

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 632**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2006** **PCT/CU2006/000011**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2007** **WO07051431**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2006** **E 06805254 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016** **EP 1958643**

54 Título: **Formulaciones estables que contienen interferones gamma y alfa en proporciones potenciadoras**

30 Prioridad:

02.11.2005 CU 20050213

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

26.06.2017

73 Titular/es:

**Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
(100.0%)**

**Avenida 31 entre 158 y 190 Cubanacán Playa
Ciudad de la Habana 10600, CU**

72 Inventor/es:

**BELLO RIVERO, IRALDO;
LÓPEZ SAURA, PEDRO;
GARCIA VEGA, YANELDA;
SANTANA MILIAN, HÉCTOR;
AGUILERA BARRETO, ANA;
PÁEZ MEIRELES, ROLANDO y
ANASAGASTI ANGULO, LORENZO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 619 632 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 estables que contienen interferones gamma y alfa en proporciones potenciadoras

La presente invención se relaciona con la biotecnología y las ciencias médicas, en particular con formulaciones farmacéuticas estabilizadas que contienen a los interferones recombinantes gamma y alfa en proporciones sinérgicas para la inhibición del crecimiento celular en diferentes tejidos u órganos de los seres humanos.

Estado de la técnica

La variedad de efectos de los interferones tipo I (en inglés "Interferons", abreviado IFNs) crea un gran potencial terapéutico de aplicaciones. La aplicación de IFNs es beneficioso en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, entre los que se incluyen las leucemias (US 5830455), carcinomas baso celulares (US 5028422), carcinoma de células escamosas (US 5256410), cáncer de mama (US 5024833), tumores gastrointestinales (US 5444064; 5814640), y queratosis actínica (US 5002764). Diferentes tipos celulares muestran una sensibilidad diferenciada a los IFNs, y las concentraciones para inhibir su crecimiento pueden variar en un rango amplio (Borden E., et al. (1981) Progress in Hematology, vol XII, Brown EB., editor, 299-339), el cual ejemplifica las diferencias en cuanto a su capacidad para inhibir el crecimiento celular (Dahl H. (1983). Human interferon and cell growth inhibition. VII. Reversibility of interferon activities. J Interferon Res, 3:327-332; Willson J.K.V., Bittner G., et al. (1984) Antiproliferative activity of human interferons against ovarian cancer cells grown in human tumor stem cell assay. J Interferon Animal, 4:441-447; Hu R., Gan Y., et al. (1993) Evidence for multiple binding sites for several components of human lymphoblastoid interferon-alfa. J Biol Chem, 268:12591-12595), y a la actividad antitumoral (Quesada JR., Talpaz M., et al. (1986) Clinical toxicity of interferons in cancer patients: to review. J Clin Oncol, 4:234-243).

El uso de los IFNs en la terapia del cáncer no ha satisfecho las expectativas que los ensayos in vitro y las propiedades de estas potentes moléculas biológicas poseen. Diferentes regímenes han sido probados sin efectos beneficiosos claros y de impacto (Strander H., y Oberg K., (1992) Clinical use of interferons. Solid tumors INTERFERON. Principles and Medical Applications. Publishing Baron S., Copenhagen DH., Dianzani F., Fleischmann WR., Jr. Hughes TK., Jr. Klimpel GR., Niesel DW., Staton GJ., and Tying SK., 533-561).

En un esfuerzo por alcanzar mejores efectos en las terapias, los IFNs se han empleado en dosis altas, pero no aparece la respuesta potencial beneficiosa esperada debido a diversos factores, entre ellos las reacciones adversas que se producen con dichas dosis (Lane H. C. (1990) Interferon-alfa in patients with asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) infection. A randomized, placebo-controlled trial. Annals of internal Medicine, 112:805-811).

Además, los IFNs han sido usados en forma combinada explotando sus efectos sinérgicos. La combinación de IFN alfa e IFN gamma se ha descrito en estudios in vitro con cultivos de fibroblastos de queloides (Tredget EE., Wang R, et al. (2000) Transforming growth factor-beta mRNA and protein in hypertrophic scar tissues and fibroblasts: antagonism by IFN-alfa and IFN-gamma in vitro and in vivo. J Interferon Cytokine Animal, 20:143-151). En este trabajo se menciona la utilización combinada de los IFNs alfa y gamma, pero los estudios se hacen in vitro y en células provenientes de queloides en niños. Estos autores no realizaron ningún ensayo clínico y no evaluaron el efecto de la combinación de IFNs en células de queloides de adultos, que responden menos a los interferones.

La patente EP 0107498 muestra la combinación de los interferones alfa y gamma en la línea celular de melanoma Hs294T, pero no se describe este efecto en otros tipos de células como cultivos primarios de carcinoma baso celular, o de un glioblastoma (GL-5), o de un carcinoma de laringe (HEp-2).

La utilización alternada de IFN alfa natural e IFN gamma recombinante también se ha descrito para el tratamiento para la metástasis renal y de pulmón (Fujii A., Yui-In K., et al. (1999) Preliminary results of the alternating administration of natural interferon-alfa and recombinant interferon-gamma for metastatic renal cell carcinoma BJU Int.; 84:399-404). La combinación de IFN alfa 2, o alfa 4 o el híbrido delta 4 alfa 2 BgIII alfa 1 con IFN gamma fue descrita en las líneas celulares RT4 (carcinoma de vejiga) y en A2182 (adenocarcinoma de pulmón) y posee un efecto antiproliferativo superior a las de tipo I de IFNs o al IFN gamma solo, (Hubbell H. R, Craft J.TO., et al. (1987) Synergistic antiproliferative effect of recombinant alfa-interferons with recombinant gamma-interferon. J Biol Response Mod, 6:141-153). Un efecto sinérgico entre el IFN gamma (1000 UI/mL) y el IFN alfa 2 (1000 UI/mL) se mostró en la línea celular A459 (tumor alveolar), (Martyre M. C., Beaupain R., et al. (1987) Potentiation of antiproliferative activity by mix of human recombinant IFN-alfa 2 and -gamma on growth of human cancer nodules maintained in continuous organotypic culture. Eur J Cancer Clin Oncol, 23:917-920), así como en líneas celulares establecidas de carcinoma anaplásico de células grandes (Hand A., Pelin K., et al. (1993) Interferon-alfa and interferon-gamma combined with chemotherapy: in vitro sensitivity studies in non-small cell lung cancer celllines. Anticancer Drugs, 4:365-368).

La combinación de IFN alfa e IFN gamma se ha descrito en estudios con la línea celular HepG2, (Mizukoshi E., Kaneko S., et al. (1999) Up-regulation of type I interferon receptor by IFN-gamma. J Interferon Cytokine Animal, 19:1019-1023) y en la línea celular AVA5 (Okuse C., Rinaudo J. A., et al. (2005) Enhancement of antiviral activity against hepatitis C virus in vitro by interferon combination therapy. Antiviral Animal, 65:23-34). Estos autores no determinan el efecto antiproliferativo, ni las proporciones más efectivas en la combinación de los interferones alfa y gamma en la línea celular

HepG2. Además, se ha explorado el efecto sinérgico para TNF alfa e IFN gamma en la línea celular Hepa1-6, un hepatoma de murino (Sasagawa T., Hlaing M., et al. (2000) Synergistic induction of apoptosis in murine hepatoma Hepa1-6 cells by IFN-gamma and TNF-alfa. *Biochem Biophys Res Commun*, 272:674-680).

En la patente estadounidense 5190751 se describe la inhibición del crecimiento de líneas celulares de leucemias de tipo B y de tipo T por la combinación de IFN alfa y gamma. En ninguna de las líneas de células T evaluadas se observó la potenciación del efecto inhibitorio de crecimiento, y en ciertas condiciones experimentales los efectos de las combinaciones fueron antagónicos. En la patente EP 010749 y en una publicación (Czarniecki C. W., Fennie C. W., et al. (1984) Synergistic antiviral and antiproliferative activities of Escherichia coli-derived human alfa, beta, and gamma interferons. *J Virol*. 49:490-496), se muestra también que la combinación de los IFNs alfa y gamma no siempre es sinérgica y puede ser antagónica. Se describe la eficacia de las combinaciones en un intervalo muy amplio, pero no se muestra.

Estos datos indican que el empleo de combinaciones de IFN alfa y gamma debe ser evaluado para una definición experimental que permita identificar qué condición es la favorable para establecer una combinación óptima para el tratamiento de un crecimiento celular inadecuado en tejidos u órganos dados. Por tal motivo, para sustentar una terapia y dosis adecuadas estas deben ser evaluadas en experimentos in vitro y en ensayos clínicos controlados.

En un estudio con líneas celulares de Gliomas, el IFN gamma afectó las características de malignidad tales como la proliferación y la migración de las células tumorales estudiadas (Knupfer M. M., Knupfer H., et al. (2001) Interferon-gamma inhibits growth and migration of A172 human glioblastoma cells. *Anticancer Animal*, 21 :3989-3994). De otra manera, se han reportado resultados negativos con el empleo de IFN gamma para tratar los gliomas (Mahaley M. S., Bertsch L., Jr. et al. (1988) Systemic gamma-interferon therapy for recurrent gliomas. *J Neurosurg*, 69:826-829). El empleo de forma simultánea de IFN gamma e IFN beta ha resultado ser eficiente en la inhibición del crecimiento de la línea celular GBM-18, un astrocitoma multifármaco-resistente (Reddy P. G., et al. (1991) Systemic gamma-interferon therapy for recurrent gliomas. *J Natl Cancer Inst*, 83:1307-1315). Se ha descrito además, la combinación de IFN gamma con alfa-difluorometilornitina (DFMO) para el tratamiento de estos tumores (US 4499072). La patente US 5002879, describe una terapia similar que utiliza DFMO junto a células asesinas activadas por linfocinas e IL-2. Con respecto a IFN alfa, su combinación con otros fármacos no ha tenido efectos favorables en el tratamiento de los gliomas, y ha mostrado toxicidad (Buckner J. C., Burch P. A., et al (1998) Phase II trial of recombinant interferon-alfa-2a and efflornithine in patients with recurrent glioma. *J Neurooncol*. 36:65-70; Chang S. M., Barker F. G., et al. (1998) High dose oral tamoxifen and subcutaneous interferon alfa-2a for recurrent glioma. *J Neurooncol*, 37:169-176). Entonces, el tratamiento de este tipo de tumor puede ser favorecido por el uso combinado del IFN alfa y el IFN gamma, sobre la base de una adecuada selección de las proporciones de su combinación basado en experimentos in vitro y en ensayos clínicos.

La laringe es el segundo sitio más frecuente de cáncer del tracto aero-digestivo superior después de la cavidad oral. El carcinoma de laringe es el tumor más frecuente de cabeza y cuello y el cáncer de laringe más común es el carcinoma de células escamosas (95 % de todos los casos). La supervivencia en los casos de tumores T3 y T4 de laringe es de solo 5 años en aproximadamente el 30 % de los pacientes sometidos a laringectomía (Djordjevic V., Milovanovic J., et al. (2004) Radical surgery of the malignant laryngeal tumors. *Actas de Chir Lugosl*, 51:31-35). Se ha mostrado que la radioterapia y la quimioterapia no son efectivas para el tratamiento de este carcinoma (Chen W., Guo X., et al. (2004) Long-term follow-up observation of clinical therapy for laryngeal carcinoma recurrence and cervical metastasis *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 18:536-537).

