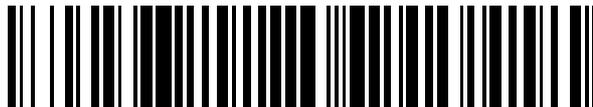


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 623**

51 Int. Cl.:

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2001 E 10180658 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2283897**

54 Título: **Formulaciones de interferón-beta exentas de HSA**

30 Prioridad:

09.04.2001 US 282614 P

18.10.2001 US 330404 P

25.10.2001 US 35397

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

08.04.2014

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
(100.0%)
4560 Horton Street
Emeryville, CA 94608, US**

72 Inventor/es:

**SHIRLEY, BRET;
CHOE, MINNA;
TELLERS, MELANIE y
BABUKA, SUSAN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 453 623 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de interferón-beta exentas de HSA

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere, de forma general, a composiciones farmacéuticas, más particularmente a formulaciones estabilizadas de interferón- β que están exentas de seroalbúmina humana como un excipiente farmacéutico añadido.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Los interferones son una familia de glucoproteínas cuya secreción desde las células está inducida por varias señales que incluyen virus, ARN bicatenarios, otros polinucleótidos, antígenos y mitógenos. Los interferones muestran múltiples actividades biológicas, que incluyen actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. Basándose en varios factores, que incluyen actividades antivirales y antiproliferativas, se han diferenciado al menos tres tipos distintos de interferones humanos, α , β y γ .

20 El interferón- β (IFN- β) es el primer tratamiento eficaz identificado para los que tienen esclerosis múltiple (EM) y se ha demostrado que reduce el número de ataques padecidos por los pacientes con EM recidivante y en remisión y EM progresiva secundaria. Las composiciones de IFN- β también son útiles en el tratamiento de infecciones por hepatitis B y C.

25 Al igual que con todos los productos farmacéuticos basados en proteínas, un obstáculo importante que debe superarse con el uso de IFN- β como un agente terapéutico, es la pérdida de utilidad farmacéutica que puede producirse debido a su inestabilidad en formulaciones farmacéuticas. Las inestabilidades físicas que ponen en peligro 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 imida, oxidación, racemización y desamidación. Se sabe que algunos de estos cambios conducen a la pérdida o a la reducción de la actividad farmacéutica de la proteína de interés. En otros casos, se desconocen los efectos exactos de esos cambios, pero todavía se considera que los productos de degradación resultantes son farmacéuticamente inaceptables debido a los posibles efectos secundarios no deseables.

30 La estabilización de polipéptidos en composiciones farmacéuticas sigue siendo un área en el que el ensayo y error desempeña un papel principal (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 formulaciones farmacéuticas de polipéptidos para aumentar su estabilidad incluyen tampones, azúcares, tensioactivos, aminoácidos, polietilenglicoles y polímeros, pero los efectos estabilizantes de estos aditivos químicos varían dependiendo de la proteína.

35 Uno de los obstáculos principales para preparar formulaciones farmacéuticas de IFN- β estabilizadas ha sido la mala solubilidad de la molécula de IFN- β . Las formulaciones actuales emplean el uso de HSA como un agente potenciador de la solubilidad para IFN- β . Sin embargo, el uso de HSA tiene inconvenientes. El HSA es un producto de la sangre humana y, por lo tanto, se tiene que recoger de sujetos humanos. Aunque se han adoptado etapas para reducir el riesgo, el uso de productos de sangre humana, tales como HSA, conlleva la posible introducción de virus humanos tales como VIH y VHC. La introducción de HSA en la formulación también interfiere con la capacidad de determinar apropiadamente la estabilidad de IFN- β en la formulación. Esto se debe a que tanto la HSA como el IFN- β son proteínas y la HSA interfiere con algunos de los ensayos indicadores de estabilidad de IFN- β .

40 Se han descrito algunas formulaciones de IFN- β exentas de HSA, por ejemplo, algunas realizaciones de los documentos US- 5004605 y WO 99/15193.

45 Además, el IFN- β es una proteína que muestra formación de agregados cuando se prepara en composiciones farmacéuticas y, por tanto, la cantidad de esta proteína en su estado biológicamente activo monómero está comprometida durante el almacenamiento de estas composiciones. La formación de agregados por un polipéptido tal como IFN- β durante el almacenamiento de una composición farmacéutica puede afectar de manera adversa a la actividad biológica de ese polipéptido, dando como resultado la pérdida de la eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede causar otros problemas, tal como el bloqueo de conductos, membranas o bombas cuando la composición farmacéutica de IFN- β se administra usando un sistema de infusión. Además, la inyección de una composición farmacéutica que comprende la forma agregada de una proteína tiene la posibilidad de generar una reacción inmunógena a la proteína agregada.

50 Por consiguiente, existe la necesidad de composiciones farmacéuticas de IFN- β adicionales que comprendan estabilizantes fisiológicamente compatibles que mejoren la solubilidad de esta proteína y estabilicen la proteína frente a la formación de agregados, aumentando de este modo su utilidad farmacéutica.

65

Resumen de la invención

Se proporcionan composiciones que comprenden interferón-beta (IFN-β) como un componente terapéuticamente activo y procedimientos útiles en su preparación. Las composiciones son composiciones farmacéuticas estabilizadas que están exentas de seroalbúmina humana (HSA) como un excipiente farmacéutico y que comprenden IFN-β sustancialmente monomérico solubilizado en una formulación de fuerza iónica baja. La formulación de fuerza iónica baja es una solución que comprende un tapón en una cantidad suficiente para mantener la composición a un pH especificado más o menos 0,5 unidades, en el que el pH especificado es de 3,0 a 5,0 y que tiene una fuerza iónica de no más de aproximadamente 20 mM. En las composiciones farmacéuticas se incorpora un agente tonificante no iónico para hacer las composiciones isotónicas, en las que el agente tonificante es manitol a una concentración del 4% al 6% de peso por volumen. También se proporcionan métodos para aumentar la solubilidad de IFN-β en composiciones farmacéuticas y para aumentar la cantidad de IFN-β monómero en estas composiciones sin el uso de seroalbúmina humana.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la solubilidad de IFN-b-1b en soluciones de cloruro sódico.

La Figura 2 muestra la solubilidad de IFN-b-1b en formulaciones de fuerza iónica baja.

La Figura 3 muestra el efecto de pH 3,0 sobre el estado de agregación de IFN-b-1b.

La Figura 4 muestra el efecto de pH 4,0 sobre el estado de agregación de IFN-b-1b.

La Figura 5 muestra el efecto de pH 5,0 sobre el estado de agregación de IFN-b-1b.

La Figura 6 muestra el efecto de la fuerza iónica (NaCl 0 mM) sobre el estado de agregación de IFN-b-1b.

La Figura 7 muestra el efecto de la fuerza iónica (NaCl 50 mM) sobre el estado de agregación de IFN-b-1b.

La Figura 8 muestra el efecto de la fuerza iónica (NaCl 150 mM) sobre el estado de agregación de IFN-b-1b.

La Figura 9 muestra el estado de agregación de IFN-b-1b en una formulación de pH 3,0 que contiene solamente el agente de tamponamiento glicina 5 mM.

La Figura 10 muestra el efecto de un agente tonificante no iónico (sacarosa al 9%) sobre el estado de agregación de IFN-b-1b en la formulación mostrado en la Figura 9.

La Figura 11 muestra el efecto de un agente tonificante no iónico (trehalosa al 9%) sobre el estado de agregación de IFN-b-1b en la formulación mostrado en la Figura 9.

La Figura 12 muestra el porcentaje de la fuerza de IFN-b-1b inicial en formulaciones liofilizadas que contienen trehalosa al 9% o sacarosa al 9% después de 8 semanas de almacenamiento a 40 °C. La fuerza se determinó mediante absorción UV.

La Figura 13 muestra el porcentaje del pico principal de IFN-b-1b en formulaciones liofilizadas que contienen trehalosa al 9% o sacarosa al 9% después de 8 semanas de almacenamiento a 40 °C. El porcentaje del pico principal se determinó mediante análisis de RP-HPLC.

La Figura 14 muestra el porcentaje de la fuerza de IFN-b-1b inicial en formulaciones liofilizadas que contienen trehalosa al 9% después de 9 meses de almacenamiento a 5 °C o 30 °C. La fuerza se determinó mediante espectroscopia UV.

La Figura 15 muestra el porcentaje del pico principal de IFN-b-1b en formulaciones liofilizadas que contienen trehalosa al 9% después de 9 meses de almacenamiento a 5 °C o 30 °C. El porcentaje del pico principal se determinó mediante análisis de RP-HPLC.

La Figura 16 muestra el porcentaje de la fuerza de IFN-b-1b inicial en formulaciones líquidas que contienen trehalosa al 9% o sacarosa al 9% después de 3 semanas de almacenamiento a 30 °C. La fuerza se determinó mediante absorbancia UV.

La Figura 17 muestra el porcentaje del pico principal de IFN-b-1b en formulaciones líquidas que contienen trehalosa al 9% o sacarosa al 9% después de 8 semanas de almacenamiento a 30 °C. El porcentaje de pico principal se determinó mediante análisis de RP-HPLC.

La Figura 18 muestra el porcentaje de la fuerza de IFN-b-1b inicial en formulaciones líquidas que contienen trehalosa al 9% o sacarosa al 9% después de 9 meses de almacenamiento en viales a 5 °C. La fuerza se determinó mediante espectroscopia UV.

La Figura 19 muestra el porcentaje del pico principal de IFN-b-1b en formulaciones líquidas que contienen trehalosa al 9% o sacarosa al 9% después de 9 meses de almacenamiento en viales a 5 °C. El porcentaje del pico principal se determinó mediante análisis de RP-HPLC.

La Figura 20 muestra el porcentaje de la fuerza de IFN-b-1b inicial en formulaciones líquidas que contienen trehalosa al 9% o sacarosa al 9% después de 9 semanas de almacenamiento a 30 °C. La fuerza se determinó mediante espectroscopia UV.

La Figura 21 muestra el porcentaje de la fuerza de IFN-b-1b inicial en formulaciones liofilizadas que contienen trehalosa al 9% o sacarosa al 9% después de 8 semanas de almacenamiento a 40 °C. La fuerza se determinó mediante espectroscopia UV.

La Figura 22 muestra el porcentaje de la fuerza de IFN-b-1b inicial en formulaciones líquidas que contienen manitol al 5% con 6 meses de almacenamiento a 5 °C. La fuerza se determinó mediante espectroscopia UV.

La Figura 23 muestra el porcentaje del pico principal de IFN-b-1b en formulaciones líquidas que contienen manitol al 9% con 6 meses de almacenamiento a 5 °C. El porcentaje del pico principal se determinó por RPHPLC.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas estabilizadas que comprenden interferón-beta (IFN-β) y a métodos para su preparación. Estas composiciones se preparan en ausencia de seroalbúmina humana (HSA), y, por tanto, están exentas de este excipiente farmacéutico. Tales composiciones se denominan en el presente documento composiciones farmacéuticas de IFN-β "exentas de HSA". Las composiciones comprenden IFN-β sustancialmente monómero que está solubilizado en una formulación de fuerza iónica baja. Por formulación de "fuerza iónica baja" se entiende una solución que comprende un tampón en una cantidad que es suficiente para mantener el pH de la composición farmacéutica dentro de más o menos 0,5 unidades de un pH especificado y que tiene una fuerza iónica que no es mayor de aproximadamente 20 mM. Por "fuerza iónica" se entiende la definición química convencional aplicada a una solución, donde la fuerza iónica de una solución es igual a $\frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$, en la que c es la fuerza y z es la carga. El tampón está presente en la formulación de fuerza iónica baja a una fuerza de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 20 mM, aún más preferentemente de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 10 mM, todavía más preferentemente de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 5 mM. Por tanto, en algunas realizaciones, la formulación de fuerza iónica baja comprende un tampón en una fuerza de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 7 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 3 mM, aproximadamente 4 mM, o aproximadamente 5 mM. Los tampones adecuados que se pueden usar para preparar la formulación de fuerza iónica baja en la que el IFN-β está solubilizado incluyen, pero sin limitación, glicina, ácido aspártico, succinato de sodio, citrato, formiato, acetato, ácido glutámico, histidina, imidazol y fosfato, preferentemente glicina, ácido aspártico y succinato de sodio, más preferentemente glicina y ácido aspártico.

Preferiblemente, la formulación de baja fuerza iónica tiene una fuerza iónica inferior a 60 mM, más preferentemente inferior a 40 mM, aún más preferentemente inferior a 20 mM. En algunas realizaciones, la fuerza iónica de la formulación se determina únicamente por la concentración tamponada, y por lo tanto, la formulación no tiene especies iónicas adicionales como el cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, sal de amonio y similares, que contribuyen a su fuerza iónica.

El uso de una formulación de fuerza iónica baja, que es una solución que comprende un tampón a una fuerza de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 5 mM, permite la preparación de composiciones farmacéuticas de IFN-β estabilizadas que tienen un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 5,0, preferentemente aproximadamente de 3,0 a aproximadamente 4,5, más preferentemente de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 4,0, todavía más preferentemente de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,0, más preferentemente de aproximadamente 4,0, dependiendo del tampón particular usado. Por tanto, cuando el tampón es glicina, el pH de la composición es de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,5, preferentemente de aproximadamente 3,0. Cuando el tampón es ácido aspártico, el pH de la composición es de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,5, preferentemente de aproximadamente 4,0. Cuando el tampón es succinato de sodio, el pH de la composición es de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,0, preferentemente de aproximadamente 5,0.

Manteniendo el pH de las composiciones farmacéuticas de IFN-β de la invención dentro del intervalo de pH aproximadamente 3,0 a pH aproximadamente 5,0 es posible aumentar la solubilidad de IFN-β en estas composiciones más allá de lo que normalmente es posible en ausencia del uso de seroalbúmina humana. Además, incorporando IFN-β en una formulación de fuerza iónica baja, como se define en el presente documento, es posible preparar composiciones farmacéuticas que comprendan IFN-β sustancialmente monómero. Por "sustancialmente monómero" se entiende que la mayoría de IFN-β (en peso) presenta la composición está en su forma monómera en lugar de en una forma agregada. Por "agregado" se entiende una interacción física entre las moléculas polipeptídicas que da como resultado la formación de multímeros (dímeros, trímeros, etc.) que pueden permanecer solubles o que pueden precipitar fuera de la solución. La forma monómera del polipéptido IFN-β permanece soluble y, por tanto, se dice que está "solubilizada" en la formulación de fuerza iónica baja o composiciones farmacéuticas de la presente invención. El porcentaje (en peso) de IFN-β que está en su forma monómera en las composiciones exentas de HSA de la invención puede variar de 80% o mayor. Por tanto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas de IFN-β, exentas de HSA, que comprenden al menos aproximadamente 80% del IFN-β en su forma monómera, a diferencia de su forma agregada, preferentemente al menos aproximadamente 85%, más preferentemente al menos aproximadamente 90%, todavía más preferentemente al menos aproximadamente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más del IFN-β en su forma monómera.

En la presente invención, las composiciones farmacéuticas de IFN-β sin HSA comprenden, además, un agente tonificante de manitol en una cantidad suficiente para proporcionar composiciones isotónicas concretamente con fluidos corporales. El manitol tiene una concentración que oscila entre el 4 % y el 6 %, preferentemente un 5 % en peso por volumen. El agente tonificante no iónico puede ser una combinación de trehalosa y manitol, o sacarosa y manitol, en la que la trehalosa y la sacarosa están presentes en una concentración del 1 % en peso por volumen y el manitol está presente en una concentración del 4,6 % en peso por volumen.

Las composiciones farmacéuticas de IFN-β sin HSA de la presente invención abarcan las composiciones líquidas y las formas secas de las mismas. Para fines de la presente invención, el término "líquido" con respecto a las

composiciones farmacéuticas o formulaciones pretende incluir el término “acuoso”, e incluye formulaciones líquidas congeladas. Por “forma seca” se pretende que la composición farmacéutica líquida o formulación esté seca, ya sea mediante secado por congelación (es decir; liofilización; véase, por ejemplo, Williams and Polli (1984) *J. Parenteral Sci. Technol.* 38: 48 – 59), secado por pulverización (véase Masters (1991) en *Spray – Drying Handbook* (5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491 – 676; Broadhead *et al.* (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18: 1169 – 1206; y Mumenthaler *et al.* (1994) *Pharm. Res.* 11: 12 – 20), o secado por aire (Carpenter and Crowe (1998) *Cryobiology* 25: 459 – 470; y Roser (1991) *Biopharm.* 4: 47 – 53). El término “liofilizar” con respecto a las formulaciones farmacéuticas de IFN – β se entiende como un secado rápido por congelación en condiciones de presión reducida de una pluralidad de viales, conteniendo cada uno de ellos una dosis unitaria de la formulación de interferón de la presente invención. Los liofilizadores que proporcionan la liofilización descrita anteriormente, están disponibles comercialmente y son fácilmente operables por aquellos expertos en la disciplina. En una realización de la presente invención, la composición líquida se prepara como una composición liofilizada.

