

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 737**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2012 E 12721844 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2709595**

54 Título: **Composiciones de IFN-beta, métodos de preparación y usos de las mismas**

30 Prioridad:

20.05.2011 EP 11305617

20.05.2011 US 201161488544 P

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

16.03.2016

73 Titular/es:

**ARES TRADING S.A. (100.0%)
Zone Industrielle de l'Ouriettaz
1170 Aubonne, CH**

72 Inventor/es:

**LEBLANC, DANIEL;
LAMME, EVERT NICOLAAS;
BALDASCINI, HELEN GABRIELA;
RICHARD, JOEL;
CHÉCOT, FRÉDÉRIC;
CHAN, YOU-PING;
KRAVTZOFF, ROGER y
POULIQUEN, GAUTHIER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 563 737 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

Composiciones de IFN-beta, métodos de preparación y usos de las mismas

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a composiciones de interferón beta (IFN-beta), a sus métodos de preparación y a la aplicación de estos para obtener composiciones terapéuticas en forma de unidad de dosificación que suministren IFN-beta durante un periodo de tiempo prolongado.

Antecedentes de interferones y su estabilización

10 Los interferones son citocinas, es decir, proteínas solubles que transmiten mensajes entre las células y desempeñan un papel esencial en el sistema inmunitario al ayudar a destruir microorganismos que causan infecciones y reparar cualquier daño resultante. Los interferones se secretan naturalmente por células infectadas y se identificaron por primera vez en 1957. Su nombre deriva del hecho de que "interfieren" con la replicación y producción víricas.

15 Los interferones exhiben actividad tanto antivírica como antiproliferativa. En base a las propiedades bioquímicas e inmunológicas, los interferones humanos de origen natural se agrupan en tres clases principales: interferón alfa, interferón beta e interferón gamma. Además, los interferones (IFN) son glucoproteínas producidas por el cuerpo en respuesta a una infección vírica. Inhiben la multiplicación de virus en células protegidas. Los IFN, que consisten en una proteína de bajo peso molecular, son notablemente no específicos en su acción, es decir, el IFN inducido por un virus es eficaz contra un amplio intervalo de otros virus. Son, sin embargo, específicos de especie, es decir, el IFN producido por una especie estimulará solo la actividad antivírica en células de la misma o una especie estrechamente relacionada. Los IFN fueron el primer grupo de citocinas que se explotaron por sus potenciales actividades antitumorales y antivíricas.

20

25 Los tres IFN principales se denominan IFN- α , IFN- β e IFN- γ . Dichos tipos principales de IFN se clasificaron inicialmente según sus células de origen (leucocitos, fibroblastos o linfocitos T). Sin embargo, resultó evidente que varios tipos podrían ser producidos por una célula. De ahí que el IFN de leucocitos se llame ahora IFN- α , el IFN de fibroblastos es IFN- β y el IFN de linfocitos T es IFN- γ . Hay también un cuarto tipo de IFN, el IFN de linfoblastoides, producido en la estirpe celular "Namalwa" (derivada de linfoma de Burkitt), que parece que produce una mezcla de ambos IFN de leucocitos y fibroblastos.

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

30 El interferón de fibroblastos humanos (IFN- β o IFN-beta) tiene actividad antivírica y puede estimular también los linfocitos citotóxicos naturales contra células neoplásicas. Es un polipéptido de aproximadamente 20.000 Da inducido por virus y ARN bicatenarios. A partir de la secuencia nucleotídica del gen del interferón de fibroblastos, clonado por tecnología de ADN recombinante, (Derynk *et al.*, 1980) dedujeron la secuencia aminoacídica completa de la proteína. Es de 166 aminoácidos de largo.

Shepard *et al.* 1981 describieron una mutación en la base 842 (Cys \rightarrow Tyr en la posición 141) que anulaba su actividad antivírica, y una variante del clon con una delección de los nucleótidos 1119-1121.

35 Mark *et al.* 1984 insertaron una mutación artificial sustituyendo la base 469 (T) por (A), causando un cambio de aminoácidos de Cys \rightarrow Ser en la posición 17. Se ha reseñado que el IFN-beta resultante era tan activo como el IFN-beta 'nativo' y estable durante almacenamiento a largo plazo (-70 °C).

Rebif[®] (Merck Serono) es interferón beta-1a, producido por estirpes celulares de mamífero. Su denominación común internacional (DCI) recomendada es "interferón beta-1a".

40 La unidad de interferón o unidad internacional de interferón (U o UI) se define como la cantidad necesaria para proteger al 50 % de las células ante el daño vírico; el ensayo que puede usarse para medir la bioactividad es el ensayo de inhibición del efecto citopático, como se describió por primera vez por Rubinstein, *et al.*, 1981 y Familletti, P. C., *et al.*, 1981. En este ensayo antivírico de interferón, aproximadamente 1 unidad/ml de interferón es la concentración necesaria para producir una inhibición del efecto citopático del 50 %. Las unidades de IFN-beta se determinan con respecto al patrón de referencia internacional para Hu-IFN-beta proporcionado por los Institutos Nacionales de Salud (Pestka, S. 1986).

45

50 La unidad de interferón o unidad internacional de interferón (U o UI) se define como la cantidad necesaria para proteger al 50 % de las células ante el daño vírico; el ensayo que puede usarse para medir la bioactividad es el ensayo de inhibición del efecto citopático, como se describió por primera vez por Rubinstein, *et al.*, 1981 y Familletti, P. C., *et al.*, 1981. En este ensayo antivírico de interferón, aproximadamente 1 unidad/ml de interferón es la concentración necesaria para producir un efecto citopático del 50 %. Las unidades de IFN-beta se determinan con respecto al patrón de referencia internacional para Hu-IFN-beta proporcionado por los Institutos Nacionales de Salud (Pestka, S. 1986).

Como con todos los productos farmacéuticos basados en proteínas, es un obstáculo importante que debe superarse en el uso de IFN-beta como agente terapéutico la pérdida de utilidad farmacéutica que puede ser el resultado de su inestabilidad en composiciones farmacéuticas.

5 Las inestabilidades físicas que amenazan la actividad y eficacia proteicas en las composiciones farmacéuticas incluyen la desnaturalización y formación de agregados solubles e insolubles, mientras que las inestabilidades químicas incluyen hidrólisis, formación de imida, oxidación, racemización y desamidación. Algunos de estos cambios son conocidos por conducir a la pérdida o reducción de la actividad farmacéutica de la proteína de interés. En otros casos, los efectos precisos de estos cambios son desconocidos, pero los productos degradativos resultantes siguen siendo considerados farmacéuticamente inaceptables debido al potencial de efectos secundarios indeseables.

10 La estabilización de proteínas en composiciones farmacéuticas sigue siendo un campo en que el ensayo y error desempeña el 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 las composiciones farmacéuticas proteicas 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.

15 Existe la necesidad de composiciones farmacéuticas de IFN-beta mejoradas que comprendan estabilizantes fisiológicamente compatibles que mejoren la solubilidad de esta proteína y estabilicen la proteína ante la formación de agregados, potenciando así su utilidad farmacéutica.

A pesar de los importantes esfuerzos que se han aplicado al problema, no se han producido todavía composiciones farmacéuticas de IFN-beta completamente satisfactorias.

20 Se han descubierto ahora formas de unidad de dosificación terapéutica que son fáciles de preparar, proporcionan una liberación prolongada de IFN-beta y están disponibles en forma sólida o líquida.

La invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición de liberación prolongada de interferón beta adecuada para administración una vez por semana.

25 Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición de liberación prolongada de IFN-beta que libere un 60 % del IFN-beta durante más de 120 min, preferiblemente más de 180 min, usando una prueba *in vitro* T1 o un 60 % del IFN-beta durante más de 60 min, preferiblemente más de 90 min, usando una prueba *in vitro* T2, descritas a continuación.

30 Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición sólida que sea estable frente a la agregación de IFN-beta, como que el porcentaje de agregados sea menor del 20 %, preferiblemente menor del 10 % y más preferiblemente menor del 5 % de la cantidad total de IFN-beta después de 2 años de almacenamiento a 5 °C y después de 6 meses a 25 °C.

35 Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición líquida lista para inyectar que tenga una viscosidad menor de 1.000 mPa.s, medida a 20 °C y con un índice de cizallamiento de 10 s^{-1} , usando un reómetro AR1000 (TA Instruments) o un aparato equivalente con una geometría de cono-placa y un cono de 4 cm y un ángulo de 2°.

Se ha observado sorprendente e inesperadamente que la combinación de IFN-beta con polímeros de poli(ácido glutámico) injertados específicos permite proporcionar composiciones de liberación prolongada de IFN-beta fáciles de inyectar con estabilidad mejorada, evidenciada por la baja cantidad de agregados formados.

40 La presente invención se refiere por tanto a una composición farmacéutica sólida que comprende:

- interferón beta (IFN-beta) y
- un polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un peso molecular medio entre 26.000 y 40.000 g/mol, en particular entre 28.000 y 38.000 g/mol, y más particularmente de aproximadamente 33.000 g/mol, injertado con sustituyentes de alfa-tocoferol, siendo la relación de injerto molar media de 4,5-5,5 % en moles, en la que la relación en peso/peso entre dicho polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta está entre 24 y 125.

La presente invención se refiere adicionalmente a una composición líquida acuosa que comprende:

- IFN-beta y
- un polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un peso molecular medio entre 26.000 y 40.000 g/mol, en particular entre 28.000 y 38.000 g/mol, y más particularmente de aproximadamente 33.000 g/mol, injertado con sustituyentes de alfa-tocoferol, siendo la relación de injerto molar media de 4,5-5,5 % en moles, en la que la relación en peso/peso entre dicho polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta está entre 24 y 125.

La presente invención se refiere también a un método para preparar una composición sólida que comprende IFN-beta y un polímero de poli(ácido glutámico) injertado según la invención.

5 La invención se refiere también a las composiciones líquidas o sólidas anteriores para uso en un método para el tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal, particularmente para uso en un método de tratamiento terapéutico de enfermedades autoinmunitarias crónicas del sistema nervioso central o de enfermedades neurodegenerativas, particularmente de esclerosis múltiple o de síndrome clínico aislado.

La invención se refiere también al uso de composiciones para la fabricación de un fármaco para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias del sistema nervioso central o de enfermedades neurodegenerativas, particularmente de esclerosis múltiple o síndrome clínico aislado.