Sin embargo, la poliquimioterapia junto al empleo de IFN alfa ha resultado beneficiosa en el tratamiento del cáncer de laringe (Mantz C. A., Vokes E. E., (2001) Sequential induction chemotherapy and concomitant chemoradiotherapy in the management of locoregionally advanced laryngeal cancer *Ann Oncol*, 12:343-347). La combinación de IL-2 e IFN alfa fue evaluada en un ensayo fase II como terapia para el carcinoma de laringe, pero los resultados no fueron satisfactorios (Clayman G. L., Young G., et al. (1992) Detection of regulatory factors of lymphokine-activated killer cell activity in head and neck cancer patients treated with interleukin-2 and interferon alfa. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 101:909-915). Pocos avances existen en la terapéutica de los tumores de laringe. El uso combinado de los IFNs alfa y gamma podría contribuir a mejorar las terapias existentes para combatir este tipo de tumores.

La patente estadounidense No. 5503828 describe una composición de interferones caracterizada por contener al menos 50% de los alelos de IFN alfa 2 e IFN alfa 8 y uno o más especies adicionales de IFNs de un grupo formado por IFN alfa 4, alfa 7, alfa 10, alfa 16, alfa 17, y alfa 21. Mientras, la patente estadounidense No. 4503035 muestra una preparación de algunas especies de IFN alfa, pero que no incluye al alfa 1, alfa 5, alfa 14, y al IFN omega. Estas patentes no describen una formulación formada por la combinación de IFN gamma e IFN alfa 2 recombinantes.

La patente estadounidense No. 5762923 detalla una composición líquida de interferón diluida en agua con un detergente no iónico y alcohol bencílico en cantidades suficientes para estabilizar al IFN alfa que contiene, además, un regulador ácido de pH. Por otra parte, la patente estadounidense No. 4847079 describe una composición farmacéutica de interferón y timerosal, mientras que la patente estadounidense No. 4675184 muestra una formulación de interferón con alcohol polihídrico y un regulador orgánico de pH como estabilizador y un portador o diluyentes convencionales de pH 3-6. La composición puede tener adicionalmente un surfactante aniónico y/o albúmina como estabilizador. En las

patentes estadounidenses Nos. 5236707 y 5431909 se describen aminos como estabilizantes (aminas primarias alifáticas) y sales orgánicas de litio, que protegen al interferón de la degradación y lo estabilizan.

La patente estadounidense No. 4496537 se refiere a formulaciones líquidas estables de interferón-alfa que incluyen composición de albúmina de suero humana, y alanina o glicina, agua y un sistema regulador de pH capaz de mantener el pH entre 6.5 y 8.0.

La patente estadounidense No. 5935566 describe formulaciones estables de interferón-alfa que incluyen en su composición un sistema regulador de pH capaz de mantener el pH en el intervalo de 4.5 a 7.1, polisorbato 80 como estabilizador, EDTA como agente quelante, cloruro de sodio como agente isotonzante, y m-cresol como preservativo antimicrobiano. La patente US 0170207 describe formulaciones acuosas estables de interferón-alfa que incluyen en su composición un sistema regulador de pH capaz de mantener el pH en el rango de 4.5 a 9.0, un agente estabilizador, un surfactante no iónico y un regulador de la presión osmótica.

El documento US 20030170207 describe formulaciones estables de interferón-alfa que incluyen en su composición un sistema regulador de pH capaz de mantener el pH en el intervalo de 4.5 a 9.0, un agente estabilizante, un surfactante no iónico y un regulador de la presión osmótica.

En la solicitud WO 89/04177 se describen formulaciones farmacéuticas líquidas de interferón-gamma que contienen una solución reguladora de pH que mantiene el pH en el intervalo de 4.0 a 6.0, un azúcar polihidroxilado como estabilizador y un detergente no iónico. La patente estadounidense No. 4895716 se refiere a composiciones y métodos para la estabilización del interferón-gamma con ácido lactobiónico en una solución reguladora de acetato/glicina.

La patente estadounidense No. 5676942 describe composiciones farmacéuticas formadas por subtipos de interferones del tipo I obtenidos de fuentes naturales, pero no combinados con el interferón gamma y no define las proporciones de esas combinaciones, solo describe esas combinaciones para infecciones virales y no para el tratamiento de tumores. En ninguno de los reportes descritos anteriormente se ha utilizado, caracterizado o mencionado una formulación farmacéutica que contenga los IFNs recombinantes gamma y alfa 2 juntos en combinaciones sinérgicas. Existen potencialidades en la utilización combinada para IFN gamma e IFNs tipo I cuando se mezclan en proporciones definidas para el tratamiento del crecimiento celular que tiene grados variables de resistencia a terapias establecidas y/o sus combinaciones.

Teniendo en cuenta estas premisas, se hace necesario el desarrollo de formulaciones farmacéuticas estables que contengan estos IFNs en proporciones que permitan su uso de forma amplia, sencilla, eficiente y segura, en individuos con formaciones tisulares benignas o malignas que así lo necesiten. Esto permitirá un manejo más óptimo de las combinaciones y proporciona un uso de la terapéutica en pacientes necesitados de este tratamiento.

Explicación de la invención

La presente invención resuelve el problema antes mencionado, proporcionando formulaciones farmacéuticas estables de acuerdo con la reivindicación 1. En la presente se describen formulaciones para ser aplicadas por vía parenteral (formulaciones liofilizadas). Estas contienen diferentes cantidades de los interferones recombinantes gamma y alfa en proporciones sinérgicas para el tratamiento de eventos patológicos que contemplan el crecimiento no fisiológico benigno o maligno de tejido o de órganos y que contiene además excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Estas formulaciones son el resultado de los ensayos in vitro con líneas celulares de diferente sensibilidad a IFNs y de ensayos clínicos en diferentes entidades oncológicas, así como de la evaluación de estabilidad físico-química y biológica de los IFNs gamma y alfa 2 recombinantes en presencia de los diferentes excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las formulaciones farmacéuticas estables liofilizadas se componen de los IFN gamma y alfa 2 recombinantes mezclados en una solución reguladora de pH capaz de mantener el pH entre 4.9 y 7.5, la cual puede ser el acetato de amonio o de sodio, el succinato de sodio, el fosfato de sodio y/o potasio o el citrato/fosfato de sodio.

Estas formulaciones también están compuestas de al menos un componente seleccionado de compuestos de azúcares no reductores, aminoácidos, surfactantes y polímeros estabilizantes. Los azúcares no reductores pueden ser la sacarosa o la trehalosa; los aminoácidos pueden ser la glicina, la histidina o la leucina; mientras que como surfactantes se describen al polisorbato 20 o el polisorbato 80 y como polímero estabilizante al polietilenglicol, el dextrano o el almidón de hidroxietilo.

Como una materialización de la invención se define que la solución reguladora de pH debe ser empleada en un intervalo de concentración entre 10 y 20 mM; la sacarosa o la trehalosa entre 5 y 100 mg/mL; la glicina, la histidina o la leucina deben emplearse en un intervalo de concentración entre 1 y 20 mg/mL. El polisorbato debe emplearse entre 0,01 y 1 mg/mL, mientras que el polietilenglicol, el dextrano, o el almidón de hidroxietilo se emplean en un intervalo de concentración entre 5 y 50 mg/mL.

- 5 Varias materializaciones de la invención describen formulaciones farmacéuticas estables liofilizadas que contienen IFN gamma recombinante en un intervalo de concentración entre 5.6×10^8 UI y 1.4×10^8 UI e IFN alfa 2 recombinante en un intervalo de concentración entre 6.8×10^8 UI y 1.7×10^8 UI. O IFN gamma recombinante en un intervalo de concentración entre 2.0×10^8 UI y 0.5×10^8 UI e IFN alfa 2 recombinante en un intervalo de concentración entre 12.0×10^8 UI y 3.0×10^8 UI. O IFN gamma recombinante en un intervalo de concentración entre 4.0×10^8 UI y 1.0×10^8 UI e IFN alfa 2 recombinante en un intervalo de concentración entre 80×10^8 UI y 20×10^8 UI. Las formulaciones contienen adicionalmente 0.0802 g de di-hidrofosfato de potasio, 0.249 g hidrofosfato disódico hidratado, 4 g de sacarosa, 0.8 g de glicina, 0.03 g de Tween 20, 1 g de polietilenglicol 6000, y agua para suficiente cantidad de inyección para 100 mL y para 0.5 mL, 1 mL, 5 mL y 10 mL en las respectivas proporciones equivalentes.
- 10 La definición para mezclar IFN gamma recombinante e IFN alfa recombinante en un intervalo de combinación definida fue obtenida después de un análisis de isoblograma. La concentración de IFN gamma recombinante entre 5.6×10^8 UI y 1.4×10^8 UI e IFN alfa 2 recombinante en un intervalo de concentración entre 6.8×10^8 UI y 1.7×10^8 UI, en una de las formulaciones farmacéuticas estables liofilizadas se logró a partir del análisis de los estudios de la inhibición del crecimiento del cultivo primario provenientes de queloides (Kel 5a, Kel 17a) y del BCC III. Después de un análisis de
- 15 isoblogramas se identificó la combinación de 100 UI/mL (10 ng/mL) para IFN gamma recombinante con 100 UI/mL (0.5 ng/mL) de IFN alfa 2b recombinante que reduce el crecimiento celular in vitro en un 21%, 43% y 47%, respectivamente (ver ejemplos 1, 2 y 3, figuras 1, tabla 1).
- 20 La mezcla de IFN gamma recombinante en un intervalo de concentración entre 2.0×10^8 UI y 0.5×10^8 UI e IFN alfa 2 recombinante en un intervalo de concentración entre 12.0×10^8 UI y 3.0×10^8 UI para la formulación se definió utilizando un ensayo clínico y reporte de casos tratados por compasión. El ensayo clínico aleatorizado, controlado y triple a ciegas evaluó la eficacia del tratamiento intralesional (I.L.) en pacientes con carcinoma baso celular utilizando la formulación liofilizada estable definida antes (ver ejemplo 7, tablas 9, 10, 11 y 12).
- 25 En el reporte de casos tratados por compasión, que también contribuyó a definir estas proporciones, fueron tratados casos de carcinoma epidermoide (paciente 1) y un paciente con múltiples carcinomas baso celulares recidivantes y con injertos previos (paciente 2), (ver ejemplo 8 figuras 5 a, b, c, d; paciente 1, y figuras 6 a, b, c; paciente 2, respectivamente).
- 30 La formulación que contiene IFN gamma recombinante en un intervalo de concentración entre 4.0×10^8 UI y 1.0×10^8 UI e IFN alfa 2 recombinante en un intervalo de concentración entre 80×10^8 UI y 20×10^8 UI se definió con el análisis de los resultados del estudio de la inhibición del crecimiento de las células del glioblastoma (GL-5) por la combinación de 50 UI/mL (5 ng/mL) de IFN gamma recombinante con 100 UI/mL (0.5 ng/mL) de IFN alfa 2b recombinante. De esta manera se logra una inhibición del crecimiento del 55% (ejemplo 3). Adicionalmente, se tomó en cuenta el análisis del estudio con la línea celular HEp-2. En este caso las cantidades de IFNs son de 5 UI/mL (0.5 ng/mL) de IFN gamma recombinante con 75 UI/mL (0.375 ng/mL) de IFN alfa 2b recombinante. Con con esto, se logra una combinación óptima para reducir el crecimiento celular in vitro en un 76% (ver ejemplos 1, 2 y 3).
- 35 Adicionalmente fueron desarrolladas formulaciones farmacéuticas líquidas estables. En estas formulaciones se mantuvieron las proporciones de los IFNs gamma y alfa recombinantes tal como se han descrito para las formulaciones liofilizadas, pero sus otros ingredientes farmacéuticos variaron para lograr una mayor estabilidad para estas mezclas de los IFNs.
- 40 Como resultado de este trabajo, en la presente se describen formulaciones farmacéuticas estables líquidas que contienen una solución reguladora de pH y al menos un componente seleccionado de azúcares no reductores, aminoácidos, surfactantes, polímeros estabilizantes, compuestos antioxidantes/quelantes y agentes isotonzantes. Estas formulaciones emplean un solvente a base de agua que puede contener o no agentes preservantes tal como la mezcla de metilo- y propilo-parabeno.
- 45 En la presente también se describen formulaciones farmacéuticas estables líquidas que emplean una solución reguladora de pH capaz de mantener el pH entre 4.9 y 6.5. Este regulador de pH puede ser acetato de amonio o de sodio, succinato de sodio, fosfato de sodio y/o potasio, citrato/fosfato. Estas formulaciones pueden emplear como surfactantes el polisorbato 20 o polisorbato 80; como antioxidante/quelante el EDTA o la cisteina-acetilo; mientras que como aminoácidos pueden usarse la histidina, L-arginina, L-alanina, glicina o la lisina. Como polímero estabilizante se define la utilización del almidón de hidroxietilo o el dextrano y como agente isotonzante el cloruro de sodio, el cloruro de
- 50 potasio, el propilenglicol, el manitol, el glicerol, la sacarosa o la trehalosa.
- 55 En la presente también se describen formulaciones farmacéuticas estables líquidas emplean una solución reguladora de pH en un intervalo de concentración entre 10 y 100 mM. En esta formulación el polisorbato se emplea en un intervalo de concentración entre 0,01 y 1 mg/mL; el EDTA o la cisteina-acetilo se emplean en un intervalo de concentración entre 0,01 y 1 mg/mL. Los aminoácidos histidina, L-arginina, L-alanina, glicina o lisina se encuentran a una concentración entre 1 y 20 mg/mL; el almidón de hidroxietilo y el dextrano se emplean en un intervalo de concentración entre 5 y 50 mg/mL y los agentes isotonzantes se encuentran en cantidad suficiente para hacer isotónica la solución.

