,05 mg/ml
Polisorbato 80	0,1 mg/ml
Agua purificada	0,7 ml

\*Basado en peso de proteína

5 Se llevó a cabo la liofilización mediante la colocación en un liofilizador de las soluciones arriba especificadas en envases de vidrio a presión ambiental y a temperatura entre 10 °C y 30 °C. Las muestras se congelan gradualmente de forma controlada a presión ambiental y a temperatura entre -40 °C y -55 °C durante un periodo de 3 a 12 hrs. Después, las muestras congeladas se someten a primeros ciclos de secado a una temperatura entre -35 °C y -45 °C mientras se mantiene una presión de vacío de 500 mTorr a 50 mTorr. Después de los primeros ciclos de secado, se llevaron a cabo segundos ciclos de secado durante al menos 6 hrs, bajo vacío a una presión entre 20 y 30 mTorr. Tras la finalización de los ciclos de liofilización, los envases de vidrio que contenían las pastas liofilizadas se descargaron a temperatura y presión ambientales.

15 Tras la liofilización, se recogieron los viales que contenían pasta sin defectos y se guardaron a 5 ( $\pm$  3) °C, hasta su uso para el posterior análisis. Las muestras se reconstituyeron con agua de análisis a distintos periodos de tiempo, como se especifica en la Tabla 8. Las soluciones reconstituidas se chequearon para determinar su claridad visual. Se evaluó la estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa en la formulación liofilizada mediante comparación del contenido proteico, la actividad antiviral, y el nivel de interferón libre (grado de depegilación) presentes en la solución antes y después de la liofilización como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

Estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa formulado tras liofilización							
Tiempo (meses)	Temp. ( $\pm$ 3 °C)	Contenido proteico		Potencia (UI/mg)	% Humedad	% IFN libre	Claridad Visual
		( $\mu$ g/vial)	% inicial				
Inicial		124,2	99,4	0,48x10 <sup>8</sup>	1,96	0,84	SC
3		nd	nd	0,26x10 <sup>8</sup>	2,43	1,61	SC
6	5	nd	nd	0,45x10 <sup>8</sup>	nd	1,87	SC
9		122,2	97,8	0,85x10 <sup>8</sup>	2,33	2,20	SC

nd- no determinado; SC, solución clara

#### Ejemplo 5

20 El conjugado de PEG-Interferón alfa, a 0,2 mg/ml, se disolvió en medio acuoso que contenía tampón succinato sódico 10 mM de pH 6,8, lactosa (57,1 mg/ml), trehalosa (22,8 mg/ml) y polisorbato 80 (0,1 mg/ml), y adicionalmente con glicina (1,05 mg/ml) como se resume en la Tabla 9.

Tabla 9

Componentes de la formulación del conjugado de PEG-Interferón alfa sometido a liofilización	
Componentes	Concentraciones
PEG <sub>12000</sub> -interferón alfa-2b	0,143 mg/ml*
Succinato sódico, pH 6,8	10 mM
Lactosa	57,1 mg/ml
Trehalosa	22,8 mg/ml
Glicina	1,05 mg/ml
Polisorbato 80	0,1 mg/ml
Agua purificada	0,7 ml

\*Basado en peso de proteína

- 5 Se llevó a cabo la liofilización mediante la colocación en un liofilizador de las soluciones arriba especificadas en envases de vidrio a presión ambiental y a una temperatura entre 10 °C y 30 °C. Las muestras se congelan gradualmente de forma controlada a presión ambiental y a temperatura entre -40 °C y -55 °C durante un periodo de 3 a 12 hrs. Después, las muestras congeladas se someten a primeros ciclos de secado a una temperatura entre -35 °C y -45 °C mientras se mantiene una presión de vacío de 500 mTorr a 50 mTorr. Después de los primeros ciclos de secado, se llevaron a cabo segundos ciclos de secado durante al menos 6 hrs, bajo vacío a una presión entre 20 y 30 mTorr. Tras la finalización de los ciclos de liofilización, los envases de vidrio que contenían las pastas liofilizadas se descargaron a temperatura y presión ambientales.
- 10 Tras la liofilización, se recogieron los viales que contenían pasta sin defectos y se guardaron a 5 ( $\pm$  3) °C, hasta su uso para el posterior análisis. Las muestras se reconstituyeron con agua de análisis a distintos periodos de tiempo, como se especifica en la Tabla 10. Las soluciones reconstituidas se chequearon para determinar su claridad visual. Se evaluó la estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa en la formulación liofilizada mediante comparación del contenido proteico, la actividad antiviral, y el nivel de interferón libre (grado de depegilación) presentes en la solución antes y después de la liofilización como se muestra en la Tabla 10.
- 15