En otras realizaciones de la invención, las composiciones farmacéuticas de IFN – β sin HSA de la invención pueden prepararse con una forma adecuada para la preparación de la distribución y administración pulmonar en un sujeto a través de una inhalación pulmonar. Por “inhalación pulmonar” se entiende que la composición farmacéutica sea administrada directamente a los pulmones por la distribución de la composición en un aerosol u otra preparación adecuada a partir de un dispositivo de distribución en la cavidad oral del sujeto mientras el sujeto inhala a través de la cavidad oral. Por “aerosol” se entiende una suspensión de partículas líquidas o sólidas en un flujo de aire o de gas fisiológicamente aceptables. Otras preparaciones adecuadas incluyen, pero no de manera limitante a la niebla, vapor o preparaciones de pulverización siempre que las partículas que comprendan la composición de proteína se distribuyan en un intervalo de tamaño de acuerdo con lo descrito para una forma de polvo seco de la composición farmacéutica tal como se define a continuación. La inhibición pulmonar puede, asimismo, lograrse mediante otros métodos apropiados conocidos por los expertos en la disciplina. Estos pueden incluir instilación de líquidos utilizando un dispositivo adecuado u otros procedimientos. La inhalación pulmonar da como resultado la deposición de una composición proteica inhalada en los alvéolos de los pulmones del sujeto. Una vez deposita, la proteína puede ser absorbida, pasiva o activamente, a través de las capas del epitelio alveolar y del epitelio capilar en el torrente sanguíneo para su posterior distribución sistémica.

La administración pulmonar de un polipéptido o una proteína como el IFN – β , requiere la dispensación de una sustancia biológicamente activa a partir de un dispositivo de distribución en la cavidad oral del sujeto durante la inhalación. Para fines de la presente invención, las composiciones farmacéuticas sin HSA que comprenden IFN – β o variantes de las mismas, se administran a través de un aerosol u otra preparación apropiada obtenida a partir de una forma de suspensión o solución acuosa o no acuosa, o una forma sólida o de polvo seco de una composición farmacéutica, dependiendo del dispositivo de distribución utilizado. Dichos dispositivos de distribución son ya conocidos en la disciplina e incluyen, de manera no limitante, nebulizadores, inhaladores de dosificación de sustancias, inhaladores de polvo seco, o cualquier otro mecanismo de distribución adecuado que permita la dispensación de una composición farmacéutica como una solución o suspensión acuosa o no acuosa, o una forma sólida o de polvo seco. Cuando se utiliza en el contexto de las composiciones farmacéuticas adecuadas para la distribución pulmonar, estos términos tienen el siguiente significado. Por “acuoso” se entiende una composición preparada con, que contiene, o se disuelve en agua, incluyendo mezclas en las que el agua es la sustancia predominante en la mezcla. Una sustancia predominante está presente en una cantidad mayor que otro componente de la mezcla. Por “no acuoso” se entiende una composición preparada con, que contiene, o se disuelve en otra sustancia que no sea agua o mezclas en las que el agua no es la sustancia predominante en la mezcla. Por “solución” se entiende una preparación homogénea de dos o más sustancias que pueden ser sólidos, líquidos, gases o intercombinaciones de las mismas. Por “suspensión” se entiende una mezcla de sustancias como una o más sustancias insolubles que se dispersan homogéneamente en otra sustancia predominante.

Para fines de la presente invención, los términos “sólido” y “polvo seco” se utilizan de manera intercambiable con referencia a las composiciones farmacéuticas sin HSA adecuadas para la distribución pulmonar. Por forma “sólida” o “polvo seco” de una composición farmacéutica se entiende la composición que ha sido secada para tener un polvo dividido en trozos finos, que tiene un contenido de humedad por debajo del 10 % en peso, generalmente por debajo del 5 % en peso, y preferiblemente por debajo del 3 % en peso. Esta forma de polvo seco de la composición consiste en partículas que comprenden IFN – β o variantes de los mismos. Los tamaños de partículas preferentes tienen menos de 10,0 μm de diámetro medio, más preferiblemente menos de 7,0 μm , incluso menos de 6,0 μm , incluso más preferiblemente oscila entre 0,1 y 5,0 μm , más preferiblemente oscila entre 1,0 y 5,0 μm de diámetro medio.

Por lo tanto, una composición farmacéutica líquida sin HSA comprende IFN – β o variantes de los mismos destinados para la distribución celular que puede utilizarse como solución o suspensión líquida en el dispositivo de distribución o puede procesarse primero en una forma de polvo seco utilizando técnicas de liofilización o de secado por pulverización ya conocidas en la disciplina. Cuando se utiliza una suspensión o solución líquida en el dispositivo de distribución, un nebulizador, un inhalador de dosificación de sustancias, u otros dispositivos de distribución adecuados, se distribuye en una única o múltiple dosis fraccionada por inhalación pulmonar de una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición en los pulmones de un sujeto como gotitas que tiene el mismo intervalo de tamaño de partículas indicado anteriormente para la forma de polvo seco. Por “cantidad farmacéuticamente eficaz” se entiende una cantidad que es útil en el tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o

afección sensible al IFN – β . La suspensión o solución líquida de la composición puede utilizarse con agentes estabilizantes fisiológicamente adecuados, excipientes, modificadores de la viscosidad, agentes espesantes, surfactantes o combinaciones de los mismos, conocidos por los expertos en la disciplina, siempre que no comprometan las características distintivas de las composiciones de IFN – β sin HSA de la invención.

5 Cuando se liofiliza la composición farmacéutica líquida anterior para utilizarse en la distribución pulmonar, la composición liofilizada se muele para obtener un polvo seco dividido en trozos finos que consiste en partículas con un intervalo de tamaño deseado indicado anteriormente. Cuando se utiliza el secado por pulverización para obtener una forma de polvo seco de la composición farmacéutica líquida, el método se realiza en condiciones que dan lugar a un polvo seco dividido en trozos finos sustancialmente amorfos que consisten en partículas con un intervalo de tamaño deseado indicado anteriormente. Del mismo modo, si la composición farmacéutica inicial ya tiene una forma liofilizada, la composición puede molerse para obtener la forma de polvo seco para su posterior preparación como un aerosol u otra preparación adecuada para la inhalación pulmonar. Cuando la composición farmacéutica inicial tiene forma de secado por pulverización, la composición ha sido preferiblemente preparada de tal manera que ya tiene una forma de polvo seco que tiene un tamaño apropiado de partículas para la dispensación como una solución o suspensión acuosa o no acuosa, o una forma de polvo seco según la administración pulmonar. Para los procedimientos de preparación de formas de polvo seco de composiciones farmacéuticas, véase, por ejemplo, los documentos WO 96/32149, WO 97/41833, WO 98/29096, y las Patentes de U.S N° 5.976.574, 5.985.248 y 6.001.336.

20 La forma de polvo seco resultante de la composición se coloca entonces en un dispositivo de distribución adecuado para su posterior preparación como un aerosol u otra preparación adecuada que se administra al sujeto a través de la inhalación pulmonar. Cuando la forma de polvo seco de la composición farmacéutica se prepara y se dispensa, se utiliza como una solución o suspensión acuosa o no acuosa, un inhalador de dosificación de sustancias o cualquier otro dispositivo de distribución adecuado. Una cantidad farmacéuticamente eficaz de la forma de polvo seco de la composición se administra en un aerosol o en otra preparación adecuada para la inhalación pulmonar. La cantidad de la forma de polvo seco de la composición colocada en el dispositivo de distribución es suficiente para permitir la distribución de una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición al sujeto mediante la inhalación. Por lo tanto, la cantidad de la forma de polvo seco colocada en el dispositivo de distribución compensará las posibles pérdidas del dispositivo durante el almacenamiento y la distribución de la forma de polvo seco de la composición. Tras la colocación de la forma de polvo seco en el dispositivo de distribución, las partículas con un tamaño apropiado tal y como se ha indicado anteriormente, se suspenden en un propulsor del aerosol. La suspensión no acuosa presurizada se libera a partir del dispositivo de distribución en las vías respiratorias del sujeto mientras está inhalando. El dispositivo de distribución, se distribuye en una única o múltiple dosis fraccionada por inhalación pulmonar en una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición a los pulmones del sujeto. El propulsor del aerosol puede ser de cualquier material convencional empleado para dichos fines, como un clorofluorocarbono, un hidroc fluorocarbono, un hidroclorofluorocarbono, un hidrofluorocarbono o un hidrocarbonos, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1, 1, 1, 2 – tetrafluoroetano o combinaciones de los mismos. Puede añadirse un surfactante a la composición farmacéutica para reducir la adhesión de la proteína que contiene polvo seco en las paredes del dispositivo de distribución en el que se dispensa el aerosol. Los surfactantes adecuados para ello, incluyen, de manera no limitante, sorbitán trioleato, lecitina de soja y ácido oleico. Están disponibles comercialmente dispositivos adecuados para la distribución pulmonar en forma en polvo seco de una composición proteica como una suspensión no acuosa. Algunos ejemplos de dichos dispositivos incluyen el inhalador dosificador Ventolin (Glaxo Inc., Research Triangle Park, NC) y el inhalador Intal (Fisons, Corp., Bedford, MA). Véanse también los dispositivos de administración en aerosol descritos en las patentes U. S. 5,522,378, 5,775,320, 5,934,272 y 5,960,792.

50 Cuando la forma en polvo sólido o seco de la composición farmacéutica de IFN – β sin HSA se administra en forma de polvo seca, es preferible la utilización de un inhalador de polvo seco u otro dispositivo de administración apropiado. La forma en polvo seco de la composición farmacéutica se prepara, preferiblemente, como un aerosol de polvo seco por dispersión en un flujo de aire u otro flujo de gas fisiológicamente aceptable de manera convencional. Algunos ejemplos de inhaladores de polvo seco disponibles comercialmente aptos para su utilización según los métodos descritos en la presente incluyen el inhalador de polvo Spinhaler (Fisons Corp., Bedford, MA) y el Ventolin Rotahaler (Glaxo, Inc., Research Triangle Park, NC). Véanse también los dispositivos de administración de polvo seco descritos en las patentes WO 93 / 00951, WO 96 / 09085, WO 96 / 32152 y en las patentes U. S. 5,458,135, 5,785,049 y 5,993,783.

60 La forma de polvo seco de la composición farmacéutica sin HSA que comprende IFN – β o una variante biológicamente activa de este puede reconstituirse en una solución acuosa para su consiguiente administración como un aerosol de solución acuosa utilizando un nebulizador, un inhalador de dosificación de sustancias u otro dispositivo de administración apto. En el caso de un nebulizador, la solución acuosa que contiene en el depósito de líquido se convierte en un spray acuoso, solo una pequeña parte del mismo deja al nebulizador administrar al sujeto en cualquier tiempo dado. El spray sobrante vuelve al depósito de líquido en el nebulizador, donde se vuelve a convertir en aerosol en el spray acuoso. Este proceso se repite hasta que el depósito de líquido se administre o hasta que la administración del spray en aerosol se termine. Estos nebulizadores se encuentran disponibles comercialmente e incluyen, por ejemplo, el nebulizador Ultravent (Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO) y el nebulizador

Acorn II (Marquest Medical Products, Englewood, CO). Véase también el nebulizador descrito en la patente WO 93 / 00951 y el dispositivo de administración de formulaciones acuosas en aerosol descrito en la patente U. S. 5,544,646. Las composiciones farmacéuticas de IFN- β exentas de HSA de la presente invención son composiciones "estabilizadas". Por "estabilizadas" se entiende que las composiciones conservan el polipéptido IFN- β en su estado sustancialmente monómero durante el almacenamiento y, por tanto la eficacia terapéutica de este polipéptido no está comprometida debido a formación de agregados. Por "durante el almacenamiento" se entiende una composición o formulación farmacéutica líquida que, una vez preparada, no se administra inmediatamente a un sujeto. Más bien, después de la preparación, se envasa para el almacenamiento, en una forma líquida, en un estado congelado o en una forma seca para la reconstitución posterior hasta dar una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto. Esta estabilidad se consigue en ausencia del uso de HSA como un agente estabilizante y solubilizante. Preferentemente, las composiciones de la invención se almacenan directamente en su forma líquida para aprovechar la ventaja de la conveniencia de tener estabilidad durante el almacenamiento en la forma líquida, facilidad de administración sin reconstitución y capacidad de suministrar la formulación en jeringuillas prellenadas, listas para ser utilizadas o como preparaciones multidosis si la formulación es compatible con agentes bacteriostáticos. Las composiciones de IFN- β exentas de HSA estabilizadas de la invención tienen preferentemente una vida útil de al menos aproximadamente 6 meses, 12 meses, 18 meses, más preferentemente al menos 20 meses, todavía más preferentemente al menos aproximadamente 22 meses, mucho más preferentemente al menos aproximadamente 24 meses cuando se almacenan a 2-8 °C.

En la técnica se dispone de procedimientos para controlar la estabilidad de las composiciones farmacéuticas de IFN- β exentas de HSA de la invención, incluyendo los métodos descritos en los ejemplos desvelados en el presente documento. Por tanto, la formación de agregados de IFN- β durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida de la invención se puede determinar de forma sencilla midiendo el cambio en el IFN- β soluble en la solución a lo largo del tiempo. La cantidad de polipéptido soluble en solución se puede cuantificar mediante varios ensayos analíticos adaptados para la detección de IFN- β . Tales ensayos incluyen, por ejemplo, (RP)-HPLC de fase inversa y espectroscopía de absorción UV, como se describe en los Ejemplos a continuación. La determinación de agregados tanto solubles como insolubles durante el almacenamiento en formulaciones líquidas se puede conseguir, por ejemplo, usando ultracentrifugación analítica como se indica en los Ejemplos a continuación para distinguir entre la parte del polipéptido soluble que está presente como agregado soluble y la parte que está presente en la forma molecular biológicamente activa no agregada.

Las formulaciones farmacéuticas estabilizadas de la invención comprenden IFN- β y variantes del mismo. El término "IFN- β ", como se usa en el presente documento, se refiere a IFN- β o variantes del mismo, denominadas en ocasiones polipéptidos de tipo IFN- β . Las variantes de IFN- β humano, que pueden ser de origen natural (por ejemplo, variantes alélicas que tiene lugar en el locus de IFN- β) o pueden producirse recombinantemente, tienen secuencias de aminoácidos que son iguales que, similares a, o sustancialmente similares a la secuencia de IFN- β nativa madura. También se incluyen fragmentos de IFN- β o formas truncadas de IFN- β que conservan su actividad. Estos fragmentos biológicamente activos o formas truncadas de TNF β se generan retirando restos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de IFN- β de longitud completa usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Los polipéptidos de IFN- β pueden estar glicosilados o no glicosilados y se ha descrito en la bibliografía que los IFN- β tanto glicosilados como no glicosilados muestran actividades específicas cualitativamente similares y que, por lo tanto, los restos glicosilo no están implicados en y no contribuyen a la actividad biológica de IFN- β .

Las variantes de IFN- β incluidas en el presente documento incluyen muteínas de la secuencia de IFN- β nativa madura, en la que uno o más restos de cisteína, que no son esenciales para la actividad biológica, se han deletado o sustituido deliberadamente con otros aminoácidos para eliminar sitios para entrecruzamiento intermolecular o formación incorrecta de enlaces disulfuro intramoleculares. Las variantes de IFN- β de este tipo incluyen las que contienen la cisteína encontrada en el aminoácido 17 de la secuencia de aminoácidos nativa madura sustituida por una glicina, valina, alanina, leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina, histidina, triptófano, serina, treonina o metionina. La serina y treonina son las sustituciones más preferentes debido a su analogía química con la cisteína. Las sustituciones de serina son las más preferentes. En una realización, la cisteína encontrada en el aminoácido 17 de la secuencia nativa madura se sustituye con serina. La cisteína 17 también se puede deletar usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.588.584), dando como resultado una muteína de IFN- β madura que es un aminoácido más corto que el IFN- β nativo maduro. Véase también, como ejemplos, las Patentes de Estados Unidos N° 4.530.787; 4.572.798; y 4.588.585. Por tanto, las variantes de IFN- β con una o más mutaciones que mejoran, por ejemplo, su utilidad farmacéutica también están incluidas en la presente invención.