- Otras materializaciones de la descripción explican las cantidades de todos los ingredientes farmacéuticos de las formulaciones farmacéuticas líquidas estables que son necesarias para la estabilidad físico química y biológica de las mezclas de los IFNs gamma y alfa recombinantes, descritos previamente. Además de los IFNs, estas formulaciones líquidas contienen 0.708 g de acetato de sodio, 0.079 mL de ácido acético, 0.01 g de Tween 20, 5 g de manitol, y agua para suficiente cantidad de inyección para 100 mL y para 0.5 mL, 1 mL, 5 mL y 10 mL en las proporciones equivalentes respectivas.
- Esta invención define las proporciones de mezclas de IFNs gamma y alfa que pueden ser rentables para el tratamiento del crecimiento celular benigno o maligno. Esto permitirá emplear dosis más pequeñas, menos tiempo de tratamiento y mantener los mismos efectos terapéuticos o lograr efectos superiores a los que se han alcanzado hasta hoy con el empleo de los interferones en el tratamiento de los tumores u otros eventos aberrantes de crecimiento celular. Disminuir las dosis permitirá esperar menos efectos adversos o menor intensidad de los mismos, lo que dará una mejor calidad de vida a los pacientes y les permitirá obtener los beneficios del uso de estas potentes drogas.
- La invención define las formulaciones de la mezcla de IFN gamma e IFN alfa 2 recombinantes que no han sido descritas previamente, que facilitan el manejo y el uso clínico de esta combinación terapéutica y su comercialización.
- Las formulaciones farmacéuticas estables liofilizadas y líquidas que contienen mezclas de los IFNs gamma y alfa 2 recombinantes en proporciones sinérgicas para la inhibición de la proliferación descritas en la presente tiene un amplio espectro de uso clínico. Se muestra in vivo utilizando estas formulaciones que en enfermedades oncológicas importantes es efectiva la combinación del IFN gamma y el IFN alfa 2 recombinantes cuando se utiliza simultáneamente y de forma intratumoral.
- Esta combinación es capaz de tener iguales efectos curativos sobre tumores en menor tiempo y con un resultado estético superior comparado con el que se obtiene por sus componentes por separado. El uso de estas combinaciones permitirá contar con mayores posibilidades terapéuticas para combatir el cáncer. Esto se recoge en una materialización de la invención donde se expone que las formulaciones liofilizadas pueden emplearse en el tratamiento de tumores sólidos benignos o malignos, cuando se utilizan de formas independientes o combinadas con quimioterapia, radioterapia o la combinación de ambas.
- La utilización de estas formulaciones en combinación con otros agentes terapéuticos se sustenta en los resultados obtenidos con el tratamiento de un paciente con un tumor baso celular gigante con la combinación de IFN gamma e IFN alfa 2 recombinantes junto con cisplatino (ver ejemplo 10 y figura 9).
- Se describe en la invención cómo el empleo combinado de los interferones gamma y alfa 2 permite reducir y/o curar tumores de muy mal pronóstico y de efectos estéticos deformantes.
- De acuerdo con las características de varias entidades oncológicas y benignas donde predomina un crecimiento no controlado de células, estas pueden ser susceptibles a ser tratadas con estas formulaciones. Entre éstas están: tumores del tejido hematopoyético tales como la leucemia mieloide, aguda o crónica, leucemia linfocítica, aguda o crónica, así como las leucemias de células T, de células B, y el linfoma del sistema nervioso central. También pueden ser tratados los carcinomas de laringe, la papilomatosis laríngea, el lipoma, el quiste epidermoide e intradérmico, el liposarcoma, el neurofibroma, y la hiperplasia sebácea. Pueden ser beneficiados con el uso de estas formulaciones tumores del sistema nervioso central y periférico como los astrocitomas, glioblastomas multiformes, ependimomas, ganglioneuromas, astrocitomas pilocíticos, gliomas mezclados, oligodendrogliomas, gliomas del nervio óptico, tumores neuroectodérmicos primitivos, neuromas acústicos, cordomas, craneofaringiomas, meduloblastomas, meningiomas, neurofibromatosis, pseudotumores de cerebro, esclerosis tuberosa, tumores cerebrales metastásicos. Otros tumores susceptibles a ser tratados son los hemangiomas cavernosos, adenomas hepatocelulares, las hiperplasias nodulares focales, tumores pineales, adenomas pituitarios, tumores vasculares, tumores neuroectodérmicos meningeal, angiomas en forma de cereza, hiperplasia de las glándulas sebáceas. El tratamiento de tumores de piel como el carcinoma basocelular, el carcinoma de células escamosas, el dermatofibroma, el granuloma piogénico, el nevus dérmico, así como queratosis seborreica y queratosis actínica puede beneficiarse de la terapia con estas formulaciones.
- Otra materialización de la invención describe que estas formulaciones también pueden emplearse para el tratamiento de eventos proliferativos como fibrosis, displasia e hiperplasia.
- De acuerdo con los resultados de los ensayos clínicos realizados y descritos en los ejemplos 7, 8, y 10 como materialización de la invención están definidas formas intramusculares, intratumorales, y perilesionales de aplicación de las formulaciones.
- En la presente también se describe la aplicación de formulaciones farmacéuticas estables tópicas que contienen IFN gamma en un intervalo de concentración entre 0.32×10^6 UI y 0.08×10^6 UI e IFN alfa 2 en un intervalo de concentración entre 2.0×10^6 UI y 0.5×10^6 UI por gramo de semisólido. Las formulaciones son crema compuesta por 2.2% de IFN gamma, 0.58% de IFN alfa, 4% de alcohol cetílico, 10% de vaselina (Vaseline®), 2% de Tween 60, y 0.2% de metilparabeno, propilparabeno. Además, la composición de ungüento se definió por 2.2% de IFN gamma, 0.58% de IFN alfa, 60% de petrolato sólido blanco, 10% de petrolato líquido pesado, 3% de span 20, y 0.2% metilparabeno y

propilparabeno. Finalmente, la formulación de gel está compuesta por 2.2% de IFN gamma, 0.58% IFN alfa, 0.5% de Carbopol 940, 0.2% de metilparabeno y propilparabeno, 0.2% de hidróxido de sodio, 0.01 % de etilendiaminetetraacetato de calcio disodio, y 2% etanol.

5 Todas estas formulaciones son resistentes a las fluctuaciones de temperatura, lo cual es rentable para la fabricación del producto, su transportación y almacenamiento. Las mismas previenen la agregación de los interferones y, por lo tanto, presentan menor riesgo de resultar inmunogénicas durante el uso prolongando del producto. Las formulaciones de semisólidos permiten el empleo por los propios pacientes de forma segura y no invasiva.

10 Como otra materialización de la descripción se definió el empleo de estas formulaciones estables tópicas en el tratamiento de tumores sólidos benignos o malignos de la piel o las membranas mucosas, que se utilizan de formas independientes o combinadas con quimioterapia, radioterapia o la combinación de ambas.

15 Otra materialización de la descripción describe que las formulaciones farmacéuticas estables tópicas pueden ser empleadas para el tratamiento de lipoma, quiste epidermoide, quiste intradérmico, liposarcoma, neurofibroma, hiperplasia sebácea, hemangiomas, hiperplasia nodular focal, ependimomas, ganglioneuromas, astrocitomas pilocíticos, meningiomas, tumores pineales, adenomas pituitarios, tumores vasculares, carcinomatosis meningeal, neurofibromatosis, angiomas en forma de cereza, hiperplasia de las glándulas sebáceas, carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas, dermatofibroma, granuloma piogénico, nevus dérmico, queratosis seborreica, queratosis actínicas, y condilomas.

20 Otra materialización de la descripción describe la conformación de un kit de reactivos que contiene un vial de IFN gamma recombinante, un vial de IFN alfa recombinante a las concentraciones y relaciones descritas anteriormente, junto a una cantidad suficiente de viales con agua para viales de inyección, para la dilución y/o disolución de los IFNs. El kit contiene jeringuillas y agujas adecuadas para la administración simultánea de los IFNs, previamente mezclados en uno de los viales que contiene a uno de los IFNs.

Breve descripción de las Figuras:

25 Figura 1. Inhibición del crecimiento de cultivo primario de células de fibroblastos procedentes de biopsias de pacientes adultos con queloides por 1000 UI/mL de IFN gamma o IFN alfa 2 recombinantes.

Figura 2. Isoblograma de la inhibición del crecimiento celular por la combinación de IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes sobre el cultivo celular primario de fibroblastos de queloides (Kel5a).

Figura 3. Isoblograma de la inhibición del crecimiento celular por la combinación de IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes sobre el cultivo celular primario de fibroblastos de queloides (Kel17a).

30 Figura 4. Isoblograma de la inhibición del crecimiento celular por la combinación de IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes sobre el cultivo celular primario de carcinoma basocelular (CBC III).

Figura 5. Isoblograma de la inhibición del crecimiento celular por la combinación de IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes sobre la línea celular del glioblastoma GL-5.

35 Figura 6. Isoblograma de la inhibición del crecimiento celular por la combinación de IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes sobre la línea celular del carcinoma de laringe HEP-2.

Figura 7. Paciente con carcinoma epidermoide tratado con la combinación de IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes.

Figura 8. Paciente con carcinoma basocelular recidivante tratado con la combinación de IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes.

40 Figura 9. Paciente con carcinoma basocelular recidivante tratado con la combinación de IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes y cisplatino. A: antes del tratamiento, B: después de 1 año de tratamiento

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos 1-6 y 8-10 ejemplos de referencia 7 y 11-14 (que no forman parte de la invención)

Ejemplo 1. Inhibición del crecimiento celular por los IFNs gamma o alfa recombinantes sobre cultivos celulares primarios.