10 Definición del término interferón beta

La expresión "interferón-beta (IFN-beta o IFN-β)", como se usa en la presente memoria, pretende incluir el interferón de fibroblastos, en particular de origen humano, obtenido mediante aislamiento a partir de fluidos biológicos u obtenido mediante técnicas de ADN recombinante a partir de células hospedadoras procarióticas o eucarióticas, así como sus muteínas, sales, derivados funcionales, variantes, análogos y fragmentos activos.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "muteínas" hace referencia a análogos de IFN-beta en que uno o más residuos aminoacídicos de un IFN-beta natural se reemplazan por diferentes residuos aminoacídicos, o se eliminan, o se añaden uno o más residuos aminoacídicos a la secuencia natural de IFN-beta, sin cambiar sustancialmente la actividad de los productos resultantes en comparación con el IFN-beta de tipo silvestre. Estas muteínas se preparan mediante síntesis conocidas y/o mediante técnicas de mutagénesis dirigida a sitio, o mediante
20 cualquier otra técnica conocida adecuada para ello. Las muteínas preferidas incluyen, p.ej., aquellas descritas por Shepard *et al.* (1981) o Mark *et al.* (1984).

Cualquiera de dichas muteínas tiene preferiblemente una secuencia aminoacídica suficientemente similar a la secuencia de IFN-beta para tener una actividad sustancialmente similar o incluso mejor que el IFN-beta. La función biológica del interferón es bien conocida para el experto en la técnica, y están establecidos y disponibles patrones biológicos, p.ej., en el Instituto Nacional de Patrones y Controles Biológicos (<http://immunology.org/links/NIBSC>).
25

Se han descrito bioensayos para la determinación de la actividad de IFN. Un ensayo de IFN puede llevarse a cabo, por ejemplo, como se describe por Rubinstein *et al.*, 1981. Por tanto, puede determinarse si cualquier muteína dada tiene una actividad sustancialmente similar, o incluso mejor, que el IFN mediante experimentación rutinaria.

30 Las muteínas de IFN-beta que pueden usarse de acuerdo con la presente invención, o ácido nucleico que codifica las mismas, incluyen una serie finita de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que un experto en la técnica puede obtener rutinariamente, sin experimentación indebida, sobre la base de las enseñanzas y la guía presentadas en la presente memoria.

Los cambios preferidos para muteínas de acuerdo con la presente invención se denominan así sustituciones "conservativas". Las sustituciones conservativas de aminoácidos de polipéptidos o proteínas de la invención pueden
35 incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares para que la sustitución entre miembros del grupo conserve la función biológica de la molécula. Está claro que también pueden realizarse inserciones y deleciones de aminoácidos en las secuencias definidas anteriormente sin alterar su función, en particular si las inserciones o deleciones implican solo unos pocos aminoácidos, p.ej., menos de treinta, y preferiblemente menos de diez, y no eliminan o desplazan a los aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, p.ej., los residuos de cisteína. Las proteínas y las muteínas producidas mediante dichas deleciones y/o inserciones entran dentro del ámbito de la presente invención.
40

Preferiblemente, son grupos de aminoácidos sinónimos aquellos definidos en la Tabla I a continuación. Más preferiblemente, son grupos de aminoácidos sinónimos aquellos definidos en la Tabla II, y lo más preferiblemente son grupos de aminoácidos sinónimos aquellos definidos en la Tabla III.

45 TABLA I

Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos	
Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His

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

TABLA II

Grupos de aminoácidos sinónimos más preferidos	
Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro

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

TABLA III

Grupos de los aminoácidos sinónimos más preferidos	
Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala

Grupos de los aminoácidos sinónimos más preferidos	
Aminoácido	Grupo sinónimo
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

5 Los ejemplos de producción de sustituciones aminoacídicas en proteínas que pueden usarse para obtener muteínas de IFN-beta para usar en la presente invención incluyen cualquiera de las etapas de los métodos conocidos, tales como se presentan en las patentes de EE.UU. 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, de Mark *et al.*; 5.116.943 de Kothe *et al.*; 4.965.195 de Namen *et al.*; 4.879.111 de Chong *et al.*; y 5.017.691 de Lee *et al.*; y las proteínas sustituidas con lisina, presentadas en la patente de EE.UU. n° 4.904.584 (Shaw *et al.*). Se han descrito muteínas específicas de IFN-beta, por ejemplo, por Mark *et al.*, 1984.

10 La expresión "proteína fusionada" hace referencia a un polipéptido que comprende un IFN-beta, o una muteína del mismo, fusionado con otra proteína que, p.ej., tiene un tiempo de residencia ampliado en fluidos corporales. Un IFN-beta puede condensarse por tanto con otra proteína, polipéptido o similar, p.ej., una inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

15 Los "derivados funcionales", como se usa en la presente memoria, abarcan los derivados de IFN-beta y sus muteínas y proteínas condensadas, que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales sobre los residuos o los grupos N- o C-terminales mediante medios conocidos en la materia, y se incluyen en la invención con la condición de que sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de IFN-beta, y que no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen. Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar los sitios antigénicos y ampliar la residencia de IFN-beta en fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo mediante una reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos amino libres de los residuos aminoacídicos formados con restos acilo (p.ej., grupos alcanóilo o aroílo carbocíclico) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de residuos de serilo o treonilo) formados con restos acilo.

5 Como "fracciones activas" de IFN-beta, o muteínas y proteínas fusionadas, la presente invención abarca cualquier fragmento o precursor de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína solo o junto con moléculas asociadas o residuos ligados al mismo, p.ej., residuos de azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o de los residuos de azúcar por sí mismos, a condición de que dicha fracción no tenga una actividad significativamente reducida en comparación con el correspondiente IFN-beta.

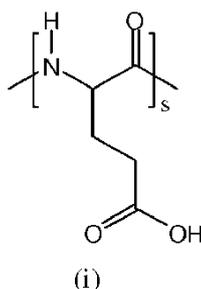
10 El término "sales" de IFN-beta en la presente memoria hace referencia a sales de grupos carboxilo y a sales de grupos amino de las proteínas descritas anteriormente o análogos de las mismas. Pueden formarse sales de un grupo carboxilo por medios conocidos en la materia e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc y similares, y sales con bases orgánicas como aquellas formadas, por ejemplo, con aminas tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de amina incluyen, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como, por ejemplo, sales de ácido clorhídrico o sales de ácido sulfúrico, y sales de ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, sales de ácido acético o sales de ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de dichas sales debe retener la actividad biológica de las proteínas (IFN-beta) relevantes para la presente invención, es decir, la capacidad de unirse al correspondiente receptor e iniciar la señalización de receptor.

15 De acuerdo con la presente invención, se prefiere particularmente el uso de IFN-beta humano recombinante como ingrediente activo de la invención.

De acuerdo con la presente solicitud, se prefiere particularmente el uso de interferón beta-1a.

Definición del polímero de poli(ácido glutámico) injertado

20 El polímero de poli(ácido glutámico) injertado según la invención tiene una cadena principal lineal, o esqueleto, consistente en unidades de ácido alfa-glutámico, correspondientes a la estructura (i) siguiente:



Puede tener configuración L, D o (D,L) racémica.

El polímero de poli(ácido glutámico) injertado según la invención porta grupos alfa-tocoferol ligados por un enlace éster a algunos de los grupos carboxílicos pendientes.

25 Según una realización particular, la distribución de las unidades de glutamato injertadas con alfa-tocoferol es de tipo aleatorio.

"Tipo aleatorio" significa que las unidades de glutámico injertadas con alfa-tocoferol se distribuyen desigualmente entre la cadena de poli(ácido glutámico).

30 A menos que se especifique otra cosa, el término "glutámico" hace referencia a "ácido glutámico" o "glutamato" a lo largo de la descripción.

Alfa-tocoferol puede ser D-alfa-tocoferol (forma natural), L-alfa-tocoferol o D,L-alfa-tocoferol (todo racémico, sintético).

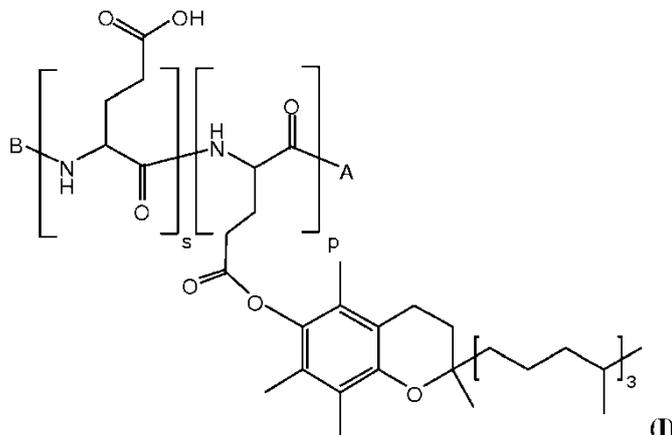
El alfa-tocoferol de la invención puede ser natural o sintético. Preferiblemente, el alfa-tocoferol usado en la invención es sintético.

35 Según una realización particularmente preferida, el polímero de poli(ácido glutámico) injertado no incluye otros injertos distintos de unidades de alfa-tocoferol.

40 En un medio acuoso, las funciones carboxílicas residuales (no injertadas) del polímero de poli(ácido glutámico) injertado son neutras (forma -COOH) o ionizadas (anión -COO⁻), dependiendo del pH y la composición. La neutralidad del polímero injertado requiere por tanto la presencia de un contraión, por ejemplo un catión monovalente inorgánico tal como sodio.

Por tanto, en disolución acuosa, típicamente a pH 6 a 8, el polímero injertado está principalmente en forma de poli(glutamato) injertado.

Los polímeros de poli(ácido glutámico) injertados de la invención tienen la fórmula (I) siguiente:



en la que

- A representa:
 - 5 – un grupo -NHR en el que R representa un hidrógeno, un grupo alquilo lineal C2 a C10, ramificado C3 a C6 o un grupo bencilo, o
 - una unidad aminoácida unida al extremo N;
- B representa un hidrógeno, un grupo acilo C2 a C6, un grupo acilo ramificado C3 a C10 o un piroglutamato;
- p corresponde al número medio de monómeros glutámicos portadores de un sustituyente de alfa-tocoferol;
- 10 ▪ s corresponde al número medio de monómeros glutámicos no injertados.

La relación de injerto se define como la relación molar media $p/(s+p)$ de sustituyentes de tocoferol a unidades de glutámico. La relación $p/(s+p)$ está entre 4,5 y 5,5 %, preferiblemente es de aproximadamente 5 %.

El grado medio de polimerización $GP = s+p$ está entre 180 y 250, preferiblemente entre 200 y 240, en particular es de aproximadamente 220.

- 15 Los polímeros de poli(ácido glutámico) injertados de la invención pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia. Pueden obtenerse usando al menos los métodos descritos en la solicitud de patente WO 03/104303, y en particular el método siguiente.

- 20 Los polímeros de poli(ácido alfa-glutámico) están comercialmente disponibles, tales como los comercializados por Sigma-Aldrich® con la ref. 386847. Pueden sintetizarse también mediante la polimerización de anhídridos de *N*-carboxiaminoácidos (NCA) descritos, por ejemplo, en el artículo "Biopolymers, 1976, 15, 1869" y en el libro de H. R. Kricheldorf "alpha-Aminoacid-N-carboxy Anhydride and related Heterocycles", Springer Verlag (1987). Puede hacerse referencia también a la patente FR 2.801.226.