El experto cualificado apreciará que se pueden introducir cambios adicionales mediante mutación en las secuencias de nucleótidos que codifican IFN- β , conduciendo de este modo a cambios en la secuencia de aminoácidos de IFN- β , sin alterar la actividad biológica del interferón. Por tanto, una molécula de ácido nucleico aislado que codifica una variante de IFN- β que tiene una secuencia que difiere de la secuencia de aminoácidos del IFN- β nativa y madura se puede crear introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deletaciones de nucleótidos en la correspondiente

secuencia de nucleótidos desvelada en el presente documento, de tal manera que se introducen una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en el IFN- β codificado. Se pueden introducir mutaciones mediante técnicas convencionales, tales como la mutagénesis dirigida y la mutagénesis mediada por PCR. Tales variantes de IFN- β también están incluidas en la presente invención.

5 Por ejemplo, se pueden preparar sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más restos de aminoácidos predichos, preferentemente no esenciales. Un resto de aminoácido "no esencial" es un resto que se puede alterar desde la secuencia de tipo silvestre de IFN- β sin alterar su actividad biológica, mientras que un resto de aminoácido "esencial" se requiere para la actividad biológica. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se sustituye con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Tales sustituciones no se prepararían para restos de aminoácidos conservados o para restos de aminoácidos que permanecen dentro de un motivo conservado.

20 Como alternativa se pueden preparar secuencias de nucleótidos de IFN- β variante introduciendo mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de IFN- β , tal como mediante mutagénesis de saturación y los mutantes resultantes se pueden explorar para actividad biológica de IFN- β para identificar mutantes que conserven la actividad. Después de la mutagénesis, la proteína codificada se puede expresar recombinantemente y se puede determinar la actividad de la proteína usando técnicas de ensayo convencionales descritas en el presente documento.

25 Las variantes biológicamente activas de IFN- β tendrán generalmente al menos 80%, más preferentemente aproximadamente de 90% a aproximadamente 95% o más y más preferentemente de aproximadamente 96% a aproximadamente 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de IFN- β nativo maduro, que sirve como la base para la comparación. Por "identidad de secuencia" se entiende que los mismos restos de aminoácidos se encuentran dentro del polipéptido variante y la molécula de polipéptido que sirve como una referencia cuando un segmento contiguo, especificado de la secuencia de aminoácidos de la variante, se alinea y compara con la secuencia de aminoácidos de la molécula de referencia.

35 Para los fines del alineamiento óptimo de las dos secuencias para los fines de la determinación de la identidad de secuencia, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos de la variante puede tener restos de aminoácidos adicionales o restos de aminoácidos delecionados con respecto a la secuencia de aminoácidos de la molécula de referencia. El segmento contiguo usado para la comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia comprenderá al menos 20 restos de aminoácidos contiguos. Las correcciones para identidad de secuencia aumentada asociada con inclusión de huecos en la secuencia de aminoácidos de la variante se pueden realizar asignando penalizaciones por hueco. Los métodos de alineamiento de secuencia se conocen bien en la técnica.

40 Por tanto, la determinación del porcentaje de identidad entre cualquiera de dos secuencias se puede conseguir usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferente no limitante de un algoritmo matemático usado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4: 11-7. Tal algoritmo se usa en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software de alineamiento GCG. Cuando se comparan secuencias de aminoácidos con el programa ALIGN, se puede usar una tabla de resto de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Otro ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático para su uso en la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877, modificado tal como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. Se pueden realizar búsquedas de secuencias de aminoácidos BLAST con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener una secuencia de aminoácidos similar al polipéptido de interés. Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación se puede usar el BLAST con huecos como se describe en Altschul y col. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. Como alternativa se puede usar PSI

45 BLAST para realizar una búsqueda integrada que detecte relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul y col. (1997) anteriormente. Cuando se usa BLAST, BLAST con huecos o programas de PSI-BLAST se pueden usar los parámetros por defecto. Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Véase también el programa ALIGN (Dayhoff (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* :Suppl. 3, National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C.) y programas en el Paquete de Análisis de Secuencia Wisconsin, Versión 8 (disponible en Genetics 5 Computer Group, Madison, Wisconsin), por ejemplo, el programa GAP, en el que se usan los parámetros por defecto de los programas.

65 Cuando se considera el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, algunas posiciones de restos de

aminoácidos pueden diferir como resultado de sustituciones de aminoácidos conservativas, que no afectan a las propiedades de la función de la proteína. En estos casos se puede ajustar el porcentaje de identidad de secuencia al alza para tener en cuenta la similitud en los aminoácidos sustituidos conservativamente. Tales ajustes se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Myers y Miller (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4: 11-17.

Las variantes de IFN- β biológicamente activas incluidas en la invención también incluyen polipéptidos IFN- β que se han enlazado covalentemente, por ejemplo, con polietilenglicol (PEG) o albúmina. Estas moléculas de IFN- β híbridas covalentes poseen ciertas propiedades farmacéuticas deseables, tales como una semivida en suero prolongada después de la administración a un paciente. Los métodos para crear aductos de PEG- IFN implican modificación química de monometoxipolietilenglicol para crear un compuesto activado que reaccionará con IFN- β . Se describen métodos para preparar y usar polipéptidos enlazados a PEG, por ejemplo, en Delgado y col. (1992) *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 9: 249-304. En la Patente de Estados Unidos N° 5.876.969 se describen métodos para crear polipéptidos de fusión con albúmina que implican la fusión de las secuencias codificantes para el polipéptido de interés (por ejemplo, IFN- β) y albúmina.

Las variantes biológicamente activas de IFN- β incluidas en la invención deben conservar las actividades de IFN- β , particularmente la capacidad de unirse a receptores de IFN- β . En algunas realizaciones, la variante de IFN- β conserva al menos aproximadamente 25%, aproximadamente 50%, aproximadamente 75%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más de la actividad biológica de los polipéptidos cuyas secuencias de aminoácidos se proporcionan en la Figura 1 ó 2. También se incluyen variantes de IFN- β cuya actividad está aumentada en comparación con la actividad de los polipéptidos mostrados en la Figura 1 ó 2. La actividad biológica de variantes de IFN- β se puede medir mediante cualquier método conocido en la técnica. Se pueden encontrar ejemplos de tales ensayos en Fellous y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79: 3082-3086; Czerniecki y col. (1984) *J. Virol.* 49(2): 490-496; Mark y col. (1984) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81: 5662-5666; Branca y col. (1981) *Nature* 277: 221-223; Williams y col. (1979) *Nature* 282: 582-586; Herberman y col. (1979) *Nature* 277: 221-223; Anderson y col. (1982) *J. Biol. Chem.* 257(19):1 1301-11304; y en el ensayo de potencia de IFN- β descrito en el presente documento (véase el Ejemplo 2).

El IFN- β de las formulaciones de la invención puede ser de cualquier especie animal incluyendo, pero sin limitación, aviar, canina, bovina, porcina, equina y humana. Preferentemente, cuando la formulación se tiene que usar en el tratamiento de un trastorno de IFN- β de mamífero, el IFN- β es de una especie de mamífero y más preferentemente es de un mamífero de la misma especie que el mamífero que se somete a tratamiento para tal trastorno. Por tanto, cuando el mamífero que se somete a tratamiento es un ser humano, preferentemente al sujeto se administra una composición farmacéutica exenta de HSA que comprende IFN- β humano sustancialmente monómero o una variante biológicamente activa de este.

Se exponen ejemplos no limitantes de polipéptidos IFN- β y polipéptidos variantes de IFN- β incluidos en la invención en Nagata y col. (1980) *Nature* 284: 316-320; Goeddel y col. (1980) *Nature* 287: 411-416; Yelverton y col. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9: 731-741; Streuli y col. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 2848-2852; EP028033B1 y EP109748B1. Véase también las Patentes de Estados Unidos N° 4.518.584; 4.569.908; 4.588.585; 4.738.844; 4.753.795; 4.769.233; 4.793.995; 4.914.033; 4.959.314; 5.545.723; y 5.814.485. Estas citas también proporcionan una guía con respecto a los restos y las regiones del polipéptido IFN- β que se pueden alterar sin la pérdida de actividad biológica.

En una realización de la presente invención, el IFN- β dentro de las formulaciones farmacéuticas estabilizadas es el polipéptido IFN- β nativo maduro. En otra realización, y el IFN- β en estas formulaciones es el polipéptido IFN- β maduro donde la cisteína encontrada en el aminoácido 17 de la secuencia nativa madura se sustituye con serina como se ha analizado anteriormente. Sin embargo, la presente invención incluye otras realizaciones en las que el IFN- β dentro de la formulación farmacéutica estabilizada es cualquier polipéptido de IFN- β biológicamente activo o variante como se describe a lo largo del presente documento.

En algunas realizaciones de la presente invención, el IFN- β se produce recombinantemente. Por "IFN- β producido recombinantemente" se entiende un IFN- β que tiene una actividad biológica comparable con un IFN- β nativo maduro y que se ha preparado mediante técnicas de ADN recombinante. Se puede producir IFN- β por cultivo de una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido IFN- β . La célula hospedadora es una que puede transcribir la secuencia de nucleótidos y producir la proteína deseada y puede ser procariota (por ejemplo, *E. coli*) o eucariota (por ejemplo, una célula de levadura, insecto o mamífero). Se proporcionan ejemplos de la producción recombinante de IFN- β en Mantei y col. (1982) *Nature* 297: 128; Ohno y col. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10: 967; Smith y col. (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156, y las Patentes de Estados Unidos N° 4.462.940, 5.702.699 y 5.814.485. Se han clonado genes de interferón humano usando tecnología de ADN recombinante ("ADNr") y se han expresado en *E. coli* (Nagata y col. (1980) *Nature* 284: 316; Goeddel y col. (1980) *Nature* 287: 411; Yelverton y col. (1981) *Nuc. Acid Res.* 9: 731; Streuli y col. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 2848). Como alternativa se puede producir IFN- β mediante un animal o planta transgénica que se haya modificado genéticamente para expresar la proteína IFN- β de interés de acuerdo con métodos

conocidos en la técnica.

También se pueden producir proteínas o polipéptidos que muestren propiedades de tipo interferón beta nativo con la tecnología de ADN_r extrayendo ARN mensajero 12S rico en poli-A de células humanas inducidas viralmente, sintetizando ADN_c bicatenario usando el ARN_m como un molde, introduciendo el ADN_c en un vector de clonación apropiado, transformando microorganismos adecuados con el vector, recogiendo los microorganismos y extrayendo el interferón beta de los mismos. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea N° 28033 (publicada el 6 de mayo de 1981); 32134 (publicada el 15 de julio de 1981); y 34307 (publicada el 26 de agosto de 1981), que describen diversos métodos para la producción de interferón beta empleando técnicas de ADN_r.

Como alternativa, se puede sintetizar químicamente IFN- β mediante cualquiera de las diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia de péptidos. Véase, por ejemplo, Li y col. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2216-2220, Steward y Young (1984) Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois), y Baraney y Merrifield (1980) The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, ed. Gross and Meinhofer, Vol. 2 (Academic Press, New York, 1980), págs 3-254, que analizan técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida; y Bodansky (1984) Principles of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, Berlín) and Gross y Meinhofer, eds. (1980) The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1 (Academic Press, New York), que analizan síntesis de solución clásica. El IFN- β se puede preparar también químicamente mediante el método de síntesis de péptidos múltiples simultánea. Véase, por ejemplo, Houghten (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135; y la Patente de Estados Unidos N° 4.631.211.

El IFN- β producido recombinantemente, para su uso en la preparación de las composiciones farmacéuticas de IFN- β exentas de HSA estabilizadas de la invención, se puede recuperar y purificar usando cualquier método conocido por un experto en la materia. Tales métodos incluyen los desvelados en las Patentes de Estados Unidos N° 4.462.940 y 5.702.699. Estos métodos recuperan el interferón en una forma pura de IFN- β que tiende a formar agregados en ausencia de SDS, que se usa como un agente de solubilización. Además, estos métodos exponen la proteína a condiciones de pH elevado que pueden afectar adversamente a las propiedades biológicas de la proteína y pueden dar como resultado composiciones que contengan cantidades residuales de SDS usadas para solubilizar la proteína durante la purificación. Por tanto, aunque el IFN- β se puede obtener usando estos métodos, preferentemente se recupera y purifica mediante el método mejorado desvelado en la solicitud de patente de Estados Unidos US-2002/0137895.

En estas solicitudes relacionadas y presentadas de forma simultánea se desvelan dos métodos de purificación y recuperación mejorados para IFN- β . El primero de estos métodos de purificación y recuperación comprende precipitar IFN- β sustancialmente purificado con un alcohol, tal como un alcohol alifático y disolver el IFN- β precipitado en clorhidrato de guanidina. Después, para renaturalizar la proteína, la solución resultante se diluye en un tampón apropiado. El segundo de estos métodos de purificación y recuperación omite la etapa de precipitación. De este modo, una muestra que comprende IFN- β sustancialmente purificado se mezcla con clorhidrato de guanidina para formar una solución que comprende IFN- β desnaturalizado solubilizado, después se diluye esta solución en un tampón apropiado para renaturalizar la proteína. En ambos métodos, la solución que comprende IFN- β renaturalizado se diafiltra o dializa en un tampón usado para fines farmacéuticos. Cuando se usa para preparar una composición farmacéutica exenta de HSA de la presente invención, la proteína de IFN- β renaturalizada purificada se diafiltra o dializa en una formulación de fuerza iónica baja de la presente invención como se describe en el siguiente Ejemplo 8.

Las composiciones incluidas en la invención pueden tener tan poco como aproximadamente 0,01 mg/ml de IFN- β y tanto como aproximadamente 20,0 mg/ml de IFN- β (peso/volumen). En diversas realizaciones, el IFN- β se presenta a una fuerza de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 20,0 mg/ml, de aproximadamente 0,015 mg/ml a aproximadamente 12,5 mg/ml, de aproximadamente 0,025 mg/ml a aproximadamente 10,0 mg/ml, de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 8,0 mg/ml, de aproximadamente 0,075 mg/ml a aproximadamente 6,0 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 4,0 mg/ml, de aproximadamente 0,125 mg/ml a aproximadamente 2,0 mg/ml, de aproximadamente 0,175 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml, de aproximadamente 0,225 mg/ml a aproximadamente 0,3 mg/ml y aproximadamente 0,25 mg/ml.

En algunas realizaciones, las formulaciones de la invención comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende un vehículo que se usa convencionalmente en la técnica para facilitar el almacenamiento, la administración y/o el efecto curativo de los principios terapéuticos. Un vehículo puede reducir también cualquiera de los efectos secundarios no deseables del IFN- β . Un vehículo adecuado debe ser estable, es decir, incapaz de reaccionar con otros principios en la formulación. No debe producir efectos adversos locales o sistémicos significativos en los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas para el tratamiento. Tales vehículos se conocen generalmente en la técnica. Los vehículos adecuados para la presente invención son las macromoléculas estables grandes usadas convencionalmente tales como gelatina, colágeno, polisacárido, monosacáridos, polivinilpirrolidona, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, aminoácidos polímeros, aceites no volátiles, oleato etílico, liposomas, glucosa, lactosa, manosa, dextrosa, dextrano, celulosa, sorbitol, polietilenglicol

(PEG) y similares. También pueden ser adecuados vehículos de liberación lenta, tales como ácido hialurónico. Véase particularmente Prisell y col. (1992) *Int. J. Pharmaceu.* 85:51-56 y la Patente de Estados Unidos 5.166.331.

La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un agente de solubilización o potenciador de la solubilidad que contribuya a la solubilidad de la proteína más allá de la solubilidad aumentada obtenida usando las formulaciones de fuerza iónica baja desveladas en el presente documento. Los compuestos que contienen un grupo guanidinio, más preferentemente arginina, son potenciadores de la solubilidad adecuados para IFN- β . Los ejemplos de tales potenciadores de la solubilidad incluyen el aminoácido arginina así como análogos de aminoácidos de arginina que conservan la capacidad de aumentar la solubilidad de IFN- β . Tales análogos incluyen, sin limitación, dipéptidos y tripéptidos que contienen arginina. En las Patentes de Estados Unidos N° 4.816.440; 4.894.330; 5.004.605; 5.183.746; 5.643.566; y en Wang y col. (1980) *J. Parenteral Drug Assoc.* 34:452-462 se analizan agentes de solubilización adecuados adicionales.