45 Las biopsias de piel se obtuvieron de piel normal y de pacientes que desarrollaron carcinoma basocelular o queloide, este último debido a daño por cirugía o quemaduras. La muestra de tejido fue colocada inmediatamente en medio DMEM y fue fragmentada para obtener cultivos primarios por el método de explantes. Para la evaluación del efecto antiproliferativo de los IFNs gamma y alfa recombinantes se evaluaron los siguientes cultivos: Cultivo primario de fibroblastos (CPF) de queloides (1, 2, 5, 7, 8, 15, 17, 19, 20, 24, 26, 27, 31, 32), CPF de un carcinoma basocelular (CBC

111) y CPF de piel normal (FibN3 y FibN5). Los CPF se cultivaron en una mezcla de medios de cultivo RPMI-1640/DMEM que contenían gentamicina (50 µg/ml) y 12% de suero fetal bovino (SFB). Todos los cultivos fueron incubados a 37°C en una incubadora de CO₂ con 5% de humedad. Para determinar el efecto antiproliferativo de los IFNs, las células se sembraron a 5 x 10⁴ células/mL en placas de 96 pocillos. Se sincronizaron por cambio de medio fresco después de 24 horas de ser sembradas. Al término de 96 horas de incubación en presencia de diferentes concentraciones de los IFNs se determinó la viabilidad de 3 réplicas de condiciones experimentales evaluadas utilizando el método de tinción por cristal violeta, midiendo la absorbancia a 580 nm y utilizando un lector de placas. Los resultados se definieron como el % de crecimiento basado en el conteo de células viables:

$$\% \text{ de crecimiento} = (AT_{72h} - AC_{0h} / AC_{72h} - AC_{0h}) \times 100.$$

AT_{72h} = Absorbancia de células tratadas 72h.

AC_{72h} = Absorbancia de células tratadas de control 72h.

AC_{0h} = Absorbancia de células antes de ser tratadas con IFN.

En la figura 1 se muestra la acción antiproliferativa de los IFNs gamma o alfa recombinante sobre el crecimiento de los CPF de queloide. Como puede observarse, IFN gamma o alfa 2b inhibe la proliferación celular en diversos cultivos primarios, mientras que otros estimulan el crecimiento. Como controles fueron evaluados los cultivos primarios FibN3 y FibN5, como también los cultivos primarios de CBC III, y líneas celulares como la HEP-2, U1752 y GL-5.

Ejemplo 2: Inhibición del crecimiento celular mediante IFNs gamma o alfa recombinantes en líneas celulares establecidas.

Se estudiaron las líneas celulares humanas Jurkat (ATCC, TIB-152), GL-5 (Perea S.E., et al. (1993) Acta Cient Venez, 44:22-27), HEP-2 (ATCC, CCL23). Las células GL-5 fueron cultivadas en DMEM, y las HEP-2 en MEM-CANE que contenían gentamicina (50 µg/ml) y 10% SFB. Las células Jurkat fueron incubadas en medio RPMI con gentamicina y 10% SFB. Todos los cultivos fueron incubados a 37°C en una incubadora de CO₂ con 5% de humedad. Para evaluar el efecto antiproliferativo en células GL-5 y las HEP-2 fueron sembradas a 3 x10⁴ células/mL. En el caso de las células Jurkat estas se sembraron a 10⁵ células/mL. Después de 72 horas de incubación en presencia de diferentes concentraciones de los IFNs se determinó la viabilidad de 3 réplicas, utilizando el método de tinción por cristal violeta y midiendo la absorbancia a 580 nm y utilizando un lector de placas. Los resultados se definieron como el porcentaje (%) de crecimiento basado en el conteo de células viables según se describe en el ejemplo 1. Como se observa en la tabla 1 y en la figura 1, las líneas celulares HEP-2 (carcinoma de laringe) y el GL-5 (de un glioblastoma), son muy sensibles al IFN gamma y no al IFN alfa.

Tabla 1. Inhibición del crecimiento celular por 1000 UI/mL de IFN gamma o IFN alfa 2b sobre líneas celulares.

IFNs	Promedio	Desviación Estándar DS	Coefficiente de Variación CV	Réplicas	Ensayos
	HEp-2				
IFN Alfa 2	65%	13.68%	0.211	6	2
IFN gamma	18%	6.26%	0.357	6	2
	GL-5				
IFN Alfa 2	71%	20.26%	0.287	6	2
IFN gamma	24%	10.21%	0.421	4	2
	HepG2				
IFN Alfa 2	103%	13.17%	0.128	6	1
IFN gamma	106%	21.67%	0.204	6	1
	Jurkat				
IFN Alfa 2	60%	5.28%	0.088	3	1
IFN gamma	107%	16.89%	0.157	3	1

En la tabla 1 se observa que la línea HepG2 (Hepatoma) no es sensible a estos IFNs y que en la línea celular Jurkat (linfoma T), el IFN alfa es el más efectivo, resultado que coincide con el empleo exitoso del IFN alfa 2 en el tratamiento de tumores de tejido linfóide.

Ejemplo 3: Combinaciones de los IFNs gamma y alfa recombinantes con acción antiproliferativa más efectiva sobre los cultivos primarios y líneas celulares.

Utilizando los CPF del CBC-III y de los queloides Kel-5a y Kel-17a y las líneas celulares HEP-2 y GL-5, se realizaron estudios de combinaciones con IFNs gamma y alfa 2b recombinantes, para definir mezclas óptimas con actividad sinérgicas de la inhibición del crecimiento celular. Los datos obtenidos en los estudios fueron analizados construyendo

isobologramas. De los estudios de isobologramas de los CPF provenientes de biopsias de queloides en adultos (kel 5a y kel 17a) se definió que la combinación sinérgica óptima para la inhibición del crecimiento debe estar compuesta de 100 UI/mL (10 ng/mL) de IFN gamma y 100 UI/mL (0.5 ng/mL) de IFN alfa 2b. Con esa combinación se reduce el crecimiento celular in vitro en un 21 % (Kel 5a) y en un 43 % (kel 17a) (figuras 2 y 3).

- 5 En el isoblograma de la figura 4 se muestra que la combinación de 100 UI/mL (10 ng/mL) de IFN gamma con 100 UI/mL (0.5 ng/mL) de IFN alfa 2b es sinérgica y la más eficiente para reducir el crecimiento celular in vitro del CBC III en un 47%.

- 10 Según el isoblograma que se muestra en la figura 5, la combinación sinérgica óptima para inhibir el crecimiento de las células del GL-5 es de 50 UI/mL (3 ng/mL) de IFN gamma con 600 UI/mL (5 ng/mL) de IFN alfa 2b. Con esa combinación se reduce el crecimiento celular in vitro en un 55%.

En el isoblograma representado en la figura 6 se muestra la combinación sinérgica óptima de IFN gamma y alfa para obtener el mejor efecto antiproliferativo sobre las células HEP-2. Las cantidades de IFNs son de 5 UI/mL (0.5 ng/mL) de IFN gamma con 75 UI/mL (0.375 ng/mL) de IFN alfa 2b. Con esa combinación óptima se logra una reducción del crecimiento celular in vitro en un 76%.

- 15 Ejemplo 4: Efecto del pH, las especies iónicas y la concentración de la solución reguladora de pH en la estabilidad de la mezcla de los interferones alfa-2b y gamma en solución acuosa.

- 20 Para estudiar la estabilidad de las formulaciones liofilizadas y líquidas de las composiciones sinérgicas de los interferones gamma y alfa recombinantes, los IFNs se diluyeron de su correspondiente Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) en diferentes formulaciones de prueba: soluciones reguladoras de pH, mezcla de soluciones reguladoras de pH con excipientes individuales y mezcla de soluciones reguladoras de pH con diversos excipientes. Muestras representativas de los viales de las diferentes formulaciones fueron sometidas a diferentes tratamientos para evaluar la estabilidad de los interferones: Ciclos de congelación-descongelación, liofilización, agitación a 37°C, efecto de la luz y de la temperatura. Después de los diferentes tratamientos, la estabilidad físico-química fue evaluada mediante diferentes ensayos: apariencia física, electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), cromatografía líquida en fase inversa (RP-HPLC) y cromatografía de exclusión molecular (ME-HPLC). La estabilidad biológica fue evaluada mediante ensayos inmuno-enzimáticos (ELISA) específicos para cada interferón y mediante ensayos biológicos de inhibición del efecto citopatogénico. Todos estos estudios de diseño de formulación se realizaron con la mezcla de concentraciones intermedias de los interferones (0.5 MUI de IFN gamma y 3.0 MUI de IFN alfa 2b). Con las variantes finales de formulación obtenidas (preparadas por duplicado) se prepararon las composiciones sinérgicas y se evaluó su estabilidad.

Características organolépticas: Se determinó mediante análisis de la apariencia de la formulación (si se mantenía incolora, transparente y sin agregación de proteínas). En el caso de ser liofilizada la formulación, también se analizó la apariencia del producto liofilizado.

- 35 La humedad: El contenido de humedad residual del producto liofilizado fue determinado mediante la técnica de titulación yodométrica de Karl Fischer, empleando un medidor de humedad Radiometer (Modelo TIM 550).

- 40 Estabilidad química: La pureza de las proteínas y la magnitud de la degradación se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) en una columna C8 Vydac equipada con un guarda-columna C8 Vydac (Vydac, Hesperia, CA) usando un sistema HPLC Merck-Hitachi equipado con un sistema de liberación de solventes, un detector de arreglo de diodo, un horno y un sistema de manejo de datos. La pureza de las proteínas también se determinó mediante SDS-PAGE.

Determinación de agregados: La agregación del IFN gamma y del IFN alfa 2b recombinantes fue medida por HPLC de exclusión molecular usando una columna Superdex-75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech AS, Suecia) y un sistema HPLC Merck-Hitachi equipado con un sistema de liberación de solventes, un detector de arreglo de diodo, un horno y un sistema de manejo de datos. El contenido de agregados covalentes se determinó mediante SDS-PAGE.

- 45 ELISA de interterón alfa: Este ensayo ha sido desarrollado en nuestro laboratorio (H. Santana., Espino Y., et al. (1999) A sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of recombinant human interferon α -2b. Biotechnology Techniques, 13, 341-346). El ensayo emplea anticuerpos monoclonales y fue realizado siguiendo la metodología reportada. La medición es reportada aquí como porcentaje (%) de la actividad ELISA residual del interferón alfa-2b en las diferentes muestras de cada variante de formulación, tomando la actividad ELISA en la muestra inicial igual al 100 %.

ELISA de interferón gamma: Este ensayo ha sido desarrollado en nuestro laboratorio (Bouyon R., Santana H., et al. (2003) Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for recombinant human gamma interferon. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 24:1-10). El ensayo emplea anticuerpos monoclonales y fue realizado siguiendo la metodología reportada. La medición es reportada aquí como porcentaje (%) de la actividad ELISA

residual del interferón gamma en las diferentes muestras de cada variante de formulación, tomando la actividad ELISA en la muestra inicial igual al 100 %.

Cuantificación de actividad biológica antiviral: La medición de la actividad biológica fue realizada según describe Ferrero J., Ochagavia ME., et al. (1994, Titulación de la actividad antiviral del interferón utilizando el sistema de equipos SUMA. Biotecnología Aplicada, 11:34-42). El cálculo de la actividad biológica se realizó según describe Ferrero J., Duany L., et al. (1997, Nuevo programa de cálculo, cuantificación de la actividad antiviral de interferones mediante la inhibición del efecto citopatogénico utilizando el sistema de equipos SUMA. Biotecnología Aplicada, 14: 267-269). La actividad biológica es reportada aquí como porcentaje de la actividad biológica residual, tomando la actividad biológica de la muestra inicial igual al 100%. Para conocer el efecto del pH en la estabilidad de los ingredientes activos, se prepararon diferentes formulaciones que contenían 0.5 MUI de IFN gamma y 3.0 MUI de IFN alfa 2b en diferentes soluciones reguladoras de pH; es decir, regulador de pH citrato/fosfato, regulador de pH fosfato, regulador de pH citrato y regulador de pH acetato.