- 25 El acoplamiento de alfa-tocoferol con algunas de las funciones carboxílicas del polímero de poli(ácido glutámico) se efectúa fácilmente haciendo reaccionar dicho polímero con alfa-tocoferol en presencia de un agente de acoplamiento y un catalizador en un disolvente adecuado tal como dimetilformamida (DMF), *N*-metilpirrolidona (NMP) o dimetilsulfóxido (DMSO). El grado de injerto se controla químicamente mediante la estequiometría de los constituyentes y reactivos o el tiempo de reacción.

Determinación de la masa, relación de injerto molar media y grado de polimerización del polímero de poli(ácido glutámico) injertado

- 30 Se define el peso molecular medio por M_p (peso molecular máximo), medido por cromatografía de exclusión por tamaño.

Para medir el peso molecular medio, se precipita la muestra polimérica por acidificación con ácido clorhídrico 0,1 N, se liofiliza y entonces se disuelve en NMP para análisis.

- 35 Se mide el peso molecular máximo medio absoluto mediante una cromatografía de exclusión por tamaño que comprende tres columnas secuenciales de poliestireno-co-divinilbenceno (5 $\mu\text{m}/100\,000\ \text{\AA}$, 5 $\mu\text{s}/10.000\ \text{\AA}$ y 5 $\mu\text{m}/1.000\ \text{\AA}$). Este dispositivo está conectado con un detector de dispersión de luz a 18 ángulos (p.ej. DAWN EOS - Wyatt Technology) y con un refractómetro diferencial (p.ej. OptiLab REX - Wyatt Technology).

La relación de injerto molar media de alfa-tocoferol en el polímero de poli(ácido glutámico) injertado corresponde a la diferencia entre la relación de alfa-tocoferol total medida y la relación de alfa-tocoferol libre medida. La relación de alfa-tocoferol total se determina por RMN-¹H, mientras que la relación de alfa-tocoferol libre se determina por HPLC.

5 Se efectúa la determinación de la relación de alfa-tocoferol total mediante RMN-¹H con un espectrofotómetro (Avance 300) equipado con una sonda de QNP. Se liofiliza la muestra polimérica y se disuelve entonces en ácido trifluoroacético deuterado para análisis.

Se consideran dos señales:

– el pico de aproximadamente 0,6 ppm corresponde a los protones de los cuatro grupos metilo de la cadena alifática de alfa-tocoferol (12 protones),

10 – el pico de aproximadamente 4,5-4,7 ppm corresponde al protón en posición α de la unidad de ácido glutámico.

Se integra cada señal y se calibra como 100 el valor integral correspondiente al protón en posición α de la unidad de ácido glutámico.

15 Se considera a A el valor integral obtenido para la señal correspondiente a los protones de los cuatro grupos metilo de la cadena alifática de alfa-tocoferol. La relación de alfa-tocoferol total se da entonces por la ecuación: % de alfa-tocoferol = A / 12.

20 Se efectúa la determinación de la relación de alfa-tocoferol libre por HPLC mediante una columna microBondapak C18 (300 mm de largo, 3,9 mm de diámetro interno, rellena con sílice esférica de 10 micrómetro de diámetro) proporcionada por Waters o similar, acondicionada a 40 °C y eluida en modo isocrático con una fase móvil que comprende 25 % en vol. de metanol y 75 % en volumen de acetonitrilo, con un caudal de 1 ml/min.

La fracción molar x_p de unidades monoméricas injertadas con grupos de alfa-tocoferol, que corresponde a la relación de injerto molar media de grupos alfa-tocoferol, se determina de este modo.

25 El grado medio de polimerización GP se calcula dividiendo el peso molecular medio de una cadena polimérica determinado por cromatografía de exclusión por tamaño como se describe anteriormente entre el peso molecular medio M de una unidad monomérica del polímero: $GP = M_p/M$

Este peso molecular medio de una unidad es la media de los pesos moleculares de las unidades constitutivas del polímero, ponderado cada uno por la fracción molar de esta unidad.

Se considera M_1 el peso molecular medio de los monómeros de ácido glutámico y M_2 el peso molecular medio de los monómeros de ácido glutámico injertados con alfa-tocoferol. El peso medio M se da por la siguiente fórmula:

$$30 \quad M = x_1 \cdot M_1 + x_2 \cdot M_2$$

Antioxidante

Según una realización particular, la composición sólida de IFN-beta o disolución acuosa de IFN-beta comprende adicionalmente un antioxidante.

35 El antioxidante es, por ejemplo, metionina, cisteína, ácido ascórbico, un ascorbato, ácido cítrico o un citrato. Una composición preferida de la invención incluye uno o más antioxidantes diferentes.

El antioxidante de la invención es preferiblemente metionina. La metionina usada en la invención es particularmente L-metionina.

En particular, una composición de la invención comprende un antioxidante en una relación en peso/peso de antioxidante/IFN-beta entre 2 y 7.

40 Lioprotector

Según una realización particular de la invención, una composición sólida de IFN-beta o una composición acuosa líquida de IFN-beta comprende adicionalmente un lioprotector.

45 El lioprotector es preferiblemente un azúcar. Una composición preferida de la invención comprende uno o varios azúcares diferentes. "Azúcar" significa azúcares sencillos (monosacáridos) o azúcares complejos (cadenas compuestas por varias unidades de azúcar tales como diholósidos) pero también, por extensión, polioles.

Los ejemplos de lioprotectores incluyen lactosa, glucosa, fructosa y sacarosa. Son polioles adecuados, por ejemplo, manitol, xilitol, eritritol, sorbitol y trehalosa, maltodextrina y mezclas de los mismos. Son lioprotectores preferidos manitol o sacarosa, preferiblemente el último.

Los ejemplos de manitol incluyen diversas purezas de Pearlitol® comercializado por Roquette, especialmente Pearlitol® SD200.

5 Según una realización preferida, una composición de la invención, particularmente una composición de la invención que comprende un antioxidante como se define anteriormente, comprende entre 50 y 600 mg de lioprotector por mg de IFN-beta.

Una solución de IFN-beta acuosa lista para usar contiene ventajosamente metionina en una cantidad de 2 a 7 mg por mg de IFN-beta y sacarosa a una concentración de 50 a 300 mg/ml.

Una composición de la invención que contiene un antioxidante y un lioprotector en disolución acuosa tiene ventajosamente un pH de 6 a 8, preferiblemente de aproximadamente 7.

10 **Aditivos de ajuste de osmolalidad y pH**

Los aditivos que pueden usarse para el ajuste de la osmolalidad de la composición incluyen, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, lactosa, glucosa, fructosa, sacarosa, manitol, xilitol, eritritol, sorbitol, trehalosa, maltodextrina y mezclas de los mismos.

15 Los aditivos usados para el ajuste del pH de la composición incluyen, por ejemplo, un compuesto básico, especialmente una base mineral tal como un hidróxido, particularmente hidróxido de sodio. Pueden usarse también ácido acético o ácido clorhídrico.

Una composición sólida particularmente preferida contiene los siguientes ingredientes en las proporciones indicadas:

- a) aproximadamente 0,5 mg de IFN-beta;
 - 20 b) aproximadamente 22 mg de polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un peso molecular medio entre 26.000 y 40.000 g/mol, injertado con sustituyentes de alfa-tocoferol, siendo la relación de injerto molar media de 4,5-5,5 % en moles;
 - c) aproximadamente 1,5 mg de metionina; y
 - d) aproximadamente 76 mg de sacarosa;
- o un múltiplo o submúltiplo de dichas cantidades.

25 Las cantidades anteriores pueden multiplicarse, por ejemplo, por un valor entre 0,3 y 5, tal como 0,3, 0,5, 1,2, 1,5, 2, 3, 5 o incluso más.

Otra composición sólida particularmente preferida de la invención es una composición deshidratada, particularmente un liofilizado, es decir una composición liofilizada.

30 Preferiblemente, la naturaleza y cantidades de los ingredientes se seleccionan de tal modo que la composición acuosa sólida sea estable a 5 °C durante al menos 24 meses.

Método de fabricación: Composición sólida de IFN-beta que comprende IFN-beta y polímero de poli(ácido glutámico) injertado

La presente invención proporciona particularmente un método para preparar la composición sólida de la invención que comprende las siguientes etapas:

- 35 (a) proporcionar una disolución líquida acuosa de polímero de poli(ácido glutámico) injertado a una concentración entre 20 y 30 mg/g;
- (b) proporcionar una disolución de IFN-beta a una concentración entre 1 y 9 mg/ml; en la que está presente al menos un compuesto seleccionado de un lioprotector, antioxidante y aditivo para el ajuste del pH, en al menos una de las disoluciones de la etapa (a) y la etapa (b);
- 40 (c) mezclar las disoluciones obtenidas en la etapa (a) y (b), de tal modo que, después de mezclar, la composición:
 - tenga una concentración polimérica entre 4 y 16 mg/g,
 - tenga una osmolalidad entre 100 y 250 mOsm/kg,
 - tenga un pH entre 6,5 y 7,5;
- 45 (d) esterilizar al menos una vez la mezcla resultante; y

(e) deshidratar la disolución, formando dicha composición sólida.

Más particularmente, la presente invención proporciona un método para preparar una composición sólida que comprende las siguientes etapas:

5 (a) proporcionar una disolución líquida acuosa de polímero de poli(ácido glutámico) injertado a una concentración entre 20 y 30 mg/g;

(b) proporcionar una disolución de IFN-beta a una concentración entre 1 y 9 mg/ml, preferiblemente a una concentración de 6 mg/ml; en el que está presente al menos un compuesto seleccionado de un lioprotector, antioxidante y aditivo para el ajuste del pH, en al menos una de las disoluciones de la etapa (a) y la etapa (b);

10 (c) mezclar las disoluciones obtenidas en la etapa (a) y (b), de tal modo que, después de mezclar, la composición:

- tenga una concentración polimérica entre 7 y 13 mg/g,
- tenga una osmolalidad entre 100 y 160 mOsm/kg,
- tenga un pH entre 6,8 y 7,2;

(d) esterilizar al menos una vez la mezcla resultante; y

15 (e) deshidratar la disolución, formando dicha composición sólida.

Aún más particularmente, la presente invención proporciona un método para preparar una composición sólida que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una disolución líquida acuosa de polímero de poli(ácido glutámico) injertado a una concentración entre 20 y 30 mg/g;

20 (b) proporcionar una disolución de IFN-beta de 6 mg/ml; en la que está presente al menos un compuesto seleccionado de un lioprotector, antioxidante y aditivo para el ajuste del pH, en al menos una de las disoluciones de la etapa (a) y la etapa (b);

(c) mezclar las disoluciones obtenidas en la etapa (a) y (b), de tal modo que, después de mezclar, la composición:

- 25
- tenga una concentración polimérica de 9,7 mg/g,
 - tenga una osmolalidad de 136 mOsm/kg,
 - tenga un pH de 7,0;

(d) esterilizar al menos una vez la mezcla resultante; y

(e) deshidratar la disolución, formando dicha composición sólida.