Además de esos agentes desvelados anteriormente, se pueden añadir otros agentes estabilizantes, tales como ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o una de sus sales tales como EDTA disódica para aumentar adicionalmente la estabilidad de las composiciones farmacéuticas líquidas. El EDTA actúa como un aceptor de iones metálicos que se sabe que catalizan muchas reacciones de oxidación, proporcionando de este modo un agente estabilizante adicional. Otros agentes estabilizantes adecuados incluyen agentes tensioactivos no iónicos, incluyendo ésteres de polioxietilen-sorbitol tales como polisorbato 80 (Tween 80) y polisorbato 20 (Tween 20); ésteres polioxipropileno-polioxietileno tales como Pluronic F68 y Pluronic F127; polioxietileno-alcoholes tales como Brij 35; dimeticona; polietilenglicol tal como PEG400; lisofosfatidilcolina; y polioxietileno-*p-t*-octilfenol tal como Triton X-100. La estabilización clásica de productos farmacéuticos por agentes tensioactivos se describe, por ejemplo, en Levine y col. (1991) *J. Parenteral Sci. Technol.* 45(3):160-165.

Una cantidad farmacéuticamente eficaz de una formulación de IFN- β exenta de HSA líquida estabilizada de la invención se administra a un sujeto. Por "cantidad farmacéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que es útil en el tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o afección. Las vías de administración típicas incluyen, pero sin limitación, administración oral, aplicación nasal, aplicación pulmonar y administración parenteral, incluyendo transdérmica, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial e inyección o infusión intraperitoneal. En una de tales realizaciones, la administración es mediante inyección, preferentemente inyección subcutánea. Las formas inyectables de las composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación, soluciones, suspensiones y emulsiones. Típicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz de IFN- β comprende de aproximadamente 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 5 mg/kg de la composición, preferentemente de aproximadamente 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, más preferentemente de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aun más preferentemente todavía de aproximadamente 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

En una realización, la composición farmacéutica exenta de HSA estabilizada que comprende IFN- β sustancialmente monómero se formula en una dosificación unitaria y puede estar en una forma inyectable o infundible tal como una solución, suspensión o emulsión. La composición farmacéutica estabilizada puede esterilizarse mediante filtración con membrana y se almacena en recipientes unidosis o multidosis tales como viales o ampollas selladas. Se pueden usar métodos adicionales para formular una composición farmacéutica conocida de forma general en la técnica para aumentar adicionalmente la estabilidad durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento suponiendo que no afecten de forma adversa a los efectos beneficiosos de los agentes estabilizantes desvelados en el presente documento. Se puede encontrar una discusión extensa de la formulación y selección de vehículos, estabilizantes, etc. farmacéuticamente aceptables en Remington's *Pharmaceutical Sciences* (1990) (18^a ed., Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania).

Las formulaciones que comprenden una cantidad eficaz de las composiciones farmacéuticas de la invención que comprenden β -interferón (IFN- β) o una variante del mismo, tal como la muteína de IFN- β humano (hIFN- β) denominada hIFN- β ser17, son útiles en el diagnóstico, prevención y tratamiento (local o sistémico) de indicios clínicos

que responden a terapia con este polipéptido. Tales indicios clínicos incluyen, por ejemplo, trastornos o enfermedades del sistema nervioso central (SNC), cerebro y/o médula espinal, que incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia por cuerpos de Lewy, esclerosis múltiple, epilepsia, ataxia cerebelosa, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica, trastornos afectivos, trastornos por ansiedad, trastornos obsesivos compulsivos, trastornos de la personalidad, trastorno de déficit de atención, trastorno de déficit de atención e hiperactividad, síndrome de Tourette, Tay Sachs, Nieman Pick y esquizofrenia; lesión nerviosa por trastornos cerebrovasculares tales como ictus en el cerebro o la médula espinal, e infecciones del SNC que incluyen meningitis y VIH, de tumores del cerebro y la médula espinal o de una enfermedad priónica; enfermedades autoinmunes incluyendo inmunodeficiencia adquirida, artritis reumatoide, soriasis, enfermedad de Crohn, síndrome de Sjogren, esclerosis lateral amiotrófica y lupus; y cánceres, incluyendo cáncer de mama, de próstata, de vejiga, de riñón y de colon. La administración de IFN- β o sus muteínas a seres humanos o animales puede suministrarse por vía oral, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intranasal o mediante suministro pulmonar como considere apropiado el facultativo.

La presente invención presenta un método para incrementar la solubilidad de interferón - beta (IFN - β) o una

variante biológicamente activa del mismo en una composición farmacéutica en ausencia de seroalbúmina humana. El método comprende la preparación de la composición con una formulación de baja fuerza iónica tal y como se describe en otro apartado de la presente invención que el pH de la composición se mantienen en un pH de 3,0 a 5,0 y la incorporación del IFN – β o de la variante biológicamente activa del mismo en la composición. En una realización, la formulación de baja fuerza iónica comprende glicina, ácido aspártico o succinato sódico como tampón a una concentración de 1 mM a 30 mM, preferiblemente de 2 mM a 5 mM. La composición comprende, además, un agente tonificante no iónico, manitol, en una cantidad suficiente para que la composición se vuelva isotónica con los fluidos corporales en una concentración del 4 % al 6 % en peso por volumen. Al mantener el pH de esta composición entre 3,0 y 5,0, es posible mantener la mayor parte del IFN – β en su estado monomérico. Por lo tanto, la presente invención también presenta un método para preparar una composición farmacéutica estable sin HSE que comprende IFN – β sustancialmente monomérico.

Los siguientes ejemplos se muestran de manera ilustrativa y no de manera limitante.

15 **PARTE EXPERIMENTAL**

La presente invención se realizó comprendiendo mejor las propiedades de solubilidad y estabilidad de IFN- β -1b. Las características preferidas de las formulaciones de IFN- β -1b exentas de HSA se encuentran en un intervalo de pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 5,0 y en condiciones de fuerza iónica muy baja. El uso de condiciones de fuerza iónica muy baja dentro de este intervalo de pH da como resultado un mayor contenido de IFN- β -1b monómero y un menor contenido de especies de IFN- β -1b agregadas. Estas condiciones permiten una solubilidad y estabilidad de IFN- β -1b que no se podían conseguir previamente sin el uso de HSA en la formulación. También permiten que las formulaciones tengan el contenido máximo de IFN- β -1b monómero.

25 El IFN- β -1b para su uso en estos experimentos se produjo en *E. coli* esencialmente como se describe en las primeras de las diversas etapas de purificación expuestas en las Patentes de Estados Unidos N° 4.462.940 y/o 4.816.400. Es decir, se usaron bacterias transformadas para producir IFN- β , las células hospedadoras se concentraron y sus paredes celulares se rompieron para obtener material en bruto de IFN- β -1b.

30 El material en bruto de IFN- β -1b, obtenido de este modo, contiene acetato sódico 50 mM, EDTA 1 mM, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,1% a pH 5,5. Para crear el material de partida para las mediciones de solubilidad y estabilidad, que se describen más adelante, se retiró el SDS del material en bruto de IFN- β -1b procesando el material a través de una columna G-25 (Pharmacia) equilibrada con hidróxido sódico 1,5 mM a > pH 11. Después de recoger el combinado de la columna G-25 se añadió un volumen de glicina 1 M, pH 3, igual a aproximadamente 1/10 del combinado con agitación rápida para ajustar el combinado a ~ pH 3. Los materiales se almacenaron a 4 °C o se congelaron para el uso posterior en mediciones de solubilidad y estabilidad.

Ejemplo 1 (como referencia): - Determinación de la solubilidad de IFN- β -1b.

40 Se realizaron experimentos iniciales para comprender la solubilidad de IFN- β -1b en una amplia diversidad de condiciones de pH, tipo de tampón y fuerza iónica. Se dializó una solución de IFN- β -1b (~0,8 mg/ml de IFN- β -1b en glicina 100 mM, pH 3,0) frente a los tampones indicados en la Tabla 1. Los resultados se muestran en la Figura 1. Estos resultados muestran que la solubilidad de IFN- β -1b depende del pH y de la fuerza iónica. El IFN- β -1b a pH 3,0 45 permanece soluble a todas las concentraciones de cloruro sódico hasta 200 mM. Para las formulaciones a pH 4,0, el IFN- β -1b se hace menos soluble cuando la fuerza de cloruro sódico alcanza 150 mM. Para las formulaciones a pH 5,0, el IFN- β -1b se hace menos soluble cuando la formulación contiene solamente cloruro sódico 100 mM. Considerados en su conjunto, estos datos indican que el IFN- β -1b es más soluble en formulaciones a pH 3,0, menos soluble en formulaciones a pH 4,0 y mínimamente soluble a pH 5,0. Estos datos también indican que el aumento de 50 la fuerza iónica de las formulaciones (aumentando la fuerza de cloruro sódico) también disminuye la solubilidad de IFN- β -1b.

Aunque el experimento anterior pudo determinar las condiciones favorables para la solubilidad de IFN- β -1b, no determina el límite de solubilidad en ninguna de las condiciones proporcionadas. Se realizó un experimento posterior para determinar los límites de solubilidad de IFN- β -1b. Para maximizar el IFN- β -1b se usaron formulaciones de fuerza iónica baja (es decir, tampón 5 mM y ninguna sal tal como cloruro sódico.). Después de la diálisis, se concentró el IFN- β -1b para determinar el límite de solubilidad en una formulación proporcionada. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 2. Las formulaciones a pH 3,0 y 4,0 son más solubles, mostrando una solubilidad de al menos 16 mg/ml. La formulación a pH 5 fue soluble a aproximadamente 8 mg/ml. Las formulaciones por encima de pH 5,0 eran solubles solo a aproximadamente 0,2 mg/ml. Estos resultados indican de nuevo que el pH tiene un efecto poderoso sobre la solubilidad de IFN- β -1b. Las formulaciones de fuerza iónica baja a pH 3,0 y pH 4,0 son más solubles que a pH 5,0. Por encima de pH 5,0, el IFN- β -1b es esencialmente insoluble en formulaciones de fuerza iónica baja.

Tabla 1: Formulaciones para examinar la solubilidad de IFN- β -1b, pH, tipo de tampón y fuerza de cloruro sódico

	Tampón	pH	Fuerza de Cloruro Sódico (mM)
5	Glicina 5 mM	pH 3	0 mM
	Glicina 5 mM	pH 3	50 mM
	Glicina 5 mM	pH 3	100 mM
	Glicina 5 mM	pH 3	150 mM
10	Citrato 5 mM	pH 4	0 mM
	Citrato 5 mM	pH 4	50 mM
	Citrato 5 mM	pH 4	100 mM
	Citrato 5 mM	pH 4	150 mM
15	Acetato 5 mM	pH 4	0 mM
	Acetato 5 mM	pH 4	50 mM
	Acetato 5 mM	pH 4	100 mM
	Acetato 5 mM	pH 4	150 mM
20	Formiato 5 mM	pH 4	0 mM
	Formiato 5 mM	pH 4	50 mM
	Formiato 5 mM	pH 4	100 mM
	Formiato 5 mM	pH 4	150 mM
25	Acetato 5 mM	pH 5	0 mM
	Acetato 5 mM	pH 5	50 mM
	Acetato 5 mM	pH 5	100 mM
	Acetato 5 mM	pH 5	150 mM
30	Histidina 5 mM	pH 5	0 mM
	Histidina 5 mM	pH 5	50 mM
	Histidina 5 mM	pH 5	100 mM
	Histidina 5 mM	pH 5	150 mM
35	Succinato sódico 5 mM	pH 5	0 mM
	Succinato sódico 5 mM	pH 5	50 mM
	Succinato sódico 5 mM	pH 5	100 mM
	Succinato sódico 5 mM	pH 5	150 mM

40 Ejemplo 2 (Como referencia) - Experimentos de Ultracentrifugación Analítica

Aunque los experimentos de solubilidad pueden determinar cuánto IFN- β -1b está en solución, se requieren otras técnicas para determinar el estado de agregación de la proteína. Es importante determinar si una proteína es monómera en una formulación proporcionada y determinar cuánto de la proteína (si es que hay) existe en formas ordenadas de manera superior tales como dímeros, trímeros, etc. La ultracentrifugación analítica es una de las técnicas más poderosas para aclarar el estado de agregación de proteínas (véase Liu y Shire (1999) J. Pharm. Sci. 88: 1237-1241). Se realizaron tres experimentos para caracterizar el contenido monómero de varias formulaciones de IFN- β -1b con el uso de ultracentrifugación analítica. Cada uno de estos experimentos de ultracentrifugación analítica se realizó con una preparación diferente de IFN- β . En este aspecto, cada experimento contenía una formulación común (glicina 5 mM, pH 3,0). Sin embargo, cada una de estas formulaciones comunes varió ligeramente en el porcentaje de monómero (Figura 3 - 89,8%; Figura 6 - 94,2%; Figura 9 - 86,3%). El procedimiento de recuperación y purificación usado para preparar estas formulaciones de IFN- β -1b produce cierta agregación de la molécula de IFN- β -1b, que es principalmente covalente en la naturaleza. La formulación de glicina 5 mM, pH 3,0 para cada experimento sirve por lo tanto como el nivel basal para la cantidad de agregado en la formulación al comienzo de cada experimento.

El primer experimento examinó el efecto del pH sobre el estado de agregación de IFN- β -1b. Se analizaron formulaciones a pH 3,0 (que contenía solamente glicina 5 mM para tamponar la solución), pH 4,0 (que contenía solamente ácido aspártico 5 mM para tamponar la solución) y pH 5,0 (que contenía solamente succinato sódico 5 mM para tamponar la solución). Los resultados se muestran en las Figuras 3, 4 y 5. El pico principal en estos perfiles corresponden a un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, que es muy próximo al peso molecular de IFN- β -1b (19,878 kDa). Por lo tanto, el pico principal es el monómero de IFN- β -1b. Las especies más grandes (dímeros, trímeros, etc.) corresponden a coeficientes de sedimentación más altos. Estos resultados muestran que, aunque el IFN- β -1b es principalmente monómero a pH 3,0 y pH 4,0 (aproximadamente 90%), a pH 5,0, la molécula comienza a agregarse hasta dar especies ordenadas de forma superior y es solo aproximadamente el 75% monómero. Estos

resultados indican que el estado de agregación de IFN- β -1b es susceptible a cambios en el pH y que el monómero de IFN- β -1b está favorecido por las condiciones de pH bajo tales como pH 3,0 y pH 4,0.

El segundo experimento investigó el efecto de la fuerza iónica sobre el estado de agregación de IFN- β -1b. La fuerza iónica de la formulación aumentó en formulaciones a pH 3,0 (tamponadas con glicina 5 mM) añadiendo cloruro sódico 0,50 mM y 150 mM. Los resultados se muestran en las Figuras 6, 7 y 8. Para la formulación que no contenía cloruro sódico añadido (Figura 6), la forma monómera de IFN- β -1b comprende aproximadamente 94% del IFN- β -1b total (es decir, 94% del pico principal). Cuando se añade cloruro sódico 50 mM a la formulación, el contenido de monómero desciende a aproximadamente 76% (Figura 7) y con cloruro sódico 150 mM en la formulación, el contenido de monómero desciende a menos de 10% (Figura 8). Estos resultados indican que el estado de agregación de IFN- β -1b es muy susceptible a la fuerza iónica y que el monómero IFN- β -1b está favorecido por concentraciones de fuerza iónica baja.

Una característica deseable de una formulación farmacéutica inyectable es que debe ser isotónica con los fluidos corporales. Se pueden usar sustancias iónicas (tales como cloruro sódico) y sustancias no iónicas (tales como los azúcares sacarosa y trehalosa) para hacer que la formulación sea isotónica con los fluidos corporales. Los experimentos de ultracentrifugación analítica previos examinaron formulaciones que eran no isotónicas (que contenían solamente tampón 5 mM) o que contenían cloruro sódico como un agente de tonificación iónico. Un tercer experimento examinó el efecto de agentes tonificantes no iónicos sobre el estado de agregación de IFN- β -1b. En este experimento se prepararon tres formulaciones a pH 3,0 (tamponadas con glicina 5 mM). Una contenía solamente el agente de tamponamiento glicina, la segunda se tonificó con sacarosa al 9% y una tercera se tonificó con trehalosa al 9%. Los resultados de ultracentrifugación analítica se muestran en las Figuras 9, 10 y 11. El contenido de monómero de la formulación solamente con el agente de tamponamiento (Figura 9) es aproximadamente 86%. Cuando se añade sacarosa (Figura 10) o trehalosa (Figura 11) como el agente tonificante, el contenido de monómero es de aproximadamente 89%. Estos resultados indican que los agentes tonificantes no iónicos, tales como sacarosa y trehalosa, no promueven la agregación de la molécula de IFN- β -1b.