Tabla 10

Estabilidad del conjugado de PEG-Interferón alfa formulado tras liofilización							
Tiempo (meses)	Temp. ( $\pm$ 3 °C)	Contenido proteico		Potencia (UI/mg)	% Humedad	% IFN libre	Claridad Visual
		( $\mu$ g/vial)	% inicial				
Inicial		100,7	100,7	0,48x10 <sup>8</sup>	1,16	3,23	SC
3		nd	nd	0,24x10 <sup>8</sup>	nd	2,28	SC
6	5	94,3	94,3	0,38x10 <sup>8</sup>	nd	3,20	SC

nd- no determinado; SC, solución clara

El IFN libre arriba indicado se determinó mediante análisis HP-SEC de todas las muestras.

Las nuevas formulaciones de los conjugados liofilizados y estabilizados de PEG-Interferón alfa descritos en la presente invención poseen las siguientes ventajas.

- 20
1. Suponen una simplicidad operacional.
  2. Implican el uso de agentes crioprotectores y/o lioprotectores, los cuales son menos higroscópicos en la naturaleza.
  3. Proporcionan una mejor solidez física a la formulación liofilizada.
  4. Todos los factores arriba descritos contribuyen a la rentabilidad del proceso de esta invención.
- 25

**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Una formulación que comprende conjugados de PEG-Interferón alfa, un tampón, un agente estabilizante, un agente crioprotector y un disolvente, en la que dicho tampón se selecciona a partir de fosfato sódico, succinato sódico, succinato potásico, cloruro de histidina, glicinato sódico ya sea solo o en combinación, y en el que el agente crioprotector es lactosa.
- 2.** Una formulación como se reivindica en la reivindicación 1, donde el agente estabilizante se selecciona a partir de dodecilsulfato sódico, o polisorbatos adecuados..
- 3.** Una formulación como se reivindica en las reivindicaciones 1 y 2, donde el polisorbato se selecciona a partir de Polisorbato 20, 40 o 80.
- 10 **4.** La formulación como se reivindica en las reivindicaciones del 1 al 3, donde el agente crioprotector comprende además trehalosa.
- 5.** La formulación como se reivindica en las reivindicaciones precedentes, donde la concentración de dichos conjugados de PEG-Interferón alfa es de 0,03 a 2,0 mg de interferón por mililitro.
- 15 **6.** La formulación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho tampón es succinato sódico.
- 7.** La formulación como se reivindica en la reivindicación 6, donde la concentración del tampón succinato sódico está en el intervalo de 0,001 a 0,5 molar.
- 8.** La formulación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el intervalo de pH de dicha formulación está en el intervalo de 4,0 a 6,8.
- 20 **9.** La formulación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, dicho agente estabilizante está presente en una concentración de 0,01 a 1,0 mg/ml.
- 10.** La formulación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la concentración del agente crioprotector está entre 10-100 mg/ml.
- 25 **11.** La formulación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho disolvente es el agua.
- 12.** La formulación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición comprende además glicina.
- 13.** La formulación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dichos conjugados de PEG-Interferón alfa comprenden predominantemente moléculas individuales de PEG conjugadas con moléculas individuales de interferón alfa.
- 30 **14.** La formulación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dichas moléculas de interferón alfa se seleccionan del grupo que consiste en interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-2c y sus variantes apropiadas.
- 35 **15.** La formulación como se reivindica en la reivindicación 14 precedentes, donde dichas moléculas de interferón alfa son interferón alfa-2b.
- 16.** Un proceso de liofilización de la formulación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para obtener un polvo liofilizado.
- 17.** Una formulación liofilizada preparada de acuerdo con el proceso de la reivindicación 16.
- 18.** La formulación de la reivindicación 17 donde el polvo liofilizado se reconstituye con agua.