30 Preferiblemente, la composición líquida de la etapa (d) se almacena en reposo durante 2 h o más, preferiblemente durante 4 h o más, a temperatura ambiente antes de la deshidratación.

Según un método preferido, las etapas (a) y (b) pueden conseguirse en botellas de vidrio dotadas de agitadores magnéticos, y preferiblemente en equipos escalables bien conocidos tales como tanques bien agitados y agitadores. Los agitadores se seleccionan entre aquellos que inducen flujos axiales o radiales, preferiblemente agitadores que inducen una tensión de cizallamiento mínima y más preferiblemente la hélice Mixel TT.

35

Según una realización preferida, se efectúa la etapa (d) mediante filtración estéril y comprende varias etapas de filtración, preferiblemente dos etapas separadas por al menos 2 h de agitación a temperatura ambiente. En particular, pueden usarse filtros de 0,2 micrómetros, tales como filtros Supor EKV dotados de membranas de polietersulfona de Pall.

40 Se deshidrata en la etapa (e) la disolución filtrada obtenida en la etapa (d) mediante cualquier técnica de deshidratación bien conocida tal como liofilización, atomización o evaporación, preferiblemente liofilización.

Según una realización particular, se distribuye la disolución en matraces o viales antes de la etapa de deshidratación (e).

Según otra realización particular, se rellenan los matraces o viales con perlas de vidrio.

Una composición sólida según la invención permite, mediante la adición de un disolvente tal como agua, preparar la correspondiente composición líquida. En particular, permite añadir por ejemplo agua para inyecciones (API) para preparar una composición inyectable líquida lista para usar.

Método para preparar una composición líquida lista para usar

- 5 La invención proporciona por tanto un método para preparar una composición líquida lista para usar, que comprende disolver una composición sólida anterior de IFN-beta y polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un peso molecular medio entre 26.000 y 40.000 g/mol e injertado aleatoriamente con sustituyentes de alfa-tocoferol, en el que la relación de injerto media molar está entre 4,5 y 5,5 % en moles, conteniendo preferiblemente dicha composición sólida un antioxidante y un lioprotector, en un volumen de diluyente tal que la concentración de IFN-beta esté entre 0,2 y 0,8 mg/ml y la concentración de polímero de poli(ácido glutámico) injertado esté entre 19 y 25 mg/ml en la composición líquida lista para usar.

La invención se refiere también por lo tanto a una composición líquida acuosa que comprende:

- IFN-beta y
- un polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un peso molecular medio entre 26.000 y 40.000 g/mol injertado con sustituyentes de alfa-tocoferol, siendo el índice de injerto molar medio de 4,5-5,5 % en moles, en el que la relación en peso/peso entre dicho polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta está entre 24 y 125.

En una composición líquida preferida de la invención, la concentración de IFN-beta está entre 0,2 y 0,8 mg/ml.

- 20 En otra composición líquida preferida de la invención, la concentración de polímero de poli(ácido glutámico) injertado está entre 19 y 25 mg/ml.

En una composición líquida particularmente preferida de la invención, la concentración de IFN-beta está entre 0,2 y 0,8 mg/ml y la concentración de polímero de poli(ácido glutámico) injertado está entre 19 y 25 mg/ml.

Las composiciones líquidas particularmente preferidas de la invención contienen los siguientes componentes:

- a) aproximadamente 0,5 mg/ml de IFN-beta;
- 25 b) aproximadamente 22 mg/ml de polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un peso molecular medio entre 26.000 y 40.000 g/mol, injertado con sustituyentes de alfa-tocoferol, siendo la relación de injerto molar media de 4,5-5,5 % en moles;
- c) aproximadamente 1,5 mg/ml de metionina;
- d) aproximadamente 76 mg/ml de sacarosa;
- 30 o un múltiplo o submúltiplo de dichas cantidades.

Esta composición líquida acuosa tiene preferiblemente un pH de aproximadamente 7 y una osmolalidad de aproximadamente 300 mOsm/kg.

Preferiblemente, la naturaleza y cantidades de los ingredientes se seleccionan de tal modo que la composición líquida acuosa tenga una viscosidad menor de 1.000 mPa.s, medida a 20 °C y a un índice de cizallamiento de 10 s⁻¹.

35 MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación del tamaño de los hidrogeles

El polímero usado para la invención es capaz de formar espontáneamente hidrogeles nanométricos altamente hidratados cuando se dispersa en un medio acuoso, en particular en agua, a un pH entre 6 y 8. El IFN-beta se asocia espontáneamente con los hidrogeles.

- 40 Se mide el diámetro hidrodinámico medio promediado en volumen de los hidrogeles mediante dispersión dinámica de luz según técnicas bien conocidas, por ejemplo mediante un equipo Zeta sizer nano-ZS de Malvern o CGS 3 de ALV. En este último caso, el ángulo de dispersión es de 140°.

- 45 Para conseguir la medida, se disuelve la composición sólida en agua, obteniendo una concentración polimérica de 22 mg/ml. Se añade entonces NaCl 0,15 M de tal modo que la concentración polimérica sea de 1 mg/ml. Se agita suavemente la disolución durante 24 horas y se filtra entonces a través de dos filtros secuenciales respectivamente de 0,8 y 0,2 µm de tamaño de poro, antes del análisis de dispersión dinámica de luz a un pH de entre 6 y 7.

El tiempo de adquisición de la señal de dispersión es de 10 minutos. Se efectúa la medida por triplicado en dos muestras de disolución. El resultado es la media de las 6 medidas.

Preferiblemente, según la presente invención, los hidrogeles tienen un diámetro hidrodinámico medio promediado en volumen de entre 10 y 80 nm, preferiblemente entre 10 y 60 nm, y más preferiblemente entre 10 y 30 nm.

Método de valoración de la agregación de IFN-beta

5 Una composición adecuada según la invención tiene un porcentaje de agregados, medido con la prueba de estrés (PE) siguiente, menor del 20 %, preferiblemente menor del 10 %, y más preferiblemente menor del 5 % de la cantidad total de IFN-beta.

Pueden formarse dos tipos de agregados de IFN-beta: agregados irreversibles que no pueden disociarse por tensioactivos y agregados reversibles que se disocian por tensioactivos.

10 Se efectúa convenientemente la cuantificación de los agregados irreversibles mediante un método de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS).

Sin embargo, el método de SEC-SDS extrae, pero también disocia, los agregados reversibles, por ejemplo dímeros no covalentes de IFN-beta. Obviamente, este método no es aplicable a la medida de los agregados reversibles.

Se ha desarrollado un segundo método, al que se hace referencia en adelante en la presente memoria como método de "transferencia Western", para cuantificar ambos tipos de agregados de IFN-beta.

15 **Prueba de estrés (PE):**

Se disponen muestras de 0,7 ml de las composiciones recién preparadas para ensayar en viales de 3 ml y se calientan durante 30 min a 90 °C. Se analizan entonces las composiciones por SEC-SDS o por transferencia Western como se describe a continuación.

Medida de las formas agregadas irreversiblemente por SEC-SDS:

20 Se ensaya el contenido de agregados irreversibles por comparación con un patrón de IFN-beta que contiene de 1 a 1,5 % de agregados irreversibles. Este patrón consiste en IFN-beta agregado en disolución acuosa a 100 °C durante 3,5 min, y diluido entonces en una disolución de poli(ácido glutámico) injertado.

Se diluyen tanto el patrón como las muestras 20 veces en SDS al 2 %.

25 Se inyectan las muestras en un sistema cromatográfico consistente en dos columnas conectadas en serie, TSK-Gel G4000 PWXL + TSK-Gel SuperAW400. La fase móvil es una disolución de PBS 3,3 mM que comprende un 0,3 % de SDS.

Cuando no se detectan agregados irreversibles, o están por debajo del patrón, se indica el contenido de agregado de la composición como inferior al 2 %.

30 Cuando el contenido de agregados irreversibles está por encima del patrón, se estima la cuantificación de agregados mediante la cuantificación del IFN-beta no agregado (monómero).

Medida de agregados tanto irreversibles como reversibles por transferencia Western

Etapa 1:

35 Se diluyen 100 ng de composición de IFN-beta en tampón de Laemmli a pH= 6,8 (0,01 % de SDS, solución de tampón tris(hidroximetil)aminometano 62,4 mM, 0,06 % de azul de bromofenol, 10 % de glicerol) y se depositan en pocillos que contienen gel de poli(acrilamida al 12 %).

Se mezclan tres disoluciones patrón, que comprenden 1 ng, 3 ng y 5 ng de IFN-beta, con polímero de poli(ácido glutámico) injertado en la misma proporción que las muestras para analizar.

40 Se separan entonces el polímero de poli(ácido glutámico) injertado, IFN-beta y agregados mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS). El tampón de circulación es un "tampón de circulación XT MES" (Biorad - Ref 1610789) que contiene entre 1 y 2,5 % de SDS.

Etapa 2:

45 Después de la migración de las proteínas en el gel, se transfieren las diferentes formas de IFN-beta (monómero y agregados) a una membrana de nitrocelulosa. Se revela entonces específicamente el IFN-beta usando un anticuerpo primario anti-IFN-beta seguido de un anticuerpo secundario acoplado con fosfatasa alcalina. Se tiñe entonces la membrana con una mezcla de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilo/p-toluidina (BCIP) y cloruro de nitrozul de tetrazolio (NBT), en que se detecta el IFN-beta por los anticuerpos.

Después de tefiir, los agregados de IFN-beta aparecen como bandas coloreadas bien separadas. La comparación visual directa de las intensidades de banda permite la determinación del contenido de agregado en las composiciones ensayadas.

Determinación del perfil de liberación *in vitro* de la composición según la invención.

5 Se inyectan las composiciones en un material de porosidad controlada a través del cual circula un tampón sintético que contiene PBS 10 mM, 2 % de SDS y BSA 30 mg/ml. Se recogen muestras a intervalos regulares (cada 30 minutos para la composición de la invención y cada 2 minutos para la composición que no contiene el polímero de poli(ácido glutámico)) con un recolector de fracciones (FC204 de Gilson) y se analiza por valoración ELISA (FUJIREBIO ref. KAC1201) el contenido de IFN-beta.