Ejemplo 3 (Como referencia) - Estabilidad de Formulaciones Liofilizadas de IFN- β -1b Exentas de HSA en Condiciones de Temperatura Aceleradas

Se liofilizaron formulaciones de IFN- β -1b exentas de HSA a pH 3,0 (glicina 5 mM como tampón) y pH 4,0 (ácido aspártico 5 mM como tampón) que contenían trehalosa al 9% (pH 3,0 y pH 4,0) o sacarosa al 9% (pH 4,0). Después, las formulaciones liofilizadas se almacenaron a 40 °C y durante 8 semanas se midió su estabilidad. La sacarosa y la trehalosa son agentes estabilizantes típicos usados en formulaciones liofilizadas. Se usa un nivel del 9% de esos reactivos de forma que la formulación reconstituida sea isotónica con los fluidos corporales. Para minimizar la fuerza iónica de las formulaciones y, por tanto, la cantidad de IFN- β -1b agregado, la cantidad de tampón se mantuvo a un nivel mínimo. Por tanto, todos los tampones estaban a una fuerza de 5 mM.

La condición de almacenamiento típica para productos farmacéuticos proteicos con frecuencia es de 5 °C. Sin embargo, en estudios de formulación, con frecuencia se usan condiciones de temperatura aceleradas para aumentar la velocidad de degradación de una formulación particular de manera que se puedan recoger datos de estabilidad pertinentes en un periodo de tiempo más corto. En este experimento, para conseguir la degradación forzada de IFN- β -1b en formulaciones exentas de HSA, se usó una temperatura de 40 °C. Los resultados para las mediciones de fuerza y análisis de HPLC de fase inversa (RP-HPLC) se muestran en las Figuras 12 y 13. Estos resultados muestran que incluso a temperaturas elevadas, durante las 8 semanas del estudio, estas formulaciones de IFN- β -1b no muestran cambios detectables.

Ejemplo 4 (Como referencia) - Estabilidad de Formulaciones Liofilizadas de IFN- β -1b Exentas de HSA que Contienen Trehalosa en Condiciones de Almacenamiento en Tiempo Real

Aunque la condición de almacenamiento típica para productos farmacéuticos proteicos es de 5 °C, es deseable tener un producto con estabilidad a temperatura ambiente (de 25 °C a 30 °C). En este experimento se liofilizaron formulaciones que contenían trehalosa al 9% (glicina 5 mM, pH 3, o ácido aspártico 5 mM, pH 4). Se usó una fuerza de trehalosa al 9% de tal manera que la formulación reconstituida fuera isotónica con los fluidos corporales. Las formulaciones se almacenaron a 5 °C y 30 °C y se midió su estabilidad durante 9 meses. Los resultados para las mediciones de fuerza y análisis de HPLC de fase inversa (RP-HPLC) se muestran en las Figuras 14 y 15. Estos resultados muestran que incluso a 30 °C, durante los 9 meses del estudio, estas formulaciones de IFN- β -1b no muestran cambios detectables.

Ejemplo 5 (Como referencia) - Estabilidad de Formulaciones Líquidas de IFN- β -1b Exentas de HSA en Condiciones de Temperatura Aceleradas

También se examinó la estabilidad de formulaciones de IFN- β -1b exentas de HSA a pH 3,0 y pH 4,0 en el estado líquido. La composición de las formulaciones era igual a la indicada en el Ejemplo 3 (trehalosa al 9% (pH 3,0 y pH 4,0) o sacarosa al 9% (pH 4,0)). De nuevo, para minimizar la fuerza iónica de las formulaciones y, por tanto, minimizar la cantidad de IFN- β -1b agregado, la cantidad de tampón se mantuvo a un nivel mínimo (5 mM). Las

ormulaciones líquidas se almacenaron a 30 °C y durante 9 semanas se midió su estabilidad. La condición de almacenamiento típica para formulaciones de proteína líquidas es de 5 °C. Por lo tanto, el almacenamiento a 30 °C representa condiciones de temperatura aceleradas que aumentan la velocidad de degradación de IFN-β-1b. Los resultados mostrados en la Figura 16 (mediciones de concentración) y en la Figura 17 (análisis de HPLC de fase inversa) no muestran cambios detectables en las formulaciones durante las 9 semanas del estudio. Estos resultados indican que en estas formulaciones, con estas condiciones, el IFN-β-1b es estable durante todo el estudio.

Ejemplo 6 (Como referencia) - Estabilidad de Formulaciones Líquidas de IFN-β-1b Exentas de HSA en Condiciones de Almacenamiento en Tiempo Real

En este experimento se examinaron formulaciones líquidas que contenían trehalosa al 9% (glicina 5 mM, pH 3, o ácido aspártico 5 mM, pH 4) o sacarosa al 9% (glicina 5 mM, pH 3 o ácido aspártico 5 mM, pH 4) en condiciones de almacenamiento en tiempo real de 5 °C. Las formulaciones se cargaron en viales y durante 9 meses se midieron sus estabilidades. En las Figuras 18 y 19, se muestran, respectivamente, los resultados para las mediciones de la fuerza y el análisis de HPLC de fase inversa (RP-HPLC). Estos resultados indican que, en estas formulaciones, el IFN-β-1b es estable durante los 9 meses de este estudio.

Ejemplo 7 (Como referencia) - La Trehalosa es Preferible a la Sacarosa como un Agente Tonificante No Iónico para Formulaciones de IFN-β-1b

En este experimento se prepararon formulaciones que contenían trehalosa al 9% (glicina 5 mM, pH 3 o ácido aspártico 5 mM, pH 4) y sacarosa al 9% (glicina 5 mM, pH 3 o ácido aspártico 5 mM, pH 4) y se cargaron en viales como un líquido y se liofilizaron los viales de la misma formulación. Sus estabilidades se midieron en condiciones de temperatura aceleradas, que son con frecuencia predictivas de la estabilidad por orden de importancia de las formulaciones de una proteína determinada. Las formulaciones líquidas se almacenaron a 30 °C durante 9 semanas y las formulaciones liofilizadas se almacenaron a 40 °C durante 8 semanas. Los resultados de las mediciones de fuerza se muestran en la Figura 20 (líquido) y la Figura 21 (liofilizado). Estos resultados indican que las formulaciones a pH 3 que contiene sacarosa muestran un aparente aumento en la concentración. Este aparente aumento en la fuerza se debe a la hidrólisis de la sacarosa a pH bajo para formar azúcares reductores, que da como resultado la descomposición no enzimática (es decir, reacción de Maillard) de las formulaciones. La trehalosa es mucho más resistente a la hidrólisis y, por lo tanto, se prefiere frente a la sacarosa en estas formulaciones (véase O'Brien (1996) Science 61:679-682).

Ejemplo 8 (Como referencia): Retirada de SDS y Formulación de IFN-β-1b Usando Precipitación con Clorhidrato de Guanidina

Se almacenó IFN-β-1b purificado (1 l de 1,91 mg/ml en SDS al 0,4%, tampón acetato 50 mM, pH 5,5) a 5 °C. Durante el almacenamiento, precipitó algo del SDS presente. Se mezclaron 250 ml de este material (477,5 mg) con 229 de clorhidrato de guanidina (6 M, volumen total 400 ml) y se agitaron a temperatura ambiente durante 15 minutos usando una barra de agitación magnética. La solución de clorhidrato de guanidina 6 M/proteína se filtró después con una cápsula Sartobran ® P (tamaño de poro 0,45 μm) para retirar el SDS precipitado. La fuerza de proteína determinada mediante UV a 280 nm fue 1,02 mg/ml. El rendimiento de la proteína fue 406 mg u 85%.

El material tratado con 400 ml de clorhidrato de guanidina se concentró usando un sistema de diafiltración Millipore ® LabScale ® TFF (Millipore, Inc.) con dos membranas de polisulfona de 10 kD de 0,1 cm² Pellicon ® XL Biomax ® (Millipore, Inc.). El volumen después de la etapa de fuerza fue 37 ml con una fuerza de proteína de 10,3 mg/ml para un rendimiento post-fuerza de 381 mg o 93%.

Usando una pipeta de transferencia se añadieron gradualmente 10 ml (103 mg) de la solución concentrada de clorhidrato de guanidina/proteína a 590 ml de glicina 5 mM, solución a pH 3,2. El tampón se agitó rápidamente usando una barra de agitación magnética; la solución de proteína se añadió directamente al vórtice. Esta dilución 60X de la solución de clorhidrato de guanidina 6 M/proteína produjo una solución de clorhidrato de guanidina 0,1 M/proteína a 0,17 mg/ml. Estos 600 ml se transfirieron a una unidad de diafiltración a escala de 500 ml provista de dos membranas de polisulfona de 0,1 m² de 10 kD Pellicon ® II. Esta solución se concentró inicialmente a ~400 ml hasta una fuerza de proteína de 0,23 mg/ml y se diafiltró posteriormente frente a 9 cambios de volumen (3,6 l) de glicina 5 mM a pH 3,2. El diafiltrado final (402 ml) se midió mediante UV a 280 nm para una fuerza de proteína final de 0,23 mg/ml con un rendimiento de 92,46 mg o 90% para la etapa de diafiltración y un rendimiento global de 72% de proteína soluble para el procedimiento de purificación.

Ejemplo 9 - Estabilidad de Formulaciones Líquidas de IFN-β-1b Exentas de HSA que Contienen Manitol como Agente de Tonificación

En este experimento, se examinaron formulaciones líquidas que contenían ácido aspártico 5 mM y manitol al 5% en condiciones de almacenamiento en tiempo real de 5 °C. Se prepararon tres preparaciones independientes (denominadas Prep A, Prep B y Prep C en las figuras) a partir de un único lote de IFN-β-1b exento de HSA y se

cargaron en viales. Los viales se almacenaron a 5 °C y durante 6 meses se midió la estabilidad de las formulaciones. Los resultados de las mediciones de fuerza y análisis de HPLC de fase inversa (RP-HPLC) se muestran en las Figuras 22 y 23, respectivamente. Los resultados demuestran que, en estas formulaciones de IFN- β -1b, no se producen cambios detectables durante los 6 meses del estudio.

- 5 Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la divulgación son indicativas del nivel de los expertos en la disciplina a la que pertenece esta invención. Los subtítulos del documento se incluyen únicamente para una revisión sencilla del documento y no pretenden limitar, de ninguna manera, el contenido del documento.
- 10 Aunque la presente invención se ha descrito detalladamente de manera ilustrativa y ejemplarizante con fines para la clara comprensión de la misma, resultará evidente que pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica estable sin HSA que comprende interferón – beta (IFN – β) sustancialmente monomérico solubilizado en una formulación de baja fuerza iónica, en la que dicha formulación de baja fuerza iónica es una solución que comprende un tampón en cantidad suficiente para mantener el pH de dicha composición superior o inferior en 0,5 unidades a un pH especificado, en el que el pH especificado es 3,0 o 5,0, dicha formulación tiene una fuerza iónica que no supera los 60 mM e incluye manitol a una concentración del 4 % al 6 % en peso por volumen.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el IFN – β se une covalentemente a polietilenglicol.
3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho tampón se presenta a una concentración de (i) 1 mM a 30 mM; (ii) 1 mM a 10 mM; (iii) 2 mM a 7 mM; (iv) 2 mM a 5 mM; o (v) 5 mM.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tampón se selecciona del grupo formado por: glicina, ácido aspártico, succinato sódico, citrato, formato, acetato, ácido glutámico, histidina, imidazol y fosfato.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el pH especificado es de: (i) 3,0 a 4,5; (ii) 3,0 a 4,0; (iii) 3,5 a 4,0; o (iv) 4,0.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el manitol se encuentra a una concentración del 5 % en peso por volumen.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es una solución acuosa o una suspensión acuosa.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulación no tiene especies iónicas adicionales.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición incluye un surfactante no iónico; por ejemplo, en el que el surfactante no iónico es: un éster polioxietileno - sorbitol, como polisorbato 80 o polisorbato 20; o un éster polioxipropileno – polioxietileno, como Pluronic F68 o Pluronic F127; o un alcohol polioxietileno.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho IFN – β es el polipéptido con la secuencia aminoácida de IFN – β nativo maduro.
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el IFN – β está glucosilado o no glucosilado.
12. La composición de la reivindicación 11, en la que dicho IFN – β es IFN – β humano no glucosilado (hIFN – β) o una muteína biológicamente activa del mismo.
13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el IFN – β está presente a una concentración de (i) 0,01 mg / ml a 20,0 mg / ml; (ii) 0,015 mg / ml a 12,5 mg / ml; (iii) 0,025 mg / ml a 10,0 mg / ml; (iv) 0,05 mg / ml a 8,0 mg / ml; (v) 0,075 mg / ml a 6,0 mg / ml; o (vi) 0,1 mg / ml a 4,0 mg / ml.
14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su administración por vía oral, nasal, pulmonar o parenteral; por ejemplo, para su administración transdérmica, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial o intraperitoneal.
15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se conserva en una jeringa precargada lista para utilizar.
16. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su utilización en el tratamiento de la esclerosis múltiple.
17. Un método de preparación de una composición farmacéutica sin HSA que comprende interferón beta sustancialmente monomérico (IFN – β), dicho método comprende preparar dicha composición con una formulación de baja fuerza iónica, en la que dicha formulación de baja fuerza iónica es una solución que comprende manitol a una concentración del 4 % al 6 % en peso por volumen y un tampón en una cantidad suficiente para mantener el pH de dicha composición superior o inferior en 0,5 unidades en un pH especificado, en el que el pH especificado es de 3,0 a 5,0, dicha formulación tiene una fuerza iónica no superior a 60 mM e incorporar dicho IFN – β a dicha composición.

18. El método de la reivindicación 17, en el que dicho tampón se encuentra a una concentración de (i) 1 mM a 30 mM; o (ii) 2 mM a 5 mM.