Las formulaciones que contenían las mezclas de IFN gamma y de IFN alfa2b recombinantes con las soluciones reguladoras de pH fueron sometidas a ciclos de congelación-descongelación o almacenadas a 45°C y analizadas por ELISA a determinados intervalos de tiempo. Las formulaciones fueron preparadas para tener el pH entre 4 y 8, y todas las soluciones reguladoras de pH se encontraban a una concentración de 0.1 M. Las tablas 2, 3 y 4 reportaron los resultados de los ensayos realizados después de 3 ciclos de congelación-descongelación y a determinados intervalos de tiempo, de 3 a 12 días a temperatura de 45°C.

Tabla 2. Estabilidad a 45°C y durante ciclos de congelación-descongelación de mezcla de IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes (0.5 MUI IFN gamma y 3.0 MUI IFN alfa 2b) en solución acuosa reguladora de pH citrato/fosfato 0.1 M a diferentes pH. Concentración de IFN gamma e IFN alfa 2b en porcentaje (%).

CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN			INCUBACIÓN A 45°C					
	ELISA IFN γ	ELISA IFN α	ELISA IFN γ			ELISA IFN α		
T=0			3D	6D	12D	3D	6D	12D
IFN/4 100	25.9	73.0	4.5	ND	ND	78.5	69.9	36.9
2690650 UI/ML								
IFN/5 100	82.1	86.5	5.4	ND	ND	81.4	62.6	31.7
3820902 UI/ML								
IFN/6 100	63.3	82.7	36.5	5.5	3.6	79.8	61.0	38.5
3532107UI/ML								
IFN/7 100	63.0	82.4	44.4	26.4	14.0	78.0	63.1	32.0
3532100 UI/ML								
IFN/8 100	55.1	76.7	37.6	21.6	11.5	82.5	60.3	34.2
3179500 UI/ML								
D = Días; ND = no determinable. IFN/4 = formulación en regulador de pH citrato/fosfato pH 4.0; IFN/5 = formulación en regulador de pH citrato/fosfato pH 5.0; IFN/6 = formulación en regulador de pH citrato/fosfato pH 6.0; IFN/7 = formulación en regulador de pH citrato/fosfato pH 7.0; IFN/8 = formulación en regulador de pH citrato/fosfato pH 8.0.								

Tabla 3. Estabilidad a 45°C y durante ciclos de congelación-descongelación de mezcla de IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes (0.5 MUI IFN gamma y 3.0 MUI IFN alfa 2b) en solución acuosa reguladora de pH fosfato 0.1 M a diferentes valores pH. Concentración de IFN gamma e IFN alfa 2b en porcentaje (%).

CONGELACION-DESCONGELACIÓN			INCUBACIÓN A 45°C					
	ELISA IFN γ	ELISA IFN α	ELISA IFN γ			ELISA IFN α		
T=0			3D	6D	12D	3D	6D	12D
IFN/5 100	90.2	83.5	67.3	47.6	25.4	74.1	53.9	32.6
3549425 UI/ML								
IFN/6 100	67.8	75.6	42.4	28.6	10.5	82.7	59.6	41.1
3459600 UI/ML								
IFN/7 100	57.9	80.4	40.5	21.5	8.1	73.6	52.9	33.0
3523210UI/ML								

CONGELACION-DESCONGELACIÓN			INCUBACIÓN A 45°C					
	ELISA IFN γ	ELISA IFN α	ELISA IFN γ			ELISA IFN α		
IFN/8 100 3321090 UI/ML	57.2	78.5	26.1	10.7	6.5	74.9	59.0	37.3
D = Días; ND = no determinable. IFN/5 = formulación en regulador de pH fosfato pH 5.0; IFN/6 = formulación en regulador de pH fosfato pH 6.0; IFN/7 = formulación en regulador de pH fosfato pH 7.0; IFN/8 = formulación en regulador de pH fosfato pH 8.0								

Los datos de estas tablas (2, 3, 4) indican que las formulaciones con valores de pH entre 5 y 8 mostraron una adecuada estabilidad durante los ciclos de congelación-descongelación, preferiblemente para los pH cercanos a 5 y a 7 y en los reguladores de pH de acetato, fosfato y citrato-fosfato. La estabilidad térmica en solución acuosa fue mayor a valores de pH entre 5 y 5.6, preferiblemente en los reguladores de pH de acetato y fosfato.

Los datos de la tabla 5 indican que las formulaciones de mayor concentración del regulador de pH mostraron mejor estabilidad durante los ciclos de congelación-descongelación que las de menor concentración a pH 5.5, particularmente para el IFN gamma en los diferentes reguladores de pH ensayados. Sin embargo, los resultados de la estabilidad térmica fueron mejores a pH 5.5 en los tampones acetato y después en fosfato y no se observó dependencia de la concentración. La estabilidad térmica en regulador de pH citrato-fosfato fue mayor a bajas concentraciones del regulador de pH.

Tabla 4. Estabilidad a 45°C y durante ciclos de congelación-descongelación de mezcla de IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes (0.5 MUI IFN gamma y 3.0 MUI IFN alfa 2b) en solución acuosa en regulador de pH citrato y regulador de pH acetato 0.1 M a diferentes valores pH. Concentración de IFN gamma e IFN alfa 2b en porcentaje (%).

CONGELACION-DESCONGELACIÓN			INCUBACIÓN A 45°C					
	ELISA IFN γ	ELISA IFN α	ELISA IFN γ			ELISA IFN α		
T=0			3D	6D	12D	3D	6D	12D
IFN/C4 100 2690650 UI/ML	11.9	77.0	1.3	ND	ND	66.9	49.9	27.0
IFN/C5 100 3820902 UI/M L	64.6	78.1	2.7	ND	ND	71.3	56.6	41.8
IFN/C6 100 3532107 UI/ML	65.8	66.9	12.0	5.9	ND	61.5	43.7	28.2
IFN/A4 100 3532100 UI/ML	87.1	82.3	65.9	46.4	27.9	64.5	46.6	29.0
IFN/A5 100 3179500 UI/ML	86.1	79.7	59.4	45.9	24.0	68.3	47.9	30.7
IFN/A5.6 100 3179500 UI/ML	74.8	75.0	50.8	31.3	18.9	67.7	48.3	27.6
D = Días; ND = no determinable; IFN/C4 = formulación en regulador de pH citrato pH 4.0; IFN/C5 = formulación en regulador de pH citrato pH 5.0; IFN/C6 = formulación en regulador de pH citrato H 6.0; IFN/A4 = formulación en regulador de pH acetato pH 4.0; IFN/A5 = formulación en regulador de pH acetato pH 5.0; IFN/A5.6 = formulación en regulador de pH acetato pH 5.6.								

Tabla 5. Estabilidad a 45°C y durante ciclos de congelación-descongelación de mezcla de IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes (0.5 MUI IFN gamma y 3.0 MUI IFN alfa 2b) en solución acuosa a pH 5.5 en tampones citrato-fosfato, fosfato y acetato a 0.1 M a diferentes concentraciones de la solución reguladora de pH. Concentración de IFN gamma e IFN alfa 2b en porcentaje (%).

CONGELACION-DESCONGELACIÓN			INCUBACIÓN A 45°C					
	ELISA IFN γ	ELISA IFN α	ELISA IFN γ			ELISA IFN α		
T=0			3D	6D	12D	3D	6D	12D
IFN/C-F25 100	59.2	77.2	62.8	21.7	27.9	67.2	59.9	38.7

ES 2 619 632 T3

CONGELACION-DESCONGELACIÓN			INCUBACIÓN A 45°C					
	ELISA IFN γ	ELISA IFN α	ELISA IFN γ			ELISA IFN α		
2690650 UI/ML								
IFN/C-F50 100	61.9	79.6	45.5	26.4	16.6	71.9	62.3	36.1
3820902 UI/ML								
IFN/C-F100 100	63.3	82.7	36.5	5.5	3.6	79.8	61.0	38.5
3532107 UI/ML								
IFN/Fk25 100	70.9	73.0	71.2	50.9	30.5	61.4	54.4	36.8
3532100 UI/ML								
IFN/Fk50 100	79.7	75.9	69.1	48.7	28.7	63.6	52.9	31.6
3179500 UI/ML								
IFN/Fk100 100	90.2	83.5	67.3	47.6	25.4	74.1	53.9	32.6
3179500 UI/ML								
IFN/FNa 25 100	70.3	77.6	68.4	47.3	24.3	63.6	56.1	37.7
3532100 UI/ML								
IFN/FNa 50 100	82.8	80.1	60.8	46.5	21.4	71.3	53.1	34.6
3179500 UI/ML								
IFN/FNa100 100	87.9	86.5	73.9	42.0	32.5	74.7	52.9	35.0
3179500 UI/ML								
IFN/A25 100	62.6	66.3	73.4	45.3	34.2	63.1	44.3	28.4
3532100 UI/ML								
T=0			3D	6D	12D	3D	6D	12D
IFN/A50 100	69.3	69.0	67.3	42.9	29.7	65.6	51.9	33.2
3179500 IU/ML								
IFN/A100 100	76.4	77.1	52.6	30.1	22.8	70.5	49.0	26.8
3179500 IU/ML								
D: Días; ND: no determinable; IFN/C-F25: formulación en regulador de pH citrato-fosfato pH 5.5, 25 mM; IFN/C-F50: formulación en regulador de pH citrato-fosfato pH 5.5, 50 mM; IFN/C-F100: formulación en regulador de pH citrato-fosfato pH 5.5, 100 mM; IFN/Fk25: formulación en regulador de pH fosfato de potasio pH 5.5, 25 mM; IFN/Fk50: formulación en regulador de pH fosfato de potasio pH 5.5, 50 mM; IFN/Fk100: formulación en regulador de pH fosfato 5.5, 100 mM; IFN/FNA 25: formulación en regulador de pH fosfato de sodio pH 5.5, 25 mM; IFN/FNA 50: formulación en regulador de pH fosfato de sodio pH 5.5, 50 mM; IFN/FNA 100: formulación en regulador de pH fosfato de sodio pH 5.5, 100 mM; IFN/A 25: formulación en regulador de pH acetato pH 5.5, 25 mM; IFN/A 50: formulación en regulador de pH acetato pH 5.5, 50 mM; IFN/A 100: formulación en regulador de pH acetato pH 5.5,100 mM.								

Ejemplo 5. Formulación liofilizada (1.4×10^6 UI de IFN gamma y 1.7×10^6 UI de IFN alfa 2b por vial).

Composición: IFN gamma 2.8×10^8 UI, IFN alfa 2b 3.4×10^8 UI, di-hidrógeno fosfato de mono-potasio 0.0802g, hidrógeno fosfato de di-sodio di-hidratado 0.249 g, sacarosa 4g, glicina 0.8 g, Tween 20 0.03g, polietilenglicol 6000 1 g, agua para inyección cantidad suficiente para 100 mL.

5 Todos los componentes excepto los interferones fueron medidos y diluidos con agua para inyección. El pH de la solución es chequeado y si es necesario, ajustado a un valor de 7.2 ± 0.2 con ácido acético diluido (1 :2) o con 1 M de NaOH. Los ingredientes farmacéuticos activos de IFN gamma e IFN alfa 2b fueron adicionados y diluidos hasta la concentración apropiada. La solución fue filtrada de forma estéril y los viales se llenaron y se taparon con tapones para la liofilización en un área clase 100, en la cual se realizó el procedimiento. Finalmente los viales son tapados y sellados; y el producto es almacenado entre 2 y 8°C. La tabla 6 muestra los principales parámetros del ciclo de liofilización empleado.