10 Dependiendo del experimento, puede usarse cualquier versión descrita de aquí en adelante.

Prueba *in vitro* T1

15 Se efectúa la prueba de liberación *in vitro* usando un aparato de flujo de temperatura controlada (una celda de flujo de SOTAX - No.3239 - con un diámetro de 22,6 mm) rellena de perlas de vidrio de 1 mm de diámetro de SOTAX - No. F200-0110 en su parte inferior. Se inyecta una masa constante de disolución en un material inerte y de porosidad controlada (pieza de espuma de 30 mm de altura y 25 cm de diámetro de Carpenter - No. RP30263) localizada en la parte superior de la cámara del aparato. Se hace circular un tampón sintético que contiene PBS 10 mM, 2 % de SDS y BSA 30 mg/ml a través de esta cámara a una temperatura de 37 °C y a un caudal de 0,5 ml/min. Se inyectan 50 µl de la muestra en el material inerte y de porosidad controlada a una profundidad de 0,5 cm usando una jeringuilla de 100 µl dotada de una aguja de 50 mm. Se pesa la jeringuilla antes y después de la inyección para determinar precisamente la cantidad de disolución inyectada.

20 Se expresan los resultados como porcentaje de IFN-beta liberado en cada punto temporal frente a la cantidad total de IFN-beta liberado durante 16 horas.

Prueba *in vitro* T2

25 Se efectúa la prueba de liberación *in vitro* usando un aparato de flujo de temperatura controlada (una celda de flujo de SOTAX - No.3239 - con un diámetro de 22,6 mm) totalmente rellena de perlas de vidrio de 1 mm de diámetro de SOTAX - No. F200-0110 en su parte inferior. Se inyecta una masa constante de disolución en el lecho de perlas de vidrio (medio inerte y de porosidad controlada). Se hace circular un tampón sintético que contiene PBS 10 mM, 2 % de SDS y BSA 30 mg/ml a través de esta cámara a una temperatura de 37 °C y a un caudal de 0,5 ml/min. Se inyectan 50 µl de la muestra en el material inerte y de porosidad controlada a una profundidad de 0,5 cm usando una jeringuilla de 100 µl dotada de una aguja de 50 mm. Se pesa la jeringuilla antes y después de la inyección para determinar precisamente la cantidad de disolución inyectada.

30 Se expresan los resultados como porcentaje de IFN-beta liberado en cada punto temporal frente a la cantidad total de IFN-beta liberado durante 15 horas.

La invención se describirá ahora mediante las siguientes figuras, ejemplos y experimentos.

35 FIGURAS

La Figura 1 representa la concentración plasmática de IFN-beta liberado en función del tiempo, en la que:

⊕ representa la concentración plasmática de IFN-beta liberado de la composición líquida F,

●● representa la concentración plasmática de IFN-beta liberado de la composición de liberación inmediata,

PREPARACIONES

40 **Preparación 1: Polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un grado de polimerización (GP) de aproximadamente 220 injertado con aproximadamente 5 % en moles de alfa-tocoferol (polímero P1)**

Se preparó como sigue una disolución acuosa de polímero de poli(ácido glutámico) injertado con un grado de polimerización (GP) de aproximadamente 220 injertado con aproximadamente 5 % en moles de alfa-tocoferol:

45 Se disolvieron 15 g de poli(ácido alfa-L-glutámico), que tiene un GP de aproximadamente 220 obtenido por polimerización de NCAGluOMe seguida de hidrólisis, en 288 ml de dimetilformamida (DMF) y se calentó a 80 °C. Se enfrió la disolución a 15 °C y se añadieron sucesivamente 2,5 g de alfa-tocoferol racémico (> 98 % obtenido en Fluka®) disueltos en 8 ml de DMF, 280 mg de 4-dimetilaminopiridina disueltos en 1 ml de DMF y 1,6 g de diisopropilcarbodiimida disueltos en 6 ml de DMF. Después de 3,5 h de agitación, se neutralizó el medio de reacción con hidróxido de sodio acuoso. Se purificó entonces el polímero por ultrafiltración usando una membrana de 1 kDa y se concentró a aproximadamente 30 mg/ml. Se filtró la disolución a través de una membrana de 0,22 µm y se almacenó a 5 °C antes del uso en la siguiente etapa. El rendimiento era de aproximadamente 85 % del polímero P1.

Se encontró que el peso molecular máximo absoluto (Mp) medido por un detector de dispersión de luz a 18 ángulos (MALLS) conectado con una cromatografía de exclusión por tamaño orgánica era de 31.000 g/mol. La relación de injerto de alfa-tocoferol, estimada por espectroscopia de RMN de protón, era de 5,1 % en moles.

Preparación 2: Disolución de IFN-beta

- 5 Se concentró una disolución diluida de IFN-beta en tampón acetato 50 mM (Merck Serono, Suiza - 0,377 mg/ml o 0,399 mg/l dependiendo de los lotes de disolución) mediante ultrafiltración frontal a temperatura ambiente, procurando una disolución de IFN-beta concentrada a 6 mg/ml.

Preparación 3: Disolución de excipientes

- 10 Se disolvieron 4,7 g de metionina, 229,3 g de sacarosa y 4,6 g de disolución de hidróxido de sodio 1 N en 1645,4 g de agua para inyecciones (API). Se mantuvo la disolución resultante con agitación moderada durante 15 min a temperatura ambiente.

Preparación 4: Preparación de una composición líquida acuosa de polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta de la invención

- 15 Se añadieron 1526,0 g de la disolución de excipientes obtenida en la Preparación 3 a 1974,0 g de disolución de polímero P1 (disolución de polímero P1 28,2 mg/ml) obtenida mediante el método descrito en la Preparación 1. Se agitó suavemente esta disolución durante al menos 15 min a temperatura ambiente.

Se añadieron 145 g de disolución de IFN-beta 6 mg/ml de la Preparación 2 a 2409,4 g de la disolución intermedia anterior. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante al menos 2 horas antes de esterilizar por filtración usando filtros de 0,2 µm.

- 20 **Preparación 5: Preparación de una composición líquida acuosa de polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta de la invención**

Se preparó la Preparación 5 usando un protocolo similar al descrito para la Preparación 4, usando 2227,8 g de disolución de polímero P1 y ajustando consiguientemente las cantidades de excipientes y IFN-beta para obtener al final de esta etapa una disolución que tiene la misma composición y pH que la Preparación 4.

- 25 **Preparación 6: Preparación de una composición líquida acuosa de polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta de la invención**

Se preparó la Preparación 6 usando un protocolo similar al descrito para la Preparación 4, usando 1553,4 g de la disolución de excipientes obtenida en la Preparación 3, 1688,6 g de disolución de polímero P1 y 1450,1 g de agua para inyecciones (API).

- 30 Se añadieron 177,9 g de disolución de IFN-beta 6 mg/ml de la Preparación 2 a 4682,1 g de la disolución intermedia anterior. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante al menos 2 horas antes de esterilizar por filtración usando filtros de 0,2 µm.

Preparación 7: Polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un grado de polimerización (GP) de aproximadamente 100 injertado con aproximadamente 5 % en moles de alfa-tocoferol (polímero P2)

- 35 Se preparó una disolución acuosa de polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un grado de polimerización (GP) de aproximadamente 100 injertado con aproximadamente 5 % en moles de alfa-tocoferol usando un protocolo similar al descrito para la Preparación 1, usando un polímero de poli(ácido glutámico) bruto que tiene un grado de polimerización (GP) de aproximadamente 100.

- 40 Se estimó que el peso molecular máximo (Mp) era de aproximadamente 15.000 g/mol. La relación de injerto de alfa-tocoferol, estimada como se describe en el método anterior, era de aproximadamente 5 % en moles.

Preparación 8: Preparación de una composición líquida acuosa de polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta de la invención

- 45 Se preparó la Preparación 8 usando un protocolo similar al descrito para la Preparación 6, usando 8,5 g de disolución de polímero P1 y ajustando consiguientemente las cantidades de excipientes y IFN-beta para obtener al final de esta etapa una disolución que tiene la misma composición y pH que la Preparación 6.

Preparación 9: Preparación de una composición líquida acuosa de polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta fuera del alcance de la invención

- 50 Se prepara una disolución de excipientes según un protocolo similar al de la Preparación 3, usando 0,02 g de metionina, 0,96 g de sacarosa y 9,01 g de agua para inyecciones (API). Se añadieron 8,42 g de la disolución de excipientes anterior a 9,66 g de agua para inyecciones (API) y a 7,31 g de disolución del polímero P2 (disolución del

polímero P2 46,7 mg/ml) obtenida mediante el método descrito en la Preparación 7. Se agitó suavemente esta disolución durante al menos 15 min a temperatura ambiente.

Se añadieron 0,96 g de disolución de IFN-beta 6 mg/ml de la Preparación 2 a 25,33 g de la disolución intermedia anterior. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante al menos 2 h.

5 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de una composición sólida de polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta de la invención

Se dejó reposar durante 16 h la disolución obtenida en la Preparación 4, se dividió entonces en viales de 5 ml y se relleno cada uno con 2,06 g de disolución y 3 perlas de vidrio de 4,76 mm de diámetro.

10 Se liofilizó entonces en un liofilizador USIFROID (Modelo SMH-150) con un ciclo de liofilización durante un total de 72 h, produciendo una composición sólida de la invención.

Ejemplo 2: Preparación de una composición acuosa reconstituida de un polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta de la invención

15 Se añadieron 1,3 ml de agua para inyecciones por vial de producto liofilizado del Ejemplo 1 y se agitaron manualmente durante unos pocos minutos, obteniendo una disolución de la invención. Se dan las características de esta disolución reconstituida en el Experimento 1 siguiente.

Ejemplo 3: Preparación de una composición sólida de polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta de la invención

20 Se dejó reposar durante 16 h la disolución obtenida en la Preparación 5, se dividió entonces en viales de 5 ml y se relleno cada uno con 2,06 g de disolución y 3 perlas de vidrio de 4,76 mm de diámetro.

Se liofilizó entonces en un liofilizador USIFROID (Modelo SMH-150) con un ciclo de liofilización durante un total de 72 h, produciendo una composición sólida de la invención.

Ejemplo 4: Preparación de una composición acuosa reconstituida de un polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta de la invención

25 Se añadieron 1,3 ml de agua para inyecciones por vial de producto liofilizado del Ejemplo 3 y se agitaron manualmente durante unos pocos minutos, obteniendo una composición de la invención. Se dan las características de esta disolución reconstituida en el Experimento 1 siguiente.

Ejemplo 5: Preparación de una composición sólida de polímeros de poli(ácido glutámico) injertados e IFN-beta de la invención

30 Se dejó reposar durante 2 h la mezcla final de la disolución obtenida en la Preparación 6, se dividió entonces en viales de 5 ml y se relleno cada uno con 3,08 g de disolución y 3 perlas de vidrio de 4,76 mm de diámetro.

Se liofiliza entonces en un liofilizador USIFROID (Modelo SMH-150) con un ciclo de liofilización durante un total de 96 h, produciendo una composición sólida de la invención.