Solubilidad de IFN-Beta-1b en
soluciones de cloruro sódico

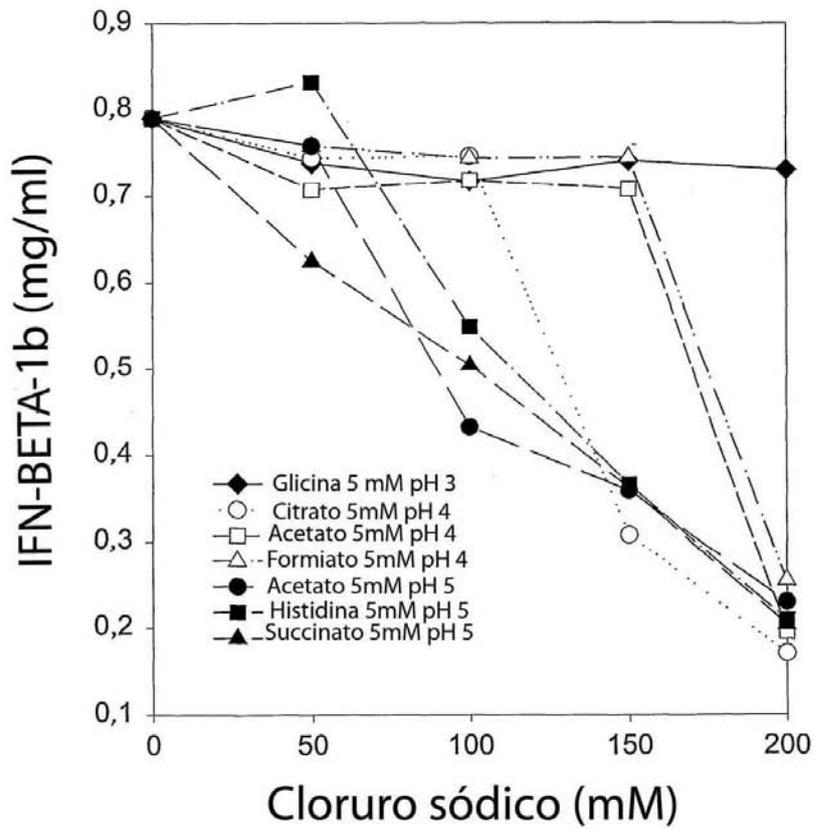


Figura 1

Solubilidad de IFN-Beta-1b en
formulaciones de concentración
iónica baja

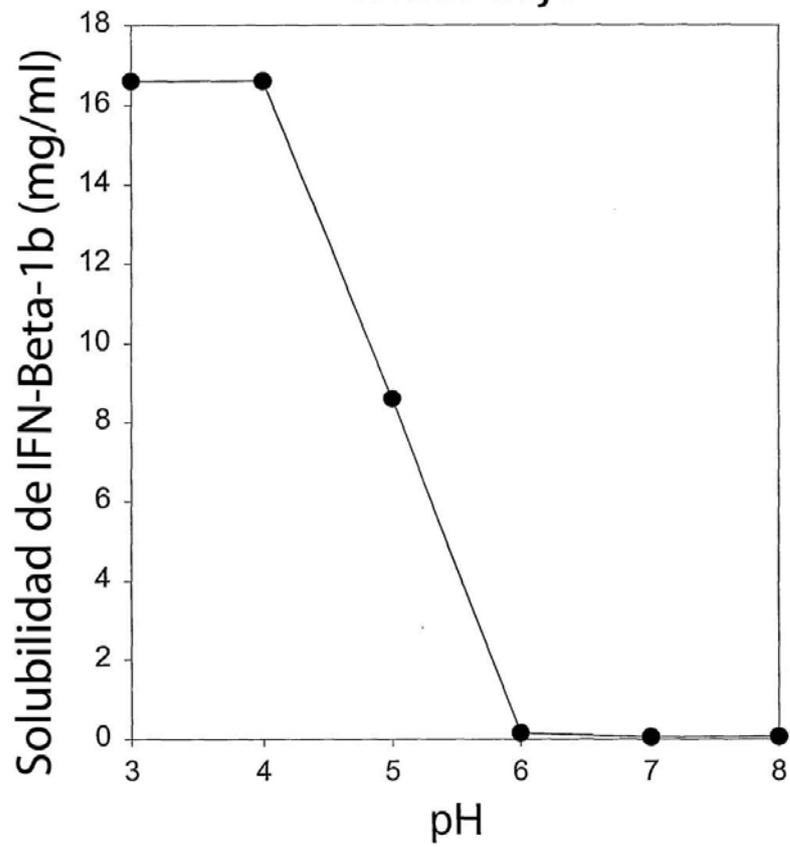


Figura 2

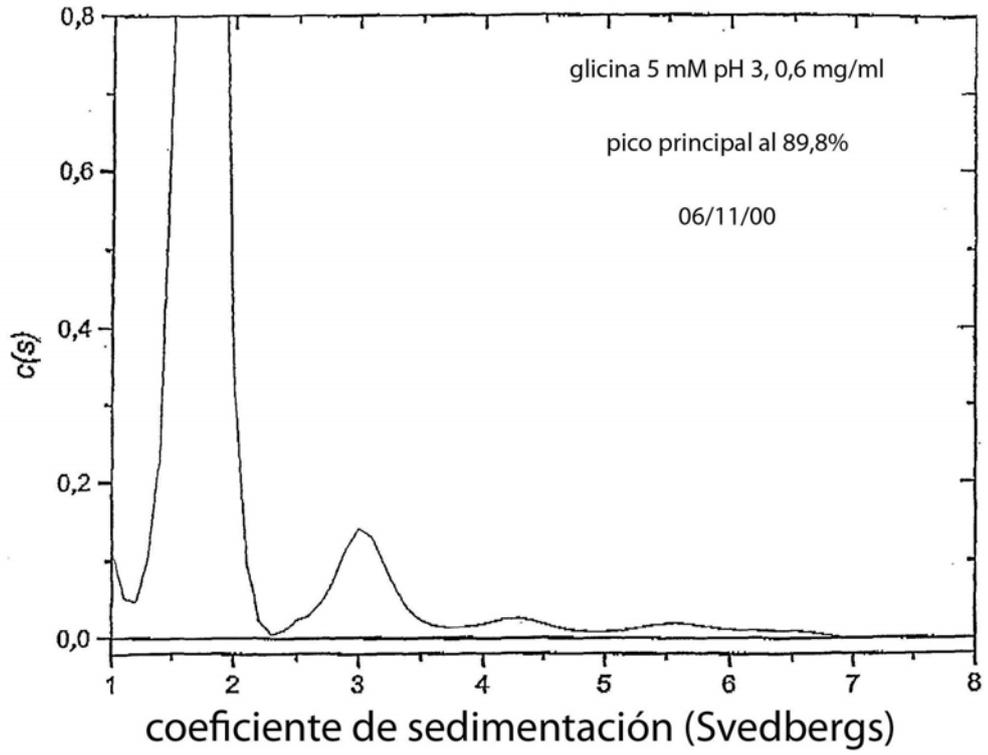


Figura 3

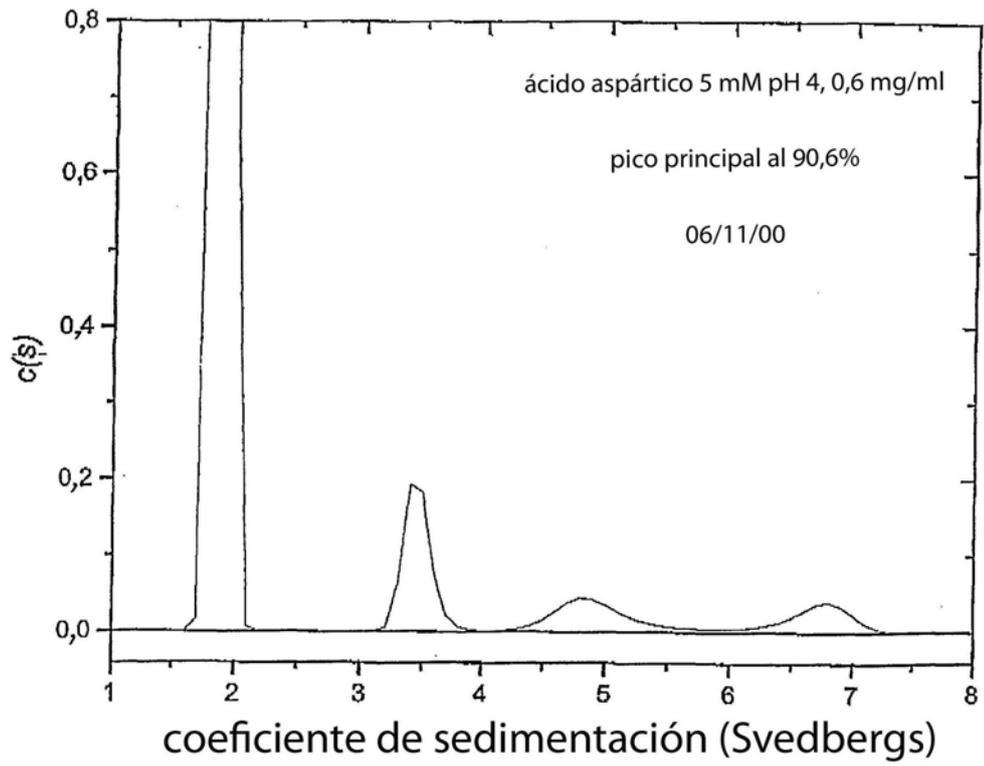


Figura 4

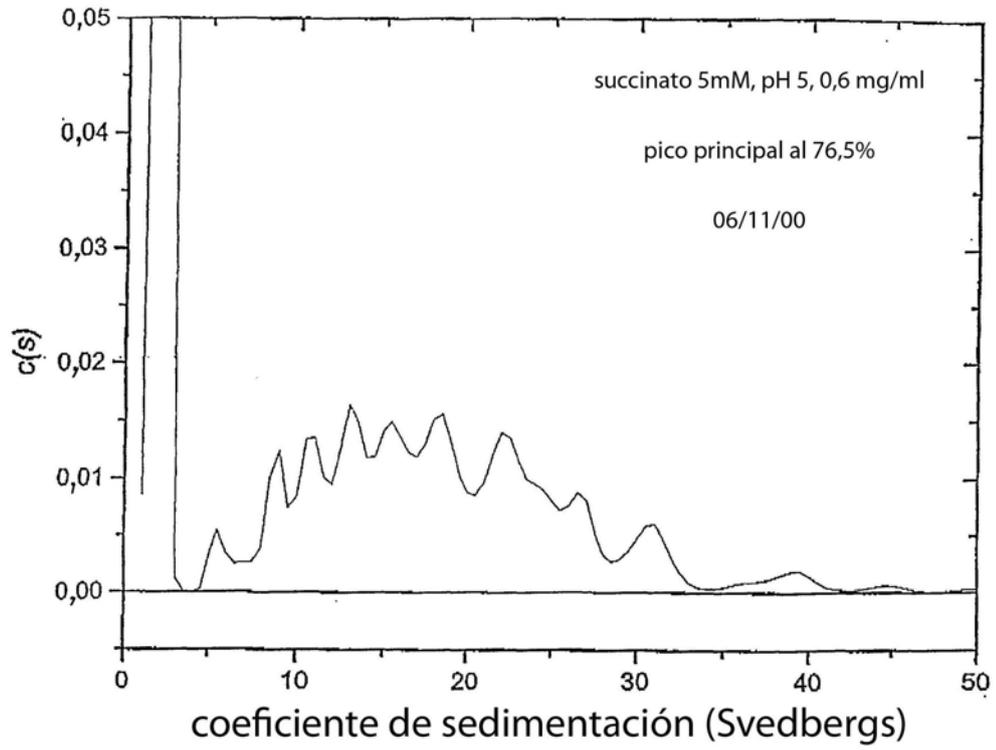


Figura 5

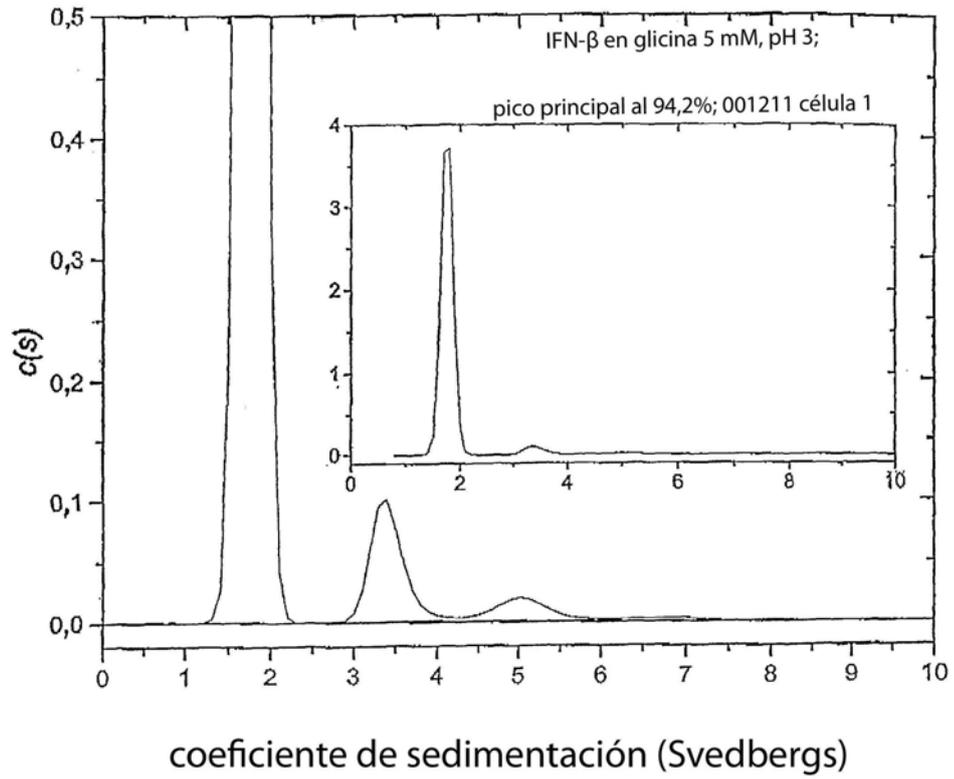


Figura 6

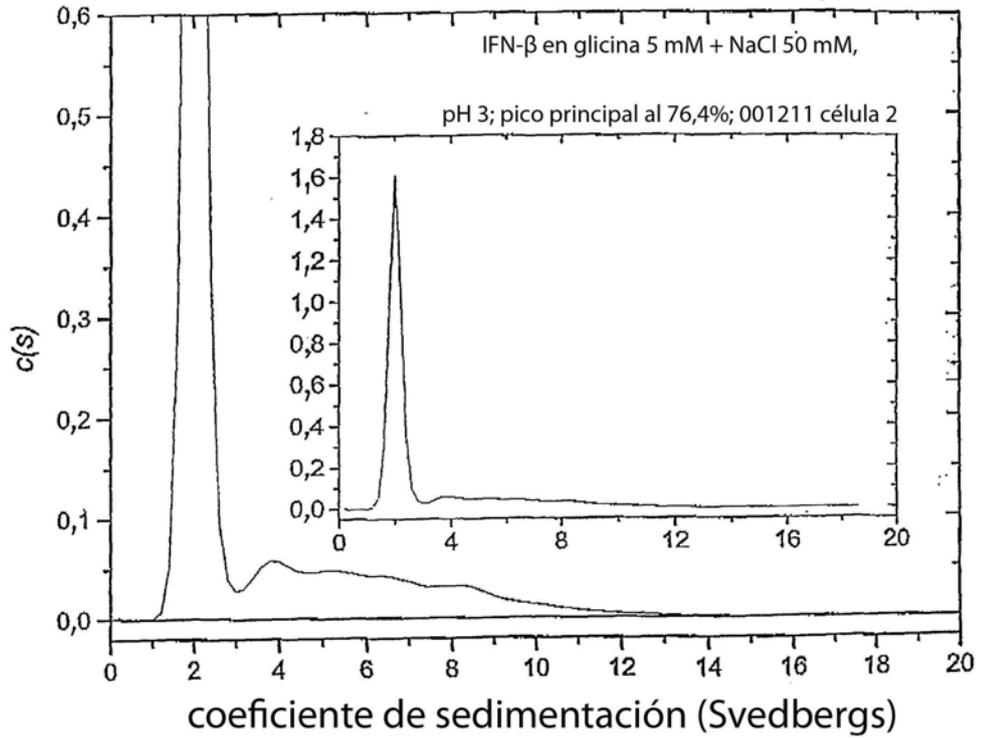


Figura 7

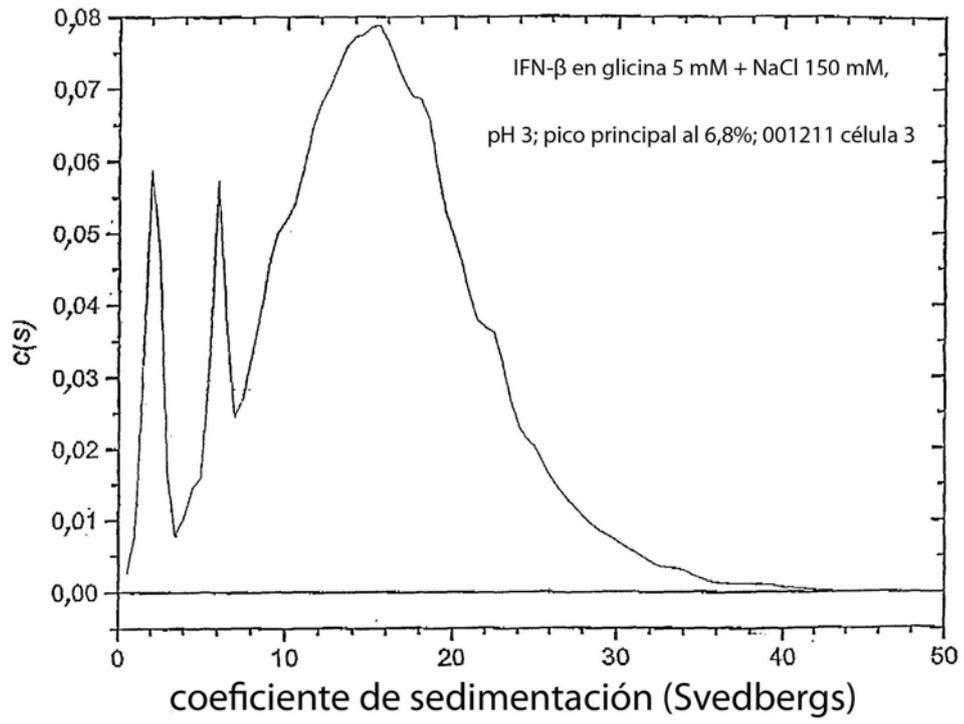


Figura 8

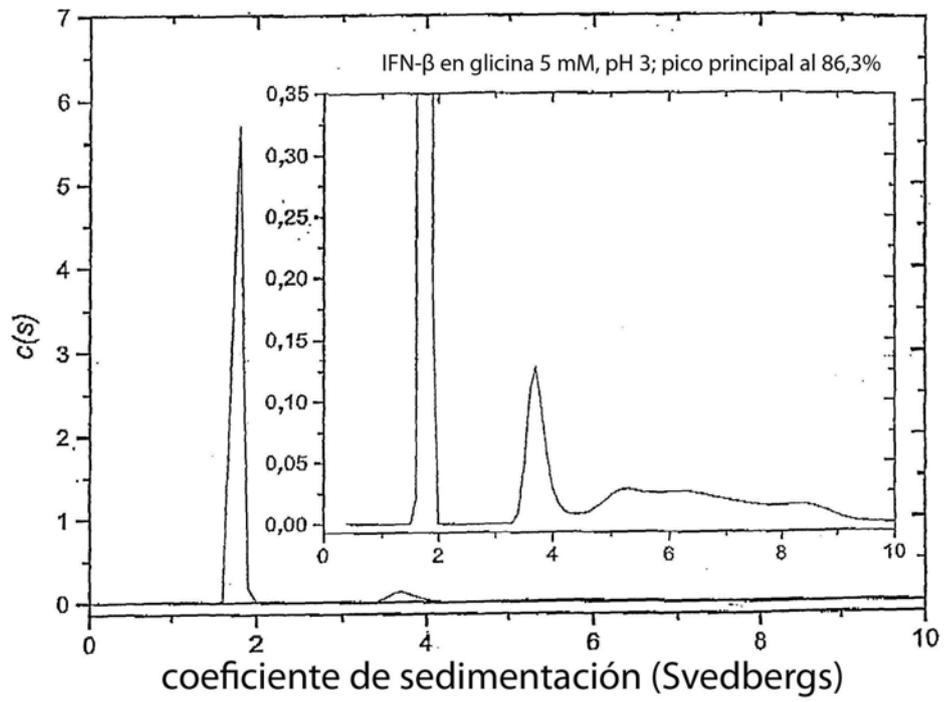


Figura 9