Tabla 6. Resumen de los parámetros del ciclo de liofilización, cronograma de temperatura por etapas.

Etapas del ciclo	Temperatura	Duración
Congelación	-45 °C	2 horas
	-20 °C	2 horas
	-45 °C	6 horas
Secado Primario	-35 °C	12 horas
Secado secundario	25 °C	12 horas

10 A intervalos establecidos de tiempo se tomaron muestras y se analizó el contenido de humedad residual del producto, el contenido de IFN gamma e IFN alfa 2b (por ELISA), la actividad biológica, la pureza por RP-HPLC y la apariencia tanto del producto liofilizado como del reconstituido. Los resultados son presentados en la tabla 7.

Tabla 7. Datos de humedad residual del producto, contenido de IFN gamma e IFN alfa 2b, la actividad biológica, pureza por RP-HPLC. Temperatura 5°C. FORMULACIÓN LIOFILIZADA: 1.4 MUI IFN gamma/vial y 1.7 MUI IFN alfa 2b/vial.

Tiempo (mes)	Humedad residual (%)	ELISA		Actividad antiviral		Pureza RP-HPLC		Descripción
		IFN γ (μ g/vial*)	IFN α (μ g/vial*)	UI/vial*	Total (%)	IFN γ (%)	IFN α (%)	
Inicial	1.4	315.8	21.9	2.51	97.8	90.6	7.2	STI
1	-	291.2	24.7	3.78	96.4	87.7	8.7	STI
3	-	307.5	23.5	3.17	97.7	87.9	9.8	STI
6	2.6	279.1	22.6	2.89	97.0	88.9	8.2	STI

* El volumen llenado fue de 0.5 mL/vial; STI: liofilizado blanco uniforme; después de reconstitución, una solución transparente incolora, esencialmente libre de partículas.

15

Ejemplo 6. Formulación liofilizada (0.5 x 10⁶ UI de IFN gamma y 3.0 x 10⁶ UI de IFN alfa 2b por vial).

Composición: IFN gamma 1.0 x 10⁸ UI, IFN alfa 2b 6.0 x 10⁸ UI, di-hidrofosfato de potasio 0.0802 g, hidrofosfato di-sódico di-hidratado 0.249 g, sacarosa 4g, glicina 0.8 g, Tween 20 0.03 g, polietilenglicol 6000 1 g, agua para cantidad suficiente de inyección para 100 mL. El método de preparación fue el mismo que se describió en la formulación liofilizada del ejemplo 5.

20

A intervalos establecidos de tiempo se tomaron muestras y se analizó el contenido de humedad residual del producto, el contenido de IFN gamma e IFN alfa 2b (por ELISA), la actividad biológica, la pureza por RP-HPLC y la apariencia tanto del producto liofilizado como del reconstituido. Los resultados son presentados en la tabla 8.

25 Tabla 8. Datos de humedad residual del producto, contenido de IFN gamma e IFN alfa 2b, la actividad biológica, pureza por RP-HPLC. Temperatura 5°C. FORMULACIÓN LIOFILIZADA: 0.5 MUI IFN gamma/vial y 3.0 MUI IFN alfa 2b/vial.

Tiempo (mes)	Humedad residual (%)	ELISA		Actividad antiviral		Pureza RP-HPLC		Descripción
		IFN γ (μ g/vial*)	IFN α (μ g/vial*)	UI/vial*	Total (%)	IFN γ (%)	IFN α (%)	
Inicial	1.3	93.7	38.5	3.15	97.5	28.1	69.4	STI
1	-	104.5	43.9	4.41	96.8	29.5	67.3	STI
3	-	98.5	36.4	2.69	97.1	27.6	69.5	STI
6	1.9	108.2	44.0	3.91	96.9	28.8	68.1	STI

* El volumen llenado fue de 0.5 mL/vial; STI: liofilizado blanco uniforme; después de reconstitución, una solución transparente incolora, esencialmente libre de partículas.

Ejemplo 7: Ensayo clínico con la formulación farmacéutica liofilizada (0.5 x 10⁶ UI de IFN gamma y 3.0 x 10⁶ UI de IFN alfa 2b por vial). Aplicación intralesional en el CBC.

La formulación farmacéutica liofilizada estable descrita en el ejemplo 6 fue empleada en la realización de un ensayo clínico aleatorizado, controlado y triple a ciegas que incluyó 59 pacientes con diagnóstico clínico e histológico de CBC de cualquier localización y tipo de piel con lesiones de un diámetro menor de cuatro centímetros. Los pacientes fueron asignados de forma aleatorizada a tres grupos de tratamiento. Las lesiones fueron tratadas intralesionalmente con la mitad de las dosis de IFN alfa 2b recombinante ($1,5 \times 10^6$ UI/mL); o IFN gamma recombinante ($0,25 \times 10^6$ UI/mL) o la formulación liofilizada estable ($0,5 \times 10^6$ UI de IFN gamma y $3,0 \times 10^6$ UI de IFN alfa 2b por vial), grupo I, II y III, respectivamente. Los IFNs fueron aplicados, tres veces por semanas, durante tres semanas consecutivas, continuando durante 9 semanas, una vez por semana o hasta la desaparición total de la lesión, momento en el que se determinó la eficacia clínica del tratamiento. El 9,5%, 35,3% y 5,3% de las lesiones del grupo con IFN alfa 2b, IFN gamma y la formulación ($0,5 \times 10^6$ UI de IFN gamma y $3,0 \times 10^6$ UI de IFN alfa 2b por vial), respectivamente disminuyeron en menos de un 50% el tamaño de la lesión. En el resto de las lesiones se observó un 90,5%; 57,9% y 94,7% (grupo I, II y III, respectivamente) de respuesta objetiva (desaparición total o disminución de más del 50% del tamaño inicial). Ninguna de las lesiones progresó (ver tabla 9). En el estrato de los "pacientes que no terminaron el tratamiento", se observa una ligera superioridad del tratamiento con la formulación que contiene a los IFNs gamma y alfa 2b recombinantes con efecto antiproliferativo sinérgico (17% de diferencia con respecto al tratamiento con IFN alfa 2b y 27% de diferencia con respecto al tratamiento con IFN gamma). En el estrato de los "pacientes con menos de 11 semanas de tratamiento", se observa superioridad de la formulación (aproximadamente 30% de diferencia con respecto a IFN gamma y 27% con respecto al alfa 2b). La proporción de respuesta completa es superior (> 40% de superioridad con respecto al IFN alfa 2b y >30% con respecto al tratamiento con IFN gamma). Pacientes con menos de 12 inyecciones, se logró un 100% de respuestas favorables (de ellas 50% de RC) en el grupo de la terapia con la formulación. En los otros 2 grupos de tratamiento, el porcentaje de respuesta favorable fue de un 67% (de ellas el 33,3% de RC), es decir se logra aproximadamente un 33% de diferencia a favor de la terapia combinada. Ver tabla 9.

Tabla 9. Evaluación de la respuesta clínica estratificando según tiempo de tratamiento con la mitad de la dosis FORMULACIÓN LIOFILIZADA: 0.5 MUI IFN gamma y 3.0 MUI IFN alfa 2b/vial.

Variables		IFN alfa		IFN gamma		Formulación		P (Fisher)
Tratamiento finalizado	Completo	7 (41.2%)	17 (100%)	4 (33.3%)	9 (75.0%)	8 (50%)	16 (100%)	I - II p= 0.060
	10 (58.8%)							
	Sin cambio	0 (0%)		3 (25.0%)		0 (0%)		III - II p= 0.067
Tratamiento no finalizado	Completo	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)	2 (40%)	0 (0%)	2 (66.7%)	I - II p= 1.000
	2 (50%)							
	Sin cambio	2 (50%)		3 (60%)		1 (33.3%)		III - p= 1.000
Tratamiento período >=11 semanas	Completo	6 (37.5%)	16 (100%)	2 (20.0%)	7 (70%)	3 (27.3%)	11 (100%)	I - II p= 0.046*
	10 (62.5%)							III - II p= 0.090
	Sin cambio	0 (0%)		3 (30%)		0 (0%)		
Tratamiento período < 11 semanas	Completo	1 (20%)	3 (60%)	2 (28.6%)	4 (57.1%)	5 (62.5%)	7 (87.5%)	I - II p= 0.689
	2 (40%)							
	Sin cambio	2 (40%)		3 (42.9%)		1 (12.5%)		III - p= 0.230
< 12 inyecciones recibidas	Completo	1 (33.3%)	2 (66.7%)	2 (33.3%)	4 (66.7%)	3 (50%)	6 (100%)	I - II p= 1.000
	1 (33.3%)							
	Sin cambio	1 (33.3%)		2 (33.3%)		0 (0%)		III - p= 0.455
>12 inyecciones recibidas	Completo	6 (33.3%)	17 (94.4%)	2 (18.2%)	7 (63.6%)	5 (38.5%)	12 (92.3%)	I - II p= 0.054
	11 (61.1%)							
	Sin cambio	1 (5.6%)		4 (36.4%)		1 (7.7%)		III - p= 0.142

Como podemos observar en la Tabla 10, con la formulación liofilizada estable que contiene a los IFNs gamma y alfa 2b recombinantes es posible obtener respuesta clínica completa en un período abreviado de tiempo que con los interferones por separado, con una diferencia de aproximadamente 4 semanas antes con respecto al IFN alfa.

Tabla 10. Evaluación del tiempo hasta la respuesta completa. Tratamiento con la formulación liofilizada: 0.5 MUIIFN gamma/vial y 3.0 MUIIFN alfa 2b/vial.

Tiempo hasta RC (semanas)	IFN gamma (N = 17)	IFN alfa (N = 21)	Formulación (N = 19)	P (Kruskal-Wallis)
Mediana $\pm$ RQ	9.0 $\pm$ 7.5	12.0 $\pm$ 1.0	8.5 $\pm$ 5.8	0.507

En ningún caso tratado se observó la formación de queloide; por el contrario, todos los casos tratados tuvieron una buena cicatrización de la lesión con sensibilidad normal, elasticidad normal o ligeramente disminuida y ausencia de sequedad, fragilidad y aspereza.

Con respecto al color, en la mayoría de los pacientes tratados con la formulación se observó una coloración normal en el sitio tratado (47.4%), el doble de lo observado para el grupo con IFN alfa (28.6%). Al final del ensayo, en el grupo tratado con la formulación se observó un porcentaje mayor de lesiones planas (63.2%) con respecto al grupo tratado con IFN alfa 2b solo (52.4%) lo cual se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Evaluación estética al final del tratamiento. Tratamiento con la mitad de la dosis de la formulación liofilizada: 0.5 MUI IFN gamma/vial y 3.0 MUI IFN alfa 2b/vial.

Variables		FN gamma (N=17)	IFN alfa (N=21)	Formulación (N=19)
Color	Normocromía	8(47.1%)	6 (28.6%)	9 (47.4%)
	Ligera hipocromía	1 (5.9%)	4 (19%)	6 (31.6%)
	Hipocromía	1 (5.9%)	2 (9.5%)	1 (5.3%)
	Ligera hiperchromía	7(41.2%)	8(38.1%)	3 (15.8%)
	Hiperchromía	--	1 (4.8%)	--
Volumen	Lesión plana	12(70.6%)	11(52.4%)	12(63.2%)
	Ligera hipertrofia	5(29.4%)	10(47.6%)	7(36.8%)

La combinación de interferones no potenció los eventos adversos pues no se detectaron diferencias estadísticas entre los grupos de tratamientos, respecto a la producción o intensidad de los mismos. En general fueron leves (71.2%) o moderados y bien tolerados. No se presentaron eventos adversos graves ni muy graves. (Tabla 12).