Ejemplo 6: Preparación de una composición acuosa reconstituida de un polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta de la invención

35 Se añadieron 1,3 ml de agua p.p.i. para inyecciones por vial de liofilizado del Ejemplo 5 y se agitaron manualmente durante unos pocos minutos, obteniendo una disolución reconstituida de la invención. Se dan las características de esta disolución reconstituida en el Experimento 1 siguiente.

Ejemplo 7: Preparación de una composición sólida de polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta de la invención

40 Se dejó reposar durante 2 h la mezcla final de la disolución obtenida en la Preparación 8, se dividió entonces en viales de 5 ml y se relleno cada uno con 3,08 g de disolución y 3 perlas de vidrio de 4,76 mm de diámetro.

Se liofiliza entonces en un liofilizador USIFROID (Modelo PL45) con un ciclo de liofilización durante un total de 98 h, produciendo una composición sólida de la invención.

45

Ejemplo 8: Preparación de una composición acuosa reconstituida de un polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta de la invención

5 Se añadieron 1,3 ml de agua p.p.i. para inyecciones por vial de liofilizado del Ejemplo 7 y se agitaron manualmente durante unos pocos minutos, obteniendo una disolución reconstituida de la invención cuya composición teórica se da en la Tabla A siguiente.

Tabla A - Características de las formulaciones del Ejemplo 8 de la invención

Análisis	Ejemplo 8
C _{IFN-beta} (mg/ml)	0,5
C _{Pol} (mg/ml)	22

Ejemplo 9: Preparación de una composición sólida de polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta fuera del alcance de la invención

10 Se dejó reposar durante 2 h la mezcla final de la disolución obtenida en la Preparación 9, se dividió entonces en viales de 5 ml y se rellenó cada uno con 3,08 g de disolución y 3 perlas de vidrio de 4,76 mm de diámetro.

Se liofiliza entonces en un liofilizador USIFROID (Modelo PL45) con un ciclo de liofilización durante un total de 98 h, produciendo una composición sólida de la invención.

Ejemplo 10: Preparación de una composición acuosa reconstituida de un polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta fuera del alcance de la invención

15 Se añadieron 1,3 ml de agua p.p.i. para inyecciones por vial de liofilizado del Ejemplo 9 y se agitaron manualmente durante unos pocos minutos, obteniendo una disolución reconstituida de la invención cuya composición teórica se da en la Tabla B siguiente.

Tabla B - Características de las formulaciones del Ejemplo 10 fuera del alcance de la invención

Análisis	Ejemplo 10
C _{IFN-beta} (mg/ml)	0,5
C _{Pol} (mg/ml)	30

20

EXPERIMENTOS**Experimento 1: Caracterización de composiciones líquidas acuosas de los Ejemplos 2, 4 y 6**

Concentración de IFN-beta

25 Se midió la concentración de IFN-beta (C_{IFN-beta}) por HPLC (columna C4 en fase inversa Symmetry300) con un gradiente de elución con fases compuestas por agua/acetonitrilo + 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA) + polioxietileno(23)lauriléter 0,4 g/l (fase A 70/30; fase B 0/100). Se realizó una extracción preliminar de la muestra con una disolución de seroalbúmina bovina 6 g/l según un factor de dilución de 3.

Se efectuó la cuantificación de IFN-beta en las composiciones frente a un intervalo patrón de IFN-beta.

Concentración de polímero

30 Se efectuó una hidrólisis ácida total de la muestra. Se derivatizó el producto con orto-ftalaldehído y se analizó por HPLC en fase inversa, determinando la concentración de polímero C_{pol}.

Osmolalidad

Se determinó la osmolalidad de la composición usando un osmómetro Fiske (MARK3).

Se dan en la Tabla 1 los resultados obtenidos:

Tabla 1 - Características de las formulaciones de los Ejemplos 2, 4 y 6 de la invención

Análisis	Ejemplo 2	Ejemplo 4	Ejemplo 6
C _{IFN-beta} (mg/ml)	0,51	0,50	0,48
C _{Pol} (mg/ml)	22	22	22
pH	6,9	6,9	7
Osmolalidad (mOsm/kg)	318	308	306
Viscosidad (mPa.s)	48	53	21
Tamaño de partícula (nm)	18	17	17

Experimento 2: Actividad antivírica

5 Se valoró la actividad antivírica de IFN-beta mediante una prueba de inhibición del efecto citopático; esta prueba está basada en la capacidad del IFN-beta de proteger a células WISH (células amnióticas de origen humano) de la acción citopatogénica del VSV (virus de estomatitis vesicular). La interpretación de la prueba está basada en el hecho de que muchos virus tales como VSV conducen a la muerte celular, que puede cuantificarse indirectamente tiñendo células vivas. Por lo tanto, el efecto citopático puede usarse para cuantificar la protección por interferón. La valoración indirecta de la muerte celular está basada en la medida de la viabilidad, estimada por la cantidad de sales de tetrazolio (MTT) que penetran en las células vivas. El método implica determinar el porcentaje de células protegidas con un espectrofotómetro automático y análisis según el modelo de líneas paralelas de 3 puntos para la evaluación estadística del título de IFN.

10 Protocolo:

Se efectuó la prueba en placas de microvaloración.

- 15 a. Se añadió un pequeño volumen de medio de cultivo (MEM / 5 % de FBS) a cada pocillo.
- b. En la placa, se efectuaron tres diluciones sucesivas (oscilación de 1,5 de una fila a otra) para la muestra de interferón beta y la disolución patrón, de modo que se obtengan tres concentraciones de interferón beta (0,08 ng/ml, 0,12 ng/ml, 0,18 ng/ml) colocadas en la curva de dosis y respuesta lineal.
- 20 c. Se añadió una suspensión de células WISH (4×10^4 células/pocillo) a cada pocillo y se incubaron las placas a 37 °C durante 18-22 h en un incubador bajo 5 % de CO₂ humidificado.
- d. Se añadió una suspensión de VSV a cada pocillo, excepto en los pocillos de control que contienen solo MEM / 2,5 % de FBS.
- e. Se incubaron las placas a 37 °C durante 20 a 28 h en un incubador bajo 5 % de CO₂ humidificado.
- f. Después de la verificación por microscopia invertida de que:
- 25 (1) en la fila del control vírico positivo al menos un 80 % de las células morían y
- (2) el porcentaje medio de protección en presencia del patrón de IFN-beta es de aproximadamente 84 % para el patrón no diluido, 45% para dilución a 1/1,5 y 27 % para dilución a 1/3,

se marcan los cultivos con el tinte MTT específico.

30 g. Se determina la intensidad del color midiendo la densidad óptica (DO) a 595 nm usando un espectrofotómetro automático.

h. Para cuantificar la actividad de IFN-beta, se analizan entonces las medidas de densidad óptica (DO) usando software informático (Colombo).

Se dan en la Tabla 2 los resultados obtenidos:

Tabla 2 - Actividad antivírica de las composiciones de los Ejemplos 2 y 4 de la invención

	Ejemplo 2	Ejemplo 4
Actividad antivírica en MUI/ml (% de recuperación) *	125,4 (96)	129,8 (101)
* Porcentaje de recuperación obtenida frente a la actividad teórica esperada para la proteína nativa a la misma concentración y en las mismas condiciones que la prueba antivírica.		

Estos resultados evidencian que la actividad antivírica de la proteína IFN-beta de las composiciones de los Ejemplos 2 y 4 de la invención se conserva en un 100 %.

5 Experimento 3: Evaluación de la agregación de IFN-beta

Valoración del porcentaje de formas agregadas irreversibles por cromatografía de exclusión en presencia de dodecilsulfato de sodio (SEC-SDS)

Se determinó el porcentaje de formas agregadas irreversibles de IFN-beta en las muestras mediante cromatografía de exclusión por tamaño. El sistema cromatográfico consiste en dos columnas conectadas en serie (TSK-Gel G4000PWXL + TSK-Gel SuperAW400) y una fase móvil que contiene un detergente, dodecilsulfato de sodio (SDS), (0,3 % de SDS - tampón PBS 3,3 mM).

Se evalúa el contenido de agregado irreversible de las composiciones por comparación con un patrón de IFN-beta que contiene de 1 a 1,5 % de dímeros irreversibles. Este patrón consiste en IFN-beta agregado a 100 °C durante 3,5 min diluido en una matriz que reproduce la muestra. Se diluyeron el patrón y las muestras 20 veces en SDS al 2 % antes del análisis.

Se compara el perfil cromatográfico de cada muestra con el perfil del material agregado patrón. Cuando no se detectan agregados irreversibles en la muestra para tratar, o están por debajo del patrón, se da el contenido de agregado de la muestra como por debajo de 2 %.

Cuando el contenido de agregados irreversibles está por encima de patrón, se estima la cuantificación de agregados mediante la cuantificación del IFN-beta no agregado (monómero).

Porcentaje de formas agregadas por el método de transferencia Western (TW)

Se valoró también el porcentaje de formas agregadas de IFN-beta en las muestras por transferencia Western. Se diluyeron 100 ng de muestras de IFN-beta en tampón de Laemmli a pH= 6,8 (0,01 % de SDS, Tris 62,4 mM, 0,06 % de azul de bromofenol, 10 % de glicerol) y se depositaron en los pocillos de un gel de poli(acrilamida) al 12 %. Para cuantificar el índice de agregados de las muestras analizadas, se depositó una serie de tres patrones de monómeros de disolución bruta de IFN-beta en diferentes pocillos del gel para el análisis de cada muestra. Los tres patrones incluían 1 ng, 3 ng y 5 ng de IFN-beta por pocillo, correspondientes respectivamente a 1 %, 3 % y 5 % en comparación con 100 ng de IFN-beta depositado para las muestras. Se depositaron estos patrones después de la mezcla improvisada de la disolución bruta de IFN-beta con el polímero P1 a la misma relación que las composiciones de IFN-beta y polímero P1 de la invención para analizar.

En una primera fase, se separaron las muestras por electroforesis en gel de poli(acrilamida) en presencia de SDS (PAGE-SDS).

En una segunda fase, después de la migración del polímero de poli(ácido glutámico) injertado, el IFN-beta y los agregados en el gel, se separaron y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se reveló entonces específicamente el IFN-beta usando un anticuerpo primario anti-IFN-beta seguido de un anticuerpo secundario acoplado con fosfatasa alcalina. Se tiñó entonces la membrana con una mezcla de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilo/*p*-toluidina (BCIP) y cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT), en que se detectó el IFN-beta por los anticuerpos.

Después de teñir, se determinó la relación de agregados en las composiciones ensayadas comparando visualmente las intensidades de las bandas de patrones y de la posible banda de agregados.