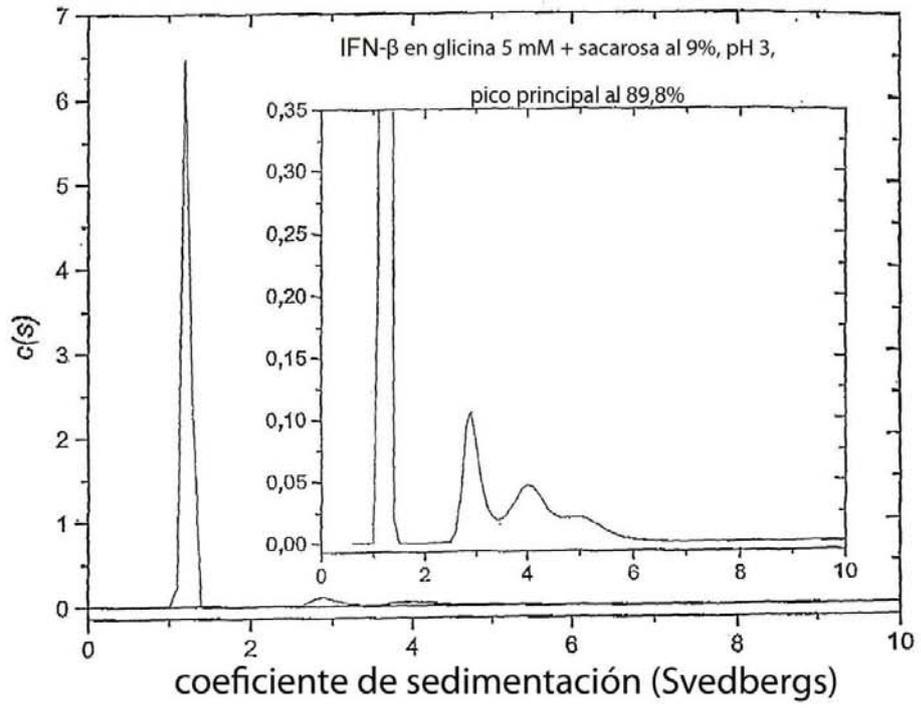


Figura 10

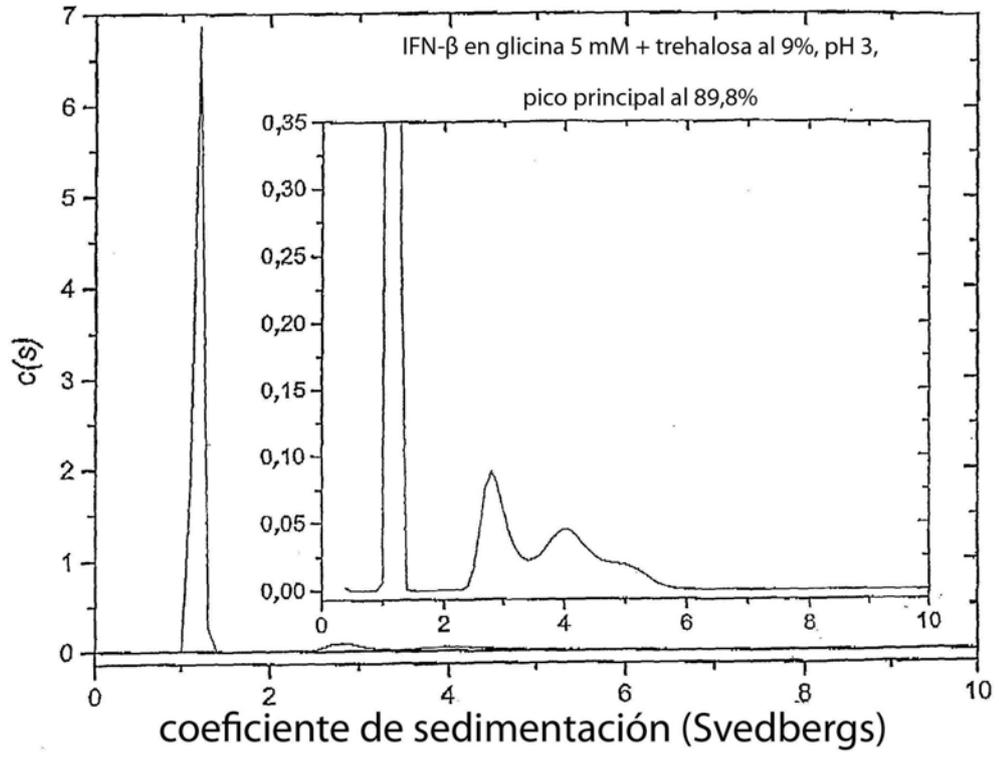


Figura11

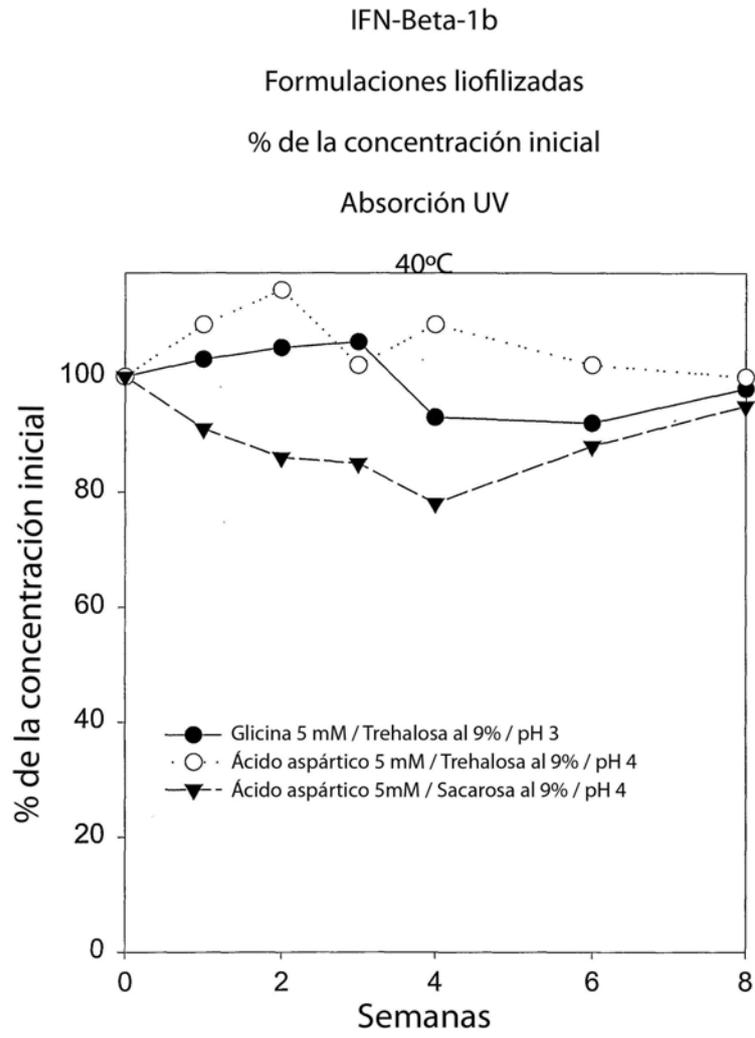


Figura 12

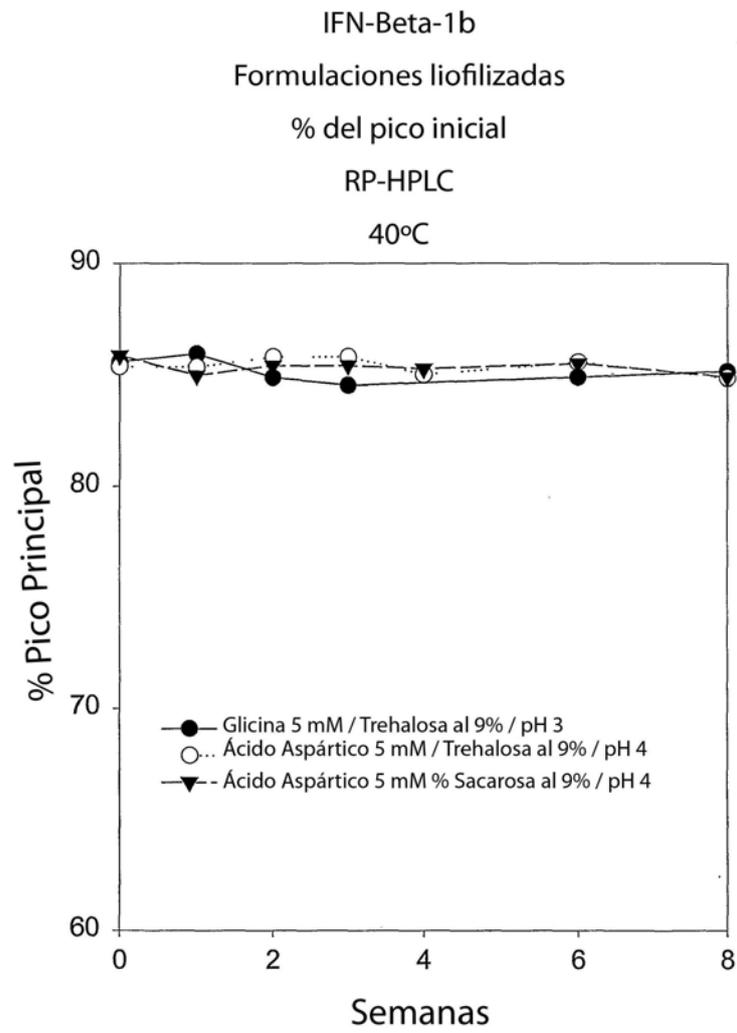


Figura 13

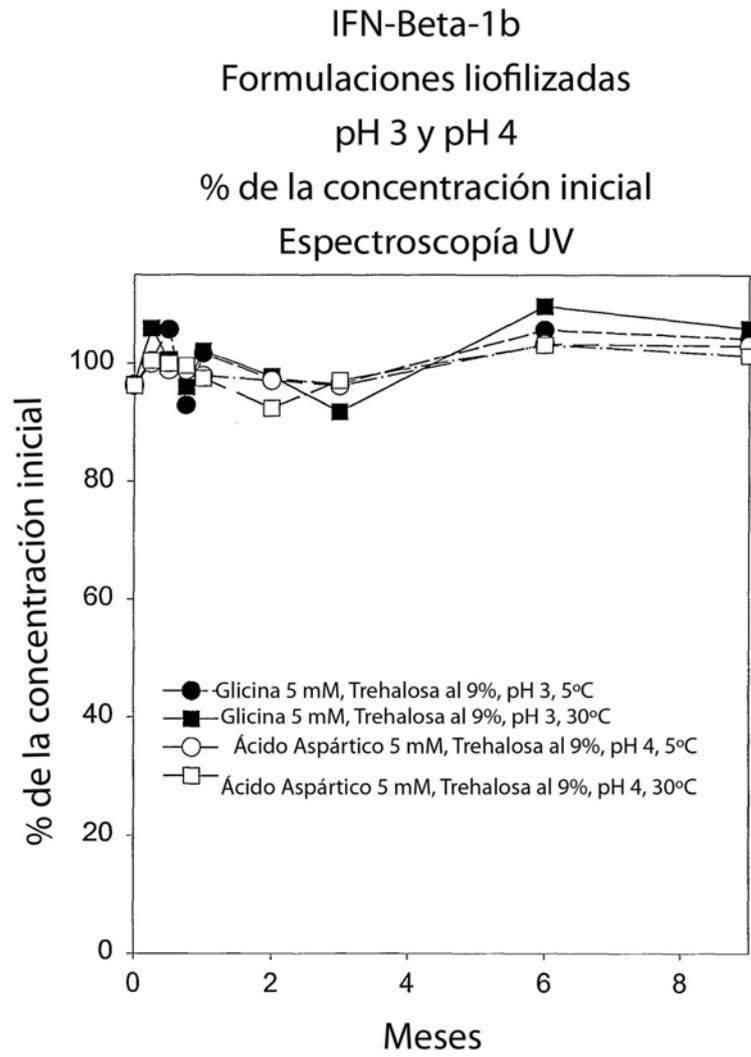


Figura 14

IFN-Beta-1b
Formulaciones liofilizadas
pH 3 y pH 4
% pico principal
RP-HPLC

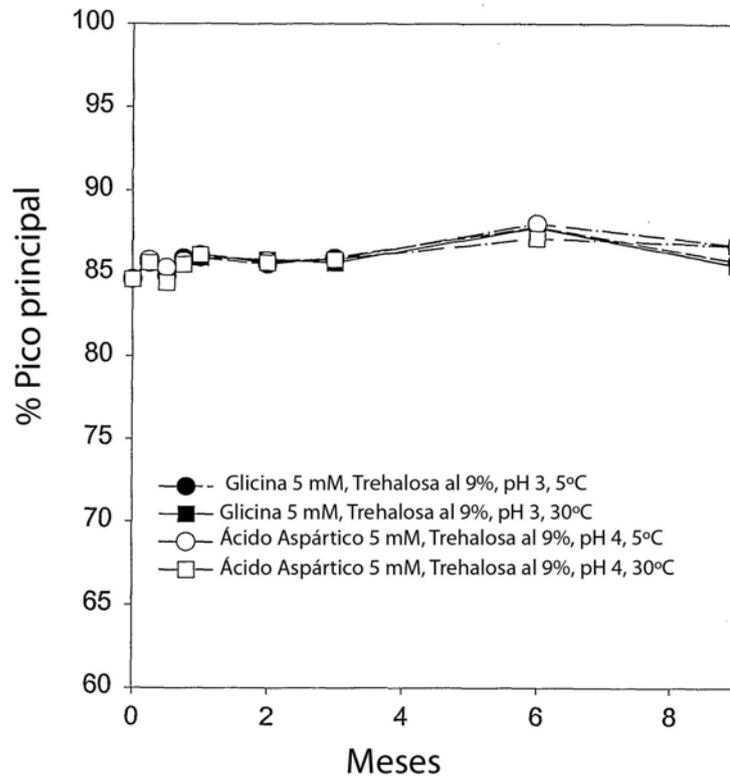


Figura 15

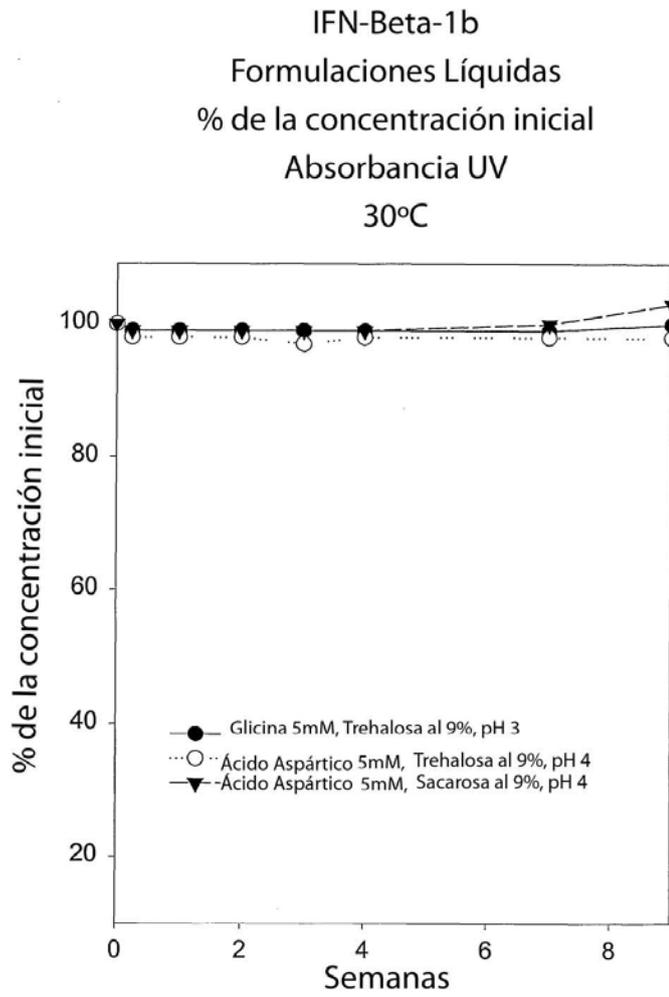


Figura 16

IFN-Beta-1b
Formulaciones líquidas
% del pico principal
RP-HPLC
30°C

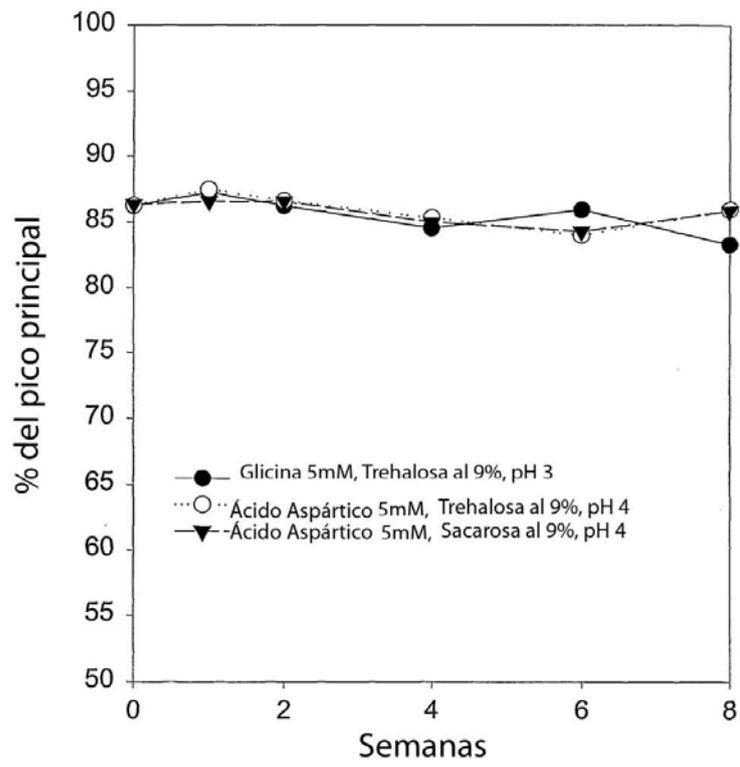


Figura 17

IFN-Beta-1b
Formulaciones líquidas en viales