Tabla 12. Frecuencia de eventos adversos (% con respecto al número total de eventos adversos detectados). Tratamiento con la mitad de la dosis de formulación liofilizada: 0.5 MUI IFN gamma/vial y 3.0 MUI IFN alfa 2b/vial.

Eventos	IFN gamma	IFN alfa	Formulación	Total
Fiebre	31 (60.8%)	15 (38.5%)	11 (26.2%)	57 (43.2%)
Mialgias	2 (3.9%)	15 (38.5%)	13 (31.0%)	30 (22.7%)
Escalofríos	10 (19.6%)	5 (12.8%)	9 (21.4%)	24 (18.2%)
Astenia	4 (7.8%)	1 (2.6%)	5(11.9%)	10 (7.6%)
Artralgias	--	1 (2.6%)	3 (7.1%)	4 (3.0%)
Prurito	3 (5.9%)	--	--	3 (2.3%)
Pérdida de peso	--	2(5.1%)	--	2 (1.5%)
Alergia	1 (2.0%)	--	--	1 (0.8%)
Trombocitopenia	--	--	1 (2.4%)	1 (0.8%)
Leucopenia	--	--	1 (2.4%)	1 (0.8%)
Total de eventos	39 (29.5%)	39 (29.5%)	43 (32.3%)	133 (100%)

Como puede observarse en esta tabla los eventos adversos más frecuentes en cada grupo de tratamiento fueron: fiebre (38.5%; 60.8% y 26.2%), mialgias (38.5%; 3.9% y 31 %) y escalofríos (12.8%; 19.6% y 21.4%) con IFN alfa, IFN gamma y la combinación, respectivamente. El total de eventos adversos presentados fue ligeramente superior en el grupo de pacientes tratados con IFN gamma.

En general, el tratamiento combinado logró un 32% de superioridad de respuestas completas, aproximadamente 4 semanas antes y con un 25% menos de inyecciones con respecto al tratamiento con IFN alfa. La combinación no aumentó los eventos adversos y no se encontró ninguna recidiva en el seguimiento al año de finalizado el tratamiento en los pacientes que obtuvieron respuesta clínica completa. Desde el punto de vista cosmético, el resultado fue muy bueno lo que dio lugar a lesiones planas y normocrómicas en su mayoría.

Ejemplo 8: Resultados del uso compasional de la mezcla de IFNs gamma y alfa 2b recombinantes en pacientes con tumores de piel no susceptibles de tratamientos estándares. Reporte de casos. Paciente 1

- Paciente EPR: HC: 302396 Edad: 82 años, Sexo: Masculino, antecedente patológico personal (APP): n/r Remitido al Instituto nacional de Oncología y Radiobiología (INOR) el 17/10/01 con tumor de la piel de la región anterior del tórax, había recibido tratamiento por electrofulguración que luego de esto creció en forma ulcerosa, habiendo sido operado el 03/07/01. Resultado: carcinoma espinocelular incompletamente extirpado. El paciente llega con lesión tumoral persistente de 3 cm en el sitio del tumor original con bordes elevados. A la observación física no presentó ganglios metastásicos regionales. Se indicó radioterapia sobre el tumor, y se terminó el 29/01/02: 60C o 50 Gy + Rayos X 12 Gy. Dosis total por tumor fue de 62gy.
- 5 Un mes después, el paciente mostraba tumor fijo a la clavícula y al tercio inferior del músculo esternocleidomastoideo. En poco tiempo continuó creciendo rápidamente, mostrando el 04/03/02 gran lesión ulcerada de 10 x 8 cm sobre el tercio interno de la clavícula derecha, base del cuello y parte del esternón, todo hacia la parte anterior del tórax. Le fue propuesto tratamiento quirúrgico. Por los 82 años de edad y tener elevado riesgo quirúrgico, se rechaza a hacerla. Luego, se recomendó un tratamiento con IFN intralesional.
- 10 El tumor de gran tamaño (12.5 x 9 cm y 1-1.5 cm de espesor) estaba fijo a hueso y músculo. La aplicación de IFN se planificó en tres sectores de perímetro. Cada sector fue infiltrado con 1.5 mL de solución en aproximadamente 5 cm³ de tejido (1.5 x 1.5 x 1.5) a una dosis de 0.5 x 10⁶ UI de IFN gamma + 6 x 10⁶ UI de IFN alfa 2b en 6 mL de agua por inyección, tres veces por semana por tres semanas (figura 7a). Después de la quinta aplicación del producto (segunda semana) se decide aplicar una dosis mayor de IFN gamma (el doble, 1 x 10⁶ UI). El aumento de dosis fue propuesto
- 20 tratando de obtener un mejor resultado de un tumor tan grande debido a la ausencia de efectos adversos en la dosificación previa a la información anterior del estudio clínico donde se mostraba el efecto sinérgico de ambos interferones.
- En total el paciente recibió 27 aplicaciones para una dosis total de 25 x 10⁶ UI de IFN gamma + 162 x 10⁶ UI de IFN alfa 2b en dos meses de tratamiento. En la quinta aplicación fue apreciado un aplanamiento del borde de la lesión hasta el nivel de la piel normal, (figura 7b). Un mes después de comenzar el tratamiento, el paciente refiere intenso dolor del miembro superior derecho y se observó infiltración del plexo nervioso braquial, exposición, necrosis y fractura de la clavícula. En la aplicación #20 se observó que en los sitios inyectados paró el crecimiento tumoral, pero no así en el centro donde creció en forma lobulada, (figura 7c). Esta condición se observó incluso en la aplicación 24, además de aparecer sepsis y necrosis en el centro de la úlcera tumoral. Exactamente dos meses después de comenzado el
- 25 tratamiento (aplicación #27), el paciente sufrió intenso sangramiento arterial por infiltración de la arteria subclavia; la hemoglobina del paciente disminuyó hasta 80 g/L y el tratamiento fue interrumpido por 15 días, al cabo de los cuales regresó por continuar sangrando y tener astenia progresiva. El paciente murió dos meses después por rotura arterial. Los sitios inyectados se mantuvieron sin crecimiento tumoral.
- 30 En las primeras ocho aplicaciones se registraron algunos eventos adversos como fiebre (39°C), escalofríos, eritema perilesional y astenia pero todos de intensidades leves y corta duración. Conclusiones: Se logró respuesta clínica en los sitios inyectados, duradera por al menos dos meses, efectos adversos sin importancia.

Paciente 2

- Paciente: LGR: HC: 158390 Edad: 65 años Sexo: Femenino, APP: n/r. Paciente que padece de múltiples carcinomas basales en toda la cara. La paciente fue intervenida quirúrgicamente e irradiada varias veces en el párpado inferior del ojo izquierdo con injertos. Ahora muestra recidiva tumoral de 5 mm de diámetro en el borde del párpado y otra lesión plana cicatricial por debajo del párpado hacia el pómulo, (figura 8a). La alternativa de tratamiento sería una nueva cirugía con las objeciones de ser un caso ya multitratado. En el párpado superior de ese mismo ojo tiene otro carcinoma basal de 7 mm que no ha sido tratado anteriormente.
- 40 El 08/05/02 se propone tratamiento con IFN intralesional (0.5 x 10⁶ UI de IFN gamma + 3 x 10⁶ UI de IFN alfa 2b) en 4 mL, tres veces por semana por tres semanas. En total, la paciente recibió 10 aplicaciones para una dosis total de 35 x 10⁶ UI de interferón (5 x 10⁶ UI de IFN gamma + 30 x 10⁶ UI de IFN alfa 2b). En la cuarta infiltración, la lesión plana cicatricial había desaparecido y en el párpado tenía una úlcera necrosada en el sitio del tumor, (figura 8b). Dos meses después del tratamiento no se observa tumor en el párpado, y se observa desaparición de la lesión plana cicatricial del pómulo (figura 8c). Se obtuvo un efecto local-regional. Se observó una reducción del 50% del carcinoma basal del párpado superior del ojo izquierdo que no fue tratado directamente con IFN y luego fue extirpado quirúrgicamente. Tres años después la paciente permanece aún controlada de las lesiones infiltradas con IFN. Se registraron algunos eventos adversos de intensidades leves y de corta duración como fiebre (39°C), escalofríos y quemosis en el ojo tratado que se alivió con compresas frías.
- 45 Conclusiones: Paciente con respuesta clínica completa hasta agosto del 2005 (último control), efectos adversos mínimos.

Ejemplo 9. Formulaci3n liofilizada (0.5 x 10⁶ UI de IFN gamma y 10 x 10⁶ UI de IFN alfa 2b por vial).

Composición: IFN gamma 1.0×10^8 UI, IFN alfa 2b 20×10^8 UI, di-hidrofosfato de potasio 0.0802 g, hidrofosfato di-sódico di-hidratado 0.249 g, sacarosa 4 g, glicina 0.8 g, Tween 20 0.03 g, polietilenglicol 6000 1 g, agua para cantidad suficiente de inyección para 100 mL.

El método de preparación fue el mismo que se describió en la formulación liofilizada del ejemplo 5.

- 5 A determinados intervalos de tiempo se tomaron muestras y se analizó el contenido de humedad residual del producto, el contenido de IFN gamma y de IFN alfa 2b (por ELISA), la actividad biológica, la pureza por RP-HPLC y la apariencia tanto del producto liofilizado como del reconstituido. Los resultados son presentados en la tabla 13.

Tabla 13. Datos de humedad residual del producto, contenido de IFN gamma e IFN alfa 2b, la actividad biológica, y pureza por RP-HPLC. Temperatura 5 °C. FORMULACIÓN LIOFILIZADA: 0.5 MUI IFN gamma y 10.0 MUI IFN alfa 2b/vial.

Tiempo (mes)	Humedad residual (%)	ELISA		Actividad antiviral		Pureza RP-HPLC		Descripción
		IFN γ (μ g/vial*)	IFN α (μ g/vial*)	UI/vial*	Total (%)	IFN γ (%)	IFN α (%)	
Inicial	0.9	94.0	142.2	12.90	98.8	43.7	55.1	STI
1	-	105.5	133.2	8.37	97.7	40.8	56.9	STI
3	-	102.1	129.4	11.55	97.6	43.0	54.5	STI
6	1.7	91.7	137.1	9.13	95.4	39.4	57.0	STI

* El volumen llenado fue de 0.5 mL/vial; STI: liofilizado blanco uniforme; después de reconstitución, una solución transparente incolora, esencialmente libre de partículas.

Ejemplo 10. Empleo de la formulación liofilizada estable compuesta por 0.5 MUI IFN gamma y 10.0 MUI IFN alfa 2b/vial en combinación con cisplatino. Reporte de caso.

Paciente 3

- 15 Paciente JGA: HC: edad: 33 años, sexo: varón, APP: paciente n/r registrado en el INOR con un carcinoma de células basales que penetra por el ángulo interno del ojo izquierdo, con varias intervenciones quirúrgicas e irradiado. Ahora el paciente tiene un tumor ulcerado que llega hasta los huesos de la base del cráneo (figura 9a). Verificado por tomografía axial computarizada (TAC) se observa cavidad en los huesos propios de la nariz y de la pared interna de la órbita, fetidez insoportable que sale por la fosa nasal izquierda y secreción amarilla purulenta por el mismo sitio.
- 20 Debido a la extensión de la lesión se decidió hacer un tratamiento combinado con quimioterapia sistémica con cisplatino a dosis de 6 ciclos con intervalos de 21 días y al mismo tiempo la formulación (0.5 MUI IFN gamma y 10.0 MUI IFN alfa 2b/vial) infiltrada localmente 3 veces por semana por tres semanas.