Se dan en la Tabla 3 los resultados obtenidos:

Tabla 3 - Parámetros de las composiciones de los Ejemplos 2 y 4 de la invención

Valoración de las formas agregadas de IFN-beta	Ejemplo 2	Ejemplo 4
% de formas agregadas (TW)	no medido	<1
% de formas agregadas (SEC-SDS)	<2	<2

Experimento 4: Valoración de la agregación de IFN-beta en una composición de la invención

5 Se preparó una composición líquida acuosa como se describe en el Ejemplo 2, que contiene aproximadamente 0,5 mg/ml de IFN-beta y 22 mg/ml de polímero de poli(ácido glutámico) injertado.

Se comparó el contenido de agregados de la composición acuosa con el de una disolución de referencia de IFN-beta 0,4 mg/ml que no contenía polímero de poli(ácido glutámico) injertado.

Se dispusieron 0,7 ml de cada una de las composiciones ensayadas en viales de 3 ml y se calentaron las disoluciones durante 30 min a 90 °C.

10 i) Cromatografía de exclusión por tamaño

Después de calentar, se analizó cada composición por cromatografía de exclusión por tamaño en presencia de SDS como se describe en el Experimento 3. Se calculó el pico correspondiente al IFN-beta no modificado (monómero) a partir de una serie de patrones de IFN-beta que engloban la concentración descrita.

Se dan en la Tabla 4 los resultados obtenidos:

15 *Tabla 4 - Valoración de la agregación*

	Pico de monómero de IFN-beta antes del calentamiento	Pico de monómero de IFN-beta después de 30 min de calentamiento
	(%)	(%)
Disolución de la invención	100	108
Disolución de referencia	100	44

Estos resultados muestran claramente que eluía un 100 % del IFN-beta como IFN-beta monomérico en la composición calentada de la invención, mientras que permanece solo un 44 % en la disolución de control.

ii) Transferencia Western

20 Se evaluó también la presencia o ausencia de agregados de IFN-beta en las muestras por transferencia Western (método descrito en el Experimento 3).

25 El análisis de la membrana después de la tinción revela la presencia de agregados en la disolución de referencia (no según la invención) calentada durante 30 min a 90 °C, y revela adicionalmente una disminución de la cantidad de monómero respecto a la muestra no calentada de disolución de referencia. En cambio, para la muestra calentada de la composición de la formulación según la invención, no se detectó agregado, y la cantidad de monómero era idéntica a la de la muestra de una composición no calentada según la invención.

Este segundo método confirma la ausencia de agregados en la composición de la invención.

En conclusión, las pruebas anteriores prueban que una composición de la invención previene la agregación de IFN-beta.

30 **Experimento 5: Estabilidad de composiciones liofilizadas de la invención**

Se dispusieron viales que contenían las composiciones sólidas de los Ejemplos 1 y 3 en cámaras mantenidas a 5 y 25 °C.

ES 2 563 737 T3

Se sacaron los viales en diferentes momentos y se reconstituyeron con agua como se describe en los Ejemplos 2 y 4. Se analizaron las composiciones líquidas usando los métodos descritos en los experimentos anteriores y se presentan los resultados en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5 - Estabilidad de las composiciones de los Ejemplos 1 y 3 mantenidos a 5 °C

Análisis	Tiempo	Ejemplo 1	Ejemplo 3
C _{IFN-beta} en mg/ml	T=0	0,51	0,50
	1 mes	0,49	0,51
	2 meses	0,50	no medido
	3 meses	0,53	0,50
	6 meses	0,51	0,52
	9 meses	0,52	0,48
	12 meses	0,50	0,49
	18 meses	0,54	0,53
	24 meses	0,53	no medido
C _{Pol} en mg/ml	T=0	22	22
	1 mes	21	no medido
	2 meses	21	no medido
	3 meses	23	22
	6 meses	22	22
	9 meses	22	22
	12 meses	21	22
	18 meses	22	22
	24 meses	22	no medido
pH	T=0	6,9	6,9
	1 mes	7,0	7,0
	2 meses	6,9	no medido
	3 meses	6,9	6,9
	6 meses	6,9	6,9
	9 meses	6,8	6,9

ES 2 563 737 T3

Análisis	Tiempo	Ejemplo 1	Ejemplo 3
	12 meses	7,0	7,0
	18 meses	6,9	6,9
	24 meses	6,8	no medido
Osmolalidad en mOsm/kg	T=0	318	308
	1 mes	319	307
	2 meses	281	no medido
	3 meses	311	306
	6 meses	300	308
	9 meses	296	294
	12 meses	306	300
	18 meses	305	306
	24 meses	305	no medido
Actividad antivírica en MUI/ml (% de recuperación)	T=0	no medido	129,8 (101)
	1 mes	no medido	121,9 (95)
	2 meses	no medido	no medido
	3 meses	no medido	125,6 (98)
	6 meses	no medido	134,3 (105)
	9 meses	no medido	123,6 (97)
	12 meses	125,4 (96)	131 (102)
	18 meses	no medido	136,6 (107)
	24 meses	137,6 (106)	no medido
% de formas agregadas (TW)	T=0	no medido	<1
	1 mes	no medido	<1
	2 meses	no medido	no medido
	3 meses	no medido	<1
	6 meses	<1	<1
	9 meses	<1	<1

ES 2 563 737 T3

Análisis	Tiempo	Ejemplo 1	Ejemplo 3
	12 meses	<1	<1
	18 meses	<1	<1
	24 meses	<1	no medido
% de formas agregadas (SEC-SDS)	T=0	<2	<2
	1 mes	<2	<2
	2 meses	<2	no medido
	3 meses	<2	<2
	6 meses	<2	<2
	9 meses	<2	<2
	12 meses	<2	<2
	18 meses	<2	<2
	24 meses	<2	no medido
Tamaño de partícula en nm	T=0	18	17
	1 mes	17	18
	3 meses	19	17
	6 meses	18	17
	9 meses	18	18
	12 meses	18	18
	18 meses	18	17
	24 meses	18	no medido

Tabla 6 - Estabilidad de las composiciones de los Ejemplos 1 y 3 mantenidos a 25 °C

Análisis	Tiempo	Ejemplo 1	Ejemplo 3
C _{IFN-beta} en mg/ml	T=0	0,51	0,50
	1 mes	0,48	0,51
	2 meses	0,48	0,50
	3 meses	0,53	0,50

ES 2 563 737 T3

Análisis	Tiempo	Ejemplo 1	Ejemplo 3
	6 meses	0.53	0,51
C _{Pol} en mg/ml	T=0	22	22
	1 mes	22	22
	2 meses	22	22
	3 meses	22	22
	6 meses	22	22
pH	T=0	6,9	6,9
	1 mes	6,9	7,0
	2 meses	6,9	6,9
	3 meses	6,9	6,9
	6 meses	6,9	6,9
Osmolalidad en mOsm/kg	T=0	318	308
	1 mes	333	305
	2 meses	316	310
	3 meses	324	307
	6 meses	312	299
Actividad antivírica en MUI/ml (% de recuperación)	T=0	no medido	129,8 (101)
	1 mes	no medido	130,1 (102)
	2 meses	no medido	130,0 (102)
	3 meses	121,5 (93)	123,6 (97)
	6 meses	no medido	124,7 (97)
% de formas agregadas (TW)	T=0	no medido	<1
	1 mes	no medido	<1
	2 meses	no medido	<1
	3 meses	no medido	<1
	6 meses	<1	<1
% de formas agregadas	T=0	<2	<2

Análisis	Tiempo	Ejemplo 1	Ejemplo 3
(SEC-SDS)	1 mes	<2	<2
	2 meses	<2	<2
	3 meses	<2	<2
	6 meses	<2	<2
Tamaño de partícula en nm	T=0	18	17
	1 mes	19	18
	2 meses	19	18
	3 meses	18	19
	6 meses	17	18

5 Los valores anteriores prueban claramente que las composiciones liofilizadas de la invención son estables durante un periodo de al menos 24 meses a 5 °C y al menos 6 meses a 25 °C. En particular, son estables frente a la agregación de IFN-beta, como se muestra por el porcentaje de monómero de IFN-beta restante superior al 98 % durante el mismo periodo, mientras que la bioactividad del IFN-beta antivírico así formulado no cambia.

Experimento 6: Farmacocinética de composiciones según la invención en monos Cynomolgus

Se ensayaron una composición líquida F preparada como se describe en el Ejemplo 2 y una formulación comercial de liberación inmediata (FCLI).

10 Se administraron ambas composiciones por vía subcutánea a una dosis de 84 mg/kg en un volumen de 0,17 ml/kg a 24 monos divididos en 6 grupos.

Se dan en la Tabla 7 los resultados obtenidos:

Tabla 7 - Farmacocinética comparada

Composición	C _{máx} (pg/ml)	T _{máx} (h)	AUC 0-t (ng.h/ml)	T > LID (h)	BDR (%)
FCLI	1155	0,75	14,6	51	100
Composición F	2199	48	91,5	122	52

BDR: biodisponibilidad relativa comparada con la forma de liberación inmediata.

C_{máx}: concentración plasmática máxima.

t_{máx}: tiempo al que la concentración plasmática es máxima.

ABC : área bajo la curva.

T> LID (límite inferior de detección): periodo durante el cual el ingrediente activo es detectable.

15 La biodisponibilidad de IFN-beta en la composición líquida F era del 52 % de la de la composición de liberación inmediata. El IFN-beta era detectable mucho más tiempo en la composición líquida F que en la composición de liberación inmediata.

Como se muestra en la Figura 1, el perfil plasmático de IFN-beta liberado de la composición líquida F se extiende durante un periodo de al menos 120 h. Esta formulación permite una administración semanal a los pacientes.

Experimento 7: Caracterización del perfil de liberación *in vitro* de las composiciones según la invención en comparación con una composición fuera del alcance de la invención usando la prueba T1

5 Se prepararon las composiciones líquidas como se describe en los Ejemplos 2 y 4 y se ensayaron adicionalmente usando la prueba T1. Para cada composición líquida, se repitió la prueba *in vitro* 6 veces. Se preparó una disolución líquida fuera del alcance de la invención, a saber que comprende solo 0,5 mg/ml de IFN-beta, y obtenida mediante la simple disolución de la disolución de IFN-beta en un tampón de acetato de sodio 50 mM para comparación. Se ensayó la disolución de IFN-beta fuera del alcance de la invención 3 veces en la misma prueba de T1.