% de la concentración inicial
Espectroscopía UV
5°C

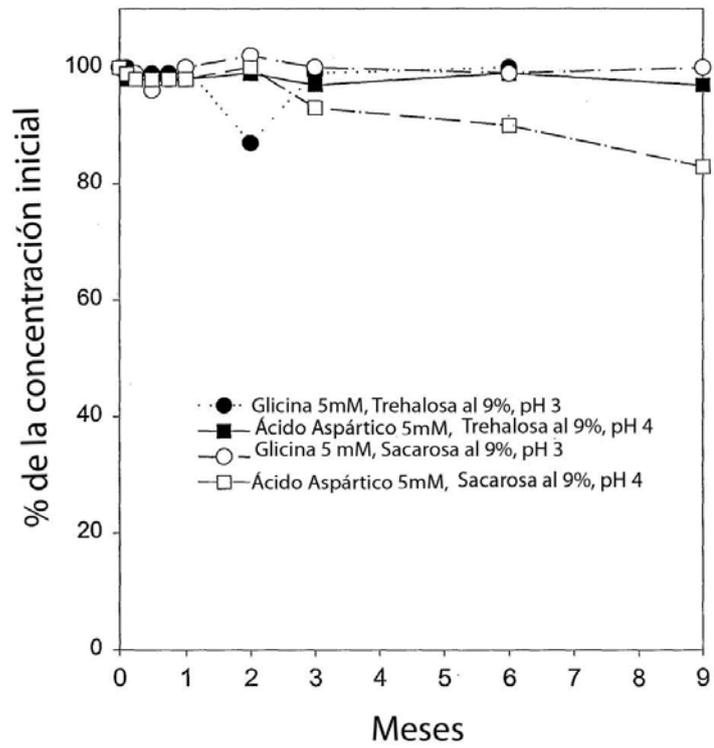


Figura 18

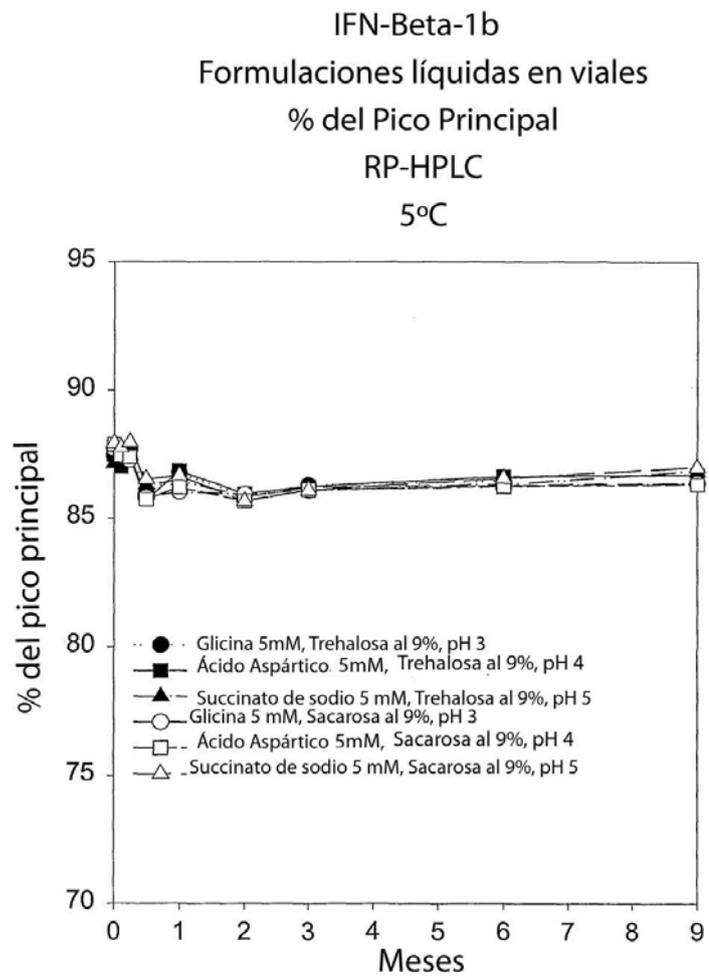


Figura 19

IFN-Beta-1b
 Formulaciones líquidas
 que contienen trehalosa o sacarosa
 % de la concentración inicial
 Espectroscopía UV
 30°C

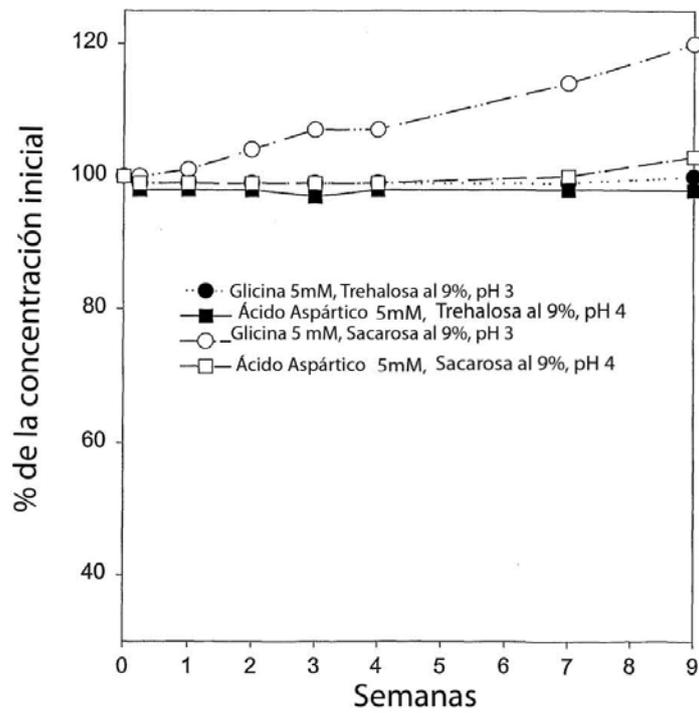


Figura 20

IFN- β -1b
 Formulaciones liofilizadas
 % de la concentración inicial
 Contienen Trehalosa o sacarosa
 pH 3 y pH 4
 40°C

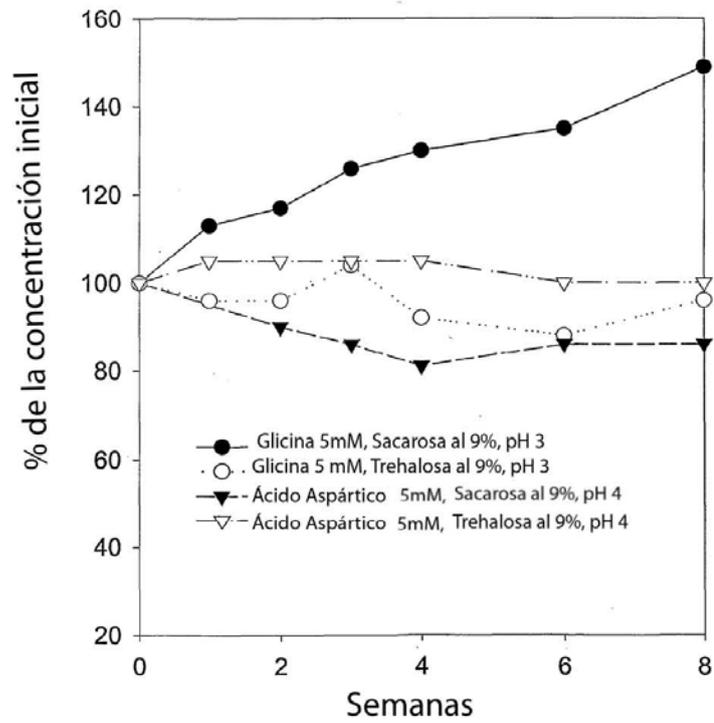


Figura 21

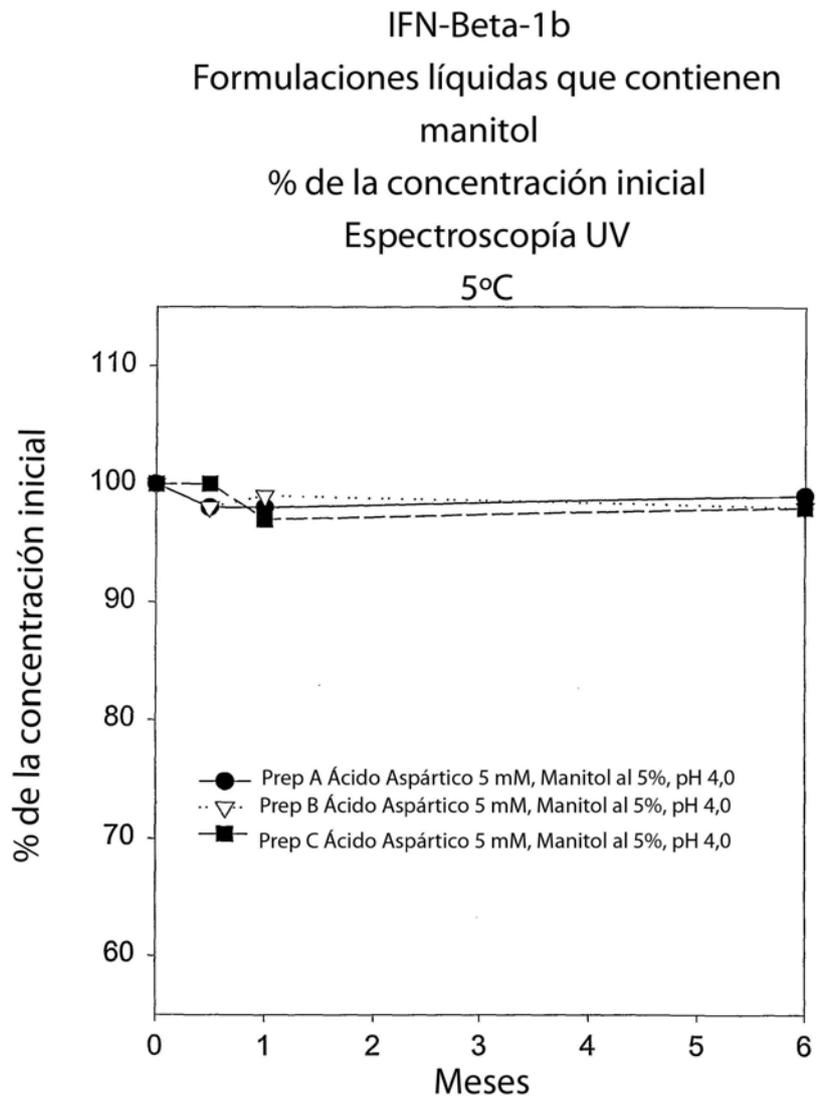


Figura 22

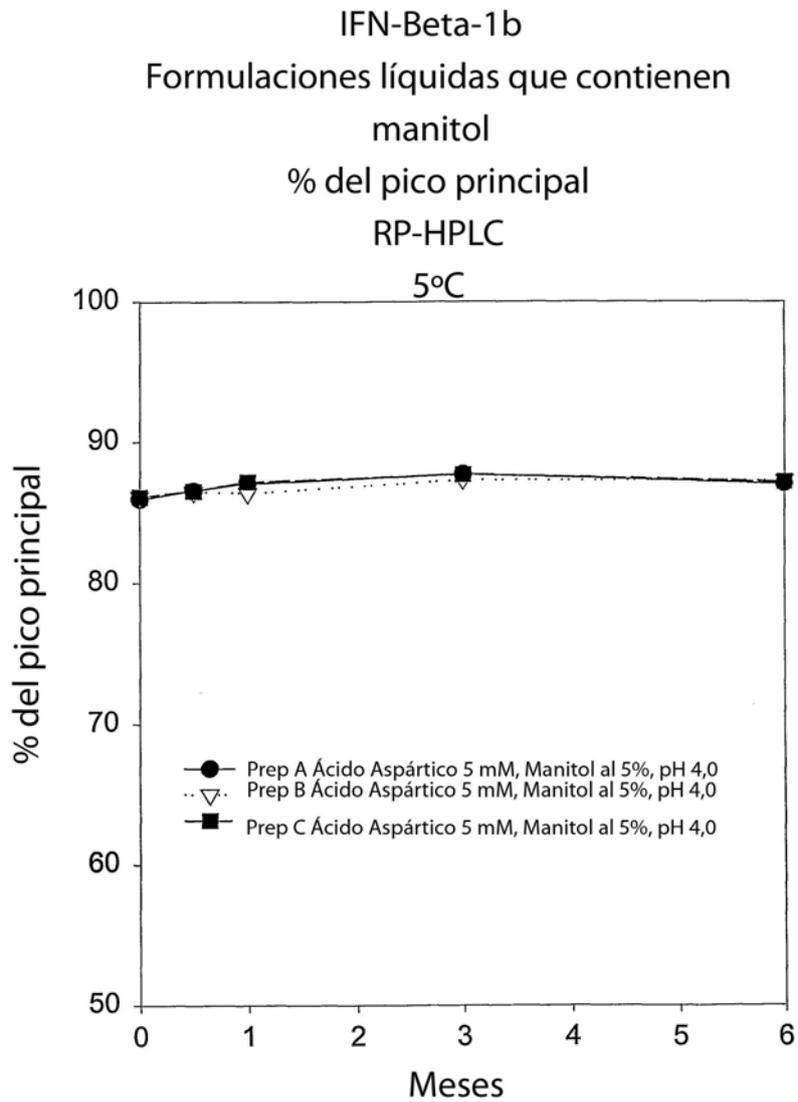


Figura 23