Resultados:

Se da en la Tabla 8 la cantidad de IFN-beta acumulada liberada por cada composición ensayada:

10 *Tabla 8 - Cantidad acumulada de IFN-beta liberado de las composiciones en función del tiempo (% de IFN beta liberado frente a cantidad de IFN-beta inicial inyectado en la prueba in vitro- media de 6 o 3 ensayos)*

Composiciones	Disolución de IFN-beta 0,5 mg/ml sin polímero de poli(ácido glutámico) injertado (%)	Composición líquida del Ejemplo 2 según la invención (%)	Composición líquida del Ejemplo 4 según la invención (%)
Tiempo (h)			
0,03	0,3	no medido	no medido
0,10	31,4	no medido	no medido
0,13	52,1	no medido	no medido
0,17	61,7	no medido	no medido
0,20	73,6	no medido	no medido
0,27	88,1	no medido	no medido
0,30	91,8	no medido	no medido
0,33	94,3	no medido	no medido
0,37	95,7	no medido	no medido
0,40	96,9	no medido	no medido
0,47	98,4	no medido	no medido
0,50	no medido	2,7	4,7
0,60	100	no medido	no medido
1	-	12,3	15,8
1,5	-	20,5	25,2
2	-	27,7	33,2
2,5	-	34,7	40,8
3	-	41,7	47,8
3,5	-	48,6	54,6

Composiciones	Disolución de IFN-beta 0,5 mg/ml sin polímero de poli(ácido glutámico) injertado (%)	Composición líquida del Ejemplo 2 según la invención (%)	Composición líquida del Ejemplo 4 según la invención (%)
Tiempo (h)			
4	-	55,3	61,0
4,5	-	62,0	67,2
5	-	68,0	73,0
5,5	-	73,8	78,3
8	-	79,3	83,1
7	-	87,9	90,3
8	-	93,0	95,7
9	-	95,8	98,5
12	-	99,9	99,9
16	-	100,0	100,0
22	-	100,0	100,0

Se liberó IFN-beta a un nivel del 50 % en pocos minutos de la disolución de IFN-beta sin polímero de poli(ácido glutámico) injertado, mientras que se liberó la misma cantidad de las composiciones líquidas según la invención después de más de 2 horas.

- 5 La liberación de IFN-beta era mucho más prolongada en una composición de la invención comparada con una disolución de IFN-beta.

Experimento 8: Caracterización del perfil de liberación *in vitro* de una composición según la invención en comparación con composiciones fuera del alcance de la invención usando la prueba T2

- 10 Se prepararon las composiciones líquidas como se describe en los Ejemplos 8 y 10 y se ensayaron adicionalmente usando la prueba T2. Para cada composición líquida, se repitió la prueba *in vitro* 3 veces.

Resultados:

Se da en la Tabla 9 la cantidad de IFN-beta acumulada liberado por cada composición ensayada:

Tabla 9 - Cantidades acumuladas de IFN-beta liberado de las composiciones en función del tiempo (% de IFN-beta liberado frente a cantidad de IFN-beta inicial inyectado en la prueba in vitro- media de 3 ensayos)

Composiciones	Composición líquida del Ejemplo 8 según la invención (%)	Composición líquida del Ejemplo 10 fuera del alcance de la invención (%)
Tiempo (h)		
0,50	5,6	27,5
1	24,2	82,6
1,5	51,2	96,9
2	66,9	98,1

Composiciones	Composición líquida del Ejemplo 8 según la invención (%)	Composición líquida del Ejemplo 10 fuera del alcance de la invención (%)
Tiempo (h)		
2,5	79,3	98,3
3	88,5	98,3
3,5	94,8	98,4
4	97,5	98,4
4,5	98,8	98,4
5,5	98,9	98,5
7,5	99,3	98,5
11,5	100,0	99,7
15	100,0	100,0

Se liberó IFN-beta a un nivel del 60 % en menos de 1 h de la composición líquida fuera del alcance de la invención (Ejemplo 10), mientras que se liberó la misma cantidad de las composiciones líquidas según la invención después de más de 1,5 horas (Ejemplo 8).

- 5 La liberación de IFN-beta era mucho más prolongada en una composición de la invención comparado con las composiciones líquidas fuera del alcance de la invención.

REFERENCIAS

1. Derynk R. *et al.*, Nature 1980; 285, 542-547.
2. Familletti, P. C., Rubinstein, S. y Pestka, S. 1981 "A Convenient and Rapid Cytopathic Effect Inhibition Assay for Interferon," en "Methods in Enzymology", vol. 78 (S. Pestka, ed.), Academic Press, Nueva York, 387-394;
3. Mark D.F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81 (18) 5662-5666 (1984).
4. Pestka, S. (1986) "Interferon Standards and General Abbreviations", en "Methods in Enzymology" (S. Pestka, ed.), Academic Press, Nueva York 119, 14-23.
5. Rubinstein, S., Familletti, P.C. y Pestka, S. "Convenient Assay for Interferons". J. Virol. 1981; 37, 755-758.
6. Shepard H. M. *et al.*, Nature 1981; 294, 563-565.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica sólida que comprende:
- interferón beta (IFN-beta) y
 - un polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un peso molecular medio entre 26.000 y 40.000 g/mol injertado con sustituyentes de alfa-tocoferol, siendo el índice de injerto molar medio de 4,5-5,5 % en moles, en la que la relación en peso/peso entre dicho polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta está entre 24 y 125.
2. La composición según la reivindicación 1, en la que la relación de injerto molar media de sustituyentes de alfa-tocoferol es de aproximadamente 5 %.
3. La composición según la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente un antioxidante a una relación en peso/peso de antioxidante/IFN-beta entre 2 y 7.
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un lioprotector a una relación en peso/peso de lioprotector/IFN-beta entre 50 y 600.
5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente:
- metionina en una relación en peso/peso de metionina/IFN-beta entre 2 y 7;
 - sacarosa en una relación en peso/peso de sacarosa/IFN-beta entre 50 y 600.
6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:
- a) aproximadamente 0,5 mg de IFN-beta;
 - b) aproximadamente 22 mg de polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un peso molecular medio entre 26.000 y 40.000 g/mol, injertado con sustituyentes de alfa-tocoferol, siendo la relación de injerto molar media de 4,5-5,5 % en moles;
 - c) aproximadamente 1,5 mg de metionina; y
 - d) aproximadamente 76 mg de sacarosa;
- o un múltiplo o submúltiplo de dichas cantidades.
7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un liofilizado.
8. Una composición líquida acuosa que comprende:
- IFN-beta y
 - un polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un peso molecular medio entre 26.000 y 40.000 g/mol injertado con sustituyentes de alfa-tocoferol, siendo el índice de injerto molar medio de 4,5-5,5 % en moles, en la que la relación en peso/peso entre dicho polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta está entre 24 y 125.
9. La composición líquida de la reivindicación 8, en la que la concentración de IFN-beta está entre 0,2 y 0,8 mg/ml.
10. La composición líquida de las reivindicaciones 8 o 9, en la que la concentración de polímero de poli(ácido glutámico) injertado está entre 19 y 25 mg/ml.
11. La composición líquida según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende:
- a) aproximadamente 0,5 mg/ml de IFN-beta;
 - b) aproximadamente 22 mg/ml de polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un peso molecular medio entre 26.000 y 40.000 g/mol, injertado con sustituyentes de alfa-tocoferol, siendo la relación de injerto molar media de 4,5-5,5 % en moles;
 - c) aproximadamente 1,5 mg/ml de metionina;
 - d) aproximadamente 76 mg/ml de sacarosa;
12. Un método para preparar una composición sólida que comprende IFN-beta y un polímero de poli(ácido glutámico) injertado que tiene un peso molecular medio entre 26.000 y 40.000 g/mol, injertado con sustituyentes de

alfa-tocoferol, siendo la relación de injerto molar media de 4,5-5,5 % en moles y siendo la relación en peso/peso entre dicho polímero de poli(ácido glutámico) injertado e IFN-beta entre 24 y 125, que comprende las siguientes etapas:

5 (a) proporcionar una disolución líquida acuosa de polímero de poli(ácido glutámico) injertado a una concentración entre 20 y 30 mg/g;

(b) proporcionar una disolución de IFN-beta a una concentración entre 1 y 9 mg/ml; en la que está presente al menos un compuesto seleccionado de lioprotector, antioxidante y aditivo para el ajuste del pH en al menos una de las disoluciones de la etapa (a) y la etapa (b);

10 (c) mezclar las disoluciones obtenidas en la etapa (a) y (b), de tal modo que, después de mezclar, la composición:

- tenga una concentración de polímero entre 4 y 16 mg/g,
- tenga una osmolaridad entre 100 y 250 mOsm/kg,
- tenga un pH entre 6,5 y 7,5;

(d) esterilizar al menos una vez la mezcla resultante; y

15 (e) deshidratar la disolución, formando dicha composición sólida.

13. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso en un método para el tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal.

20 **14.** Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso en un método de tratamiento terapéutico de enfermedades autoinmunitarias crónicas del sistema nervioso central o de enfermedades neurológicas.

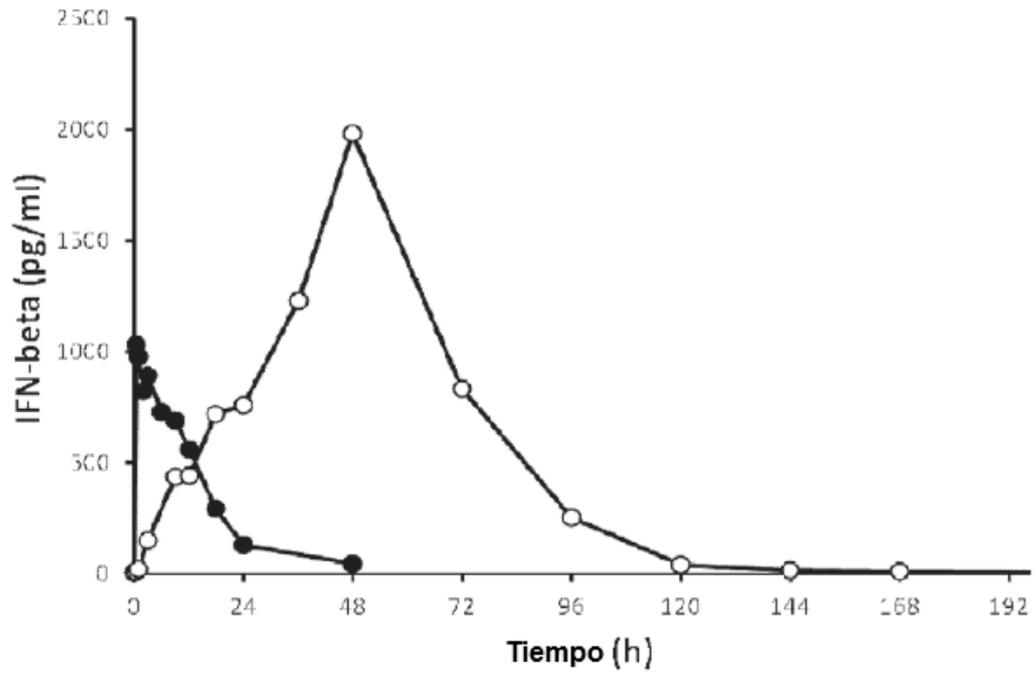


FIGURA 1