- 25 Al cabo de la tercera aplicación, ya se observaba respuesta parcial importante, que permitía la abertura palpebral y la disminución de la fetidez. Presentaba a la vez quemosis de moderada intensidad. Después de un mes se apreció respuesta clínica completa. Esta respuesta se mantiene hasta el fin de la quimioterapia. Los eventos adversos fueron pocos, algo de fiebre y escalofríos y dolor referido en el sitio de la cicatriz de la lesión. Un año después el paciente mantiene la respuesta clínica completa (figura 9b).

Ejemplo 11. Formulación farmacéutica líquida estable (1.4×10^6 UI de IFN gamma y 1.7×10^6 UI de IFN alfa 2b por vial).

- 30 Composición: IFN gamma 2.8×10^8 UI, IFN alfa 2b 3.4×10^8 UI, acetato de sodio 0.708 g, ácido acético 0.079 mL, Tween 20 0.01 g, manitol 5 g, agua para cantidad suficiente de inyección para 100 mL.

Todos los componentes excepto los interferones fueron medidos y suspendidos con agua para inyección. El pH de la solución es chequeado y, si es necesario, ajustado al valor de 5.5 ± 0.2 con ácido acético diluido (1:2) o con 1 M de NaOH. Los ingredientes farmacéuticos activos de IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes fueron adicionados y diluidos hasta la concentración apropiada.

- 35 La solución fue filtrada en condición estéril. Los viales fueron llenados con la formulación y cubiertos y sellados en un área clase 100. Finalmente el producto es almacenado entre 2 y 8°C. Se tomaron varias muestras de la formulación fabricada y se almacenaron a 8 °C y 2 °C por un período de seis meses.

- 40 A determinados intervalos de tiempo se tomaron muestras y se analizó el contenido de humedad residual del producto, el contenido de IFN gamma e IFN alfa 2b (por ELISA), la actividad biológica, la pureza por RP-HPLC y la apariencia del producto liofilizado así como reconstituido. Los resultados son presentados en la tabla 14.

Tabla 14. Datos de pH del producto, contenido de IFN gamma e IFN alfa 2b, la actividad biológica y pureza por RP-HPLC. Temperatura 5°C. FORMULACIÓN LÍQUIDA: 1.4 MUI IFN gamma y 1.7 MUI IFN alfa 2b/vial.

Tiempo (mes)	pH	ELISA		Actividad		Pureza RP-HPLC		Descripción
		IFN γ (μ g/vial*)	IFN α (μ g/vial*)	Antiviral UI/vial*	Total (%)	IFN γ (%)	IFN α (%)	
Inicial	5.58	305.2	24.9	3.66	96.9	88.1	8.8	STI
1	5.43	279.1	21.2	3.21	97.2	87.9	9.3	STI
3	5.56	285.4	20.7	2.47	95.8	89.7	7.1	STI
6	5.45	293.0	23.9	3.39	95.5	88.1	8.4	STI
* El volumen llenado fue de 0.5 mL/vial; STI: liofilizado blanco uniforme; después de reconstitución, una solución transparente incolora, esencialmente libre de partículas.								

Ejemplo 12. Formulaci3n l3quida (0.5 x 10⁶ UI de IFN gamma y 3.0 x 10⁶ UI de IFN alfa 2b por vial).

Composici3n: IFN gamma 2.0 x 10⁸ UI, IFN alfa 2b 12.0 x 10⁸ UI, acetato de sodio 0.708 g, 3cido ac3tico 0.079 mL, Tween 20 0.01 g, manitol 5 g, agua para cantidad suficiente de inyecci3n para 100 mL.

- 5 El m3todo de preparaci3n fue el mismo que se describi3 en la Formulaci3n liofilizada del ejemplo 11.

A determinados intervalos de tiempo se tomaron muestras y se analiz3 el contenido de humedad residual del producto, el contenido de IFN gamma e IFN alfa 2b (por ELISA), la actividad biol3gica, la pureza por RP-HPLC y la apariencia del producto liofilizado as3 como del mismo reconstituido. Los resultados son presentados en la tabla 15.

- 10 Tabla 15. Datos de pH del producto, contenido de IFN gamma e IFN alfa 2b, la actividad biol3gica y pureza por RP-HPLC. Temperatura 5°C. FORMULACI3N L3QUIDA: 0.5 MUI IFN gamma y 3.0 MUI IFN alfa 2b/vial.

Tiempo (mes)	pH	ELISA		Actividad		Pureza RP-HPLC		Descripci3n
		IFN γ (μ g/vial*)	IFN α (μ g/vial*)	Antiviral UI/vial*	Total (%)	IFN γ (%)	IFN α (%)	
Inicial	5.55	109.4	38.2	4.25	97.6	58.3	29.3	STI
1	5.37	103.7	39.5	2.73	97.1	59.8	27.3	STI
3	5.49	95.0	42.9	3.35	97.3	70.2	27.1	STI
6	5.58	94.9	36.2	3.91	96.8	58.5	28.3	STI
* El volumen llenado fue de 0.5 mL/vial; STI: liofilizado blanco uniforme; despu3s de reconstituci3n, una soluci3n transparente incolora, esencialmente libre de part3culas.								

Ejemplo 13. Formulaci3n farmac3utica l3quida estable (0.5 x 10⁶ UI de IFN gamma y 10 x 10⁶ UI de IFN alfa 2b por vial).

Composici3n: IFN gamma 2.0 x 10⁸ UI, IFN alfa 2b 40 x 10⁸ UI, acetato de sodio 0.708 g, 3cido ac3tico 0.079 mL, Tween 20 0.01 g, manitol 5 g, agua para cantidad suficiente de inyecci3n para 100 mL.

- 15 El m3todo de preparaci3n fue el mismo que se describi3 en la formulaci3n liofilizada del ejemplo 11.

A determinados intervalos de tiempo se tomaron muestras y se analiz3 el contenido de humedad residual del producto, el contenido de IFN gamma e IFN alfa 2b (por ELISA), la actividad biol3gica, la pureza por RP-HPLC y la apariencia del producto liofilizado as3 como del mismo reconstituido. Los resultados son presentados en la tabla 6.

- 20 Tabla 16. Datos de pH del producto, contenido de IFN gamma e IFN alfa 2b, la actividad biol3gica y pureza por RP-HPLC. Temperatura 5°C. FORMULACI3N L3QUIDA: 0.5 MUI IFN gamma y 10.0 MUI IFN alfa 2b/vial.

Tiempo (mes)	pH	ELISA		Actividad		Pureza RP-HPLC		Descripci3n
		IFN γ (μ g/vial*)	IFN α (μ g/vial*)	Antiviral UI/vial*	Total (%)	IFN γ (%)	IFN α (%)	
Inicial	5.53	91.9	138.2	12.41	98.0	39.1	58.9	STI
1	5.57	93.7	121.5	8.73	97.5	41.7	55.9	STI
3	5.49	105.0	142.9	9.46	95.8	38.2	58.6	STI
6	5.51	99.8	134.7	10.93	97.5	42.5	42.5	STI
* El volumen llenado fue de 0.5 mL/vial; STI: liofilizado blanco uniforme; despu3s de reconstituci3n, una soluci3n transparente incolora, esencialmente libre de part3culas.								

Ejemplo 14. Formulaci3n farmac3utica semis3lida (0.16 x 10⁶ UI de IFN gamma y 1.0 x 10⁶ UI de IFN alfa 2b por gramo de semis3lido).

Formulación farmacéutica para la aplicación tópica, preferiblemente en forma de crema, ungüento o jalea. La preparación farmacéutica contiene interferón gamma e interferón alfa 2 recombinantes como principio activo. La composición es de 1.6×10^7 UI de IFN gamma y de 1×10^8 UI de IFN alfa 2b, cantidad suficiente para 100 gramos de semisólido.

- 5 Preparación de crema: Para preparar la crema se funde la vaselina sólida y el alcohol cetílico a 75 °C y se mezclan con constante agitación, se mantiene hasta el final del proceso. Una vez homogeneizada, a la mezcla se incorpora Tween 60. Por otro lado se disuelve el metil y el propil parabeno en agua a 90 °C y se incorpora a la mezcla anterior cuando la temperatura haya disminuido hasta 75 °C. A continuación la emulsión es enfriada lentamente hasta 37 °C y se incorpora la solución acuosa que contiene el IFN gamma e IFN alfa 2b recombinantes. La crema resultante es almacenada a 4 °C en tubos de 15 g (ver tabla 17).

Tabla 17. Ingredientes de la formulación de la crema.

Ingredientes	%
IFN γ	2.2
IFN- α 2b	0.58
Alcohol cetílico	4
Vaselina	10
Tween 60	2
Metil parabeno, propil parabeno	0,2
Agua destilada c.s.p	81.2

- 15 Preparación de ungüento: En un recipiente se disuelven los parabenos en el agua a 90 °C y se deja enfriar hasta 37 °C. En otro recipiente se mezcla el petrolato líquido y el Span 20 con constante agitación. A continuación, se mezcla el contenido de ambos recipientes y cuando la temperatura haya disminuido por debajo de los 37°C se incorpora el IFN gamma y el IFN alfa 2b recombinantes, manteniendo la agitación constante. Luego se incorpora el petrolato blanco hasta lograr una homogeneización. El ungüento resultante es almacenado a 4° e en tubos de 15 g (ver tabla 18).

Tabla 18. Ingredientes de la formulación del ungüento.

Ingredientes	%
IFN γ	2.2
IFN- α 2b	0.58
Petrolato Sólido Blanco	60
Petrolato líquido pesado	10
Span 20	3
Metil y propil parabeno	0.2
Agua destilada c.s.p	24.02

- 20 Preparación de gel: el EDTA, los para vinos y el alcohol se disuelven en recipientes separados y luego se añade el propilenglicol. Luego se mezclan estas soluciones con agitación constante y se incorpora lentamente el carbopol 940 con agitación vigorosa hasta obtener una dispersión turbia sin presencia de grumos. Se prepara aparte, en un recipiente adecuado una solución de hidróxido de sodio de 1 N y se adiciona lentamente con agitación a la dispersión que contiene el resto de los componentes de la formulación. A continuación se incorporan el IFN gamma y el IFN alfa 2b con agitación suave. Una vez formado el gel se envasa en tubos de 15 g a 4°C (ver tabla 19).

Tabla 19. Ingredientes de la formulación de gel.

Ingredientes	%
IFN γ	2.2
IFN α 2b	0.58
Carbopol 940	0.5
Propilenglicol	10
Metilparabeno y Propilparabeno	0.2
Hidróxido de sodio	0.2
Etiléndiaminotetraacetato cálcico disódico (EDTA)	0.01
Etanol	2
Agua destilada c.s.p	84.31

Reivindicaciones

1. Una formulación farmacéutica estabilizada que comprende diferentes cantidades de interferones gamma y alfa recombinantes en proporciones sinérgicas, en la cual dichas proporciones sinérgicas comprenden IFN gamma recombinante en un intervalo de concentración entre 5.6×10^6 UI/ml y 1.4×10^6 UI/ml e IFN alfa 2 recombinante en un intervalo de concentración entre 6.8×10^6 UI/ml y 1.7×10^6 UI/ml, o IFN gamma recombinante en un intervalo de concentración entre 2.0×10^6 UI/ml y 0.5×10^6 UI/ml e IFN alfa 2 recombinante en un intervalo de concentración entre 12.0×10^6 UI/ml y 3.0×10^6 UI/ml, o IFN gamma recombinante en un intervalo de concentración entre 4.0×10^6 UI/ml y 1.0×10^6 UI/ml e IFN alfa 2 recombinante en un intervalo de concentración entre 80×10^6 UI/ml y 20×10^6 UI/ml, y dicha formulación comprende además un compuesto de azúcar no reductor seleccionado del grupo que consiste en sacarosa y trehalosa; y una solución reguladora de pH que mantiene el pH de la formulación entre 4.9 y 7.5, la solución reguladora de pH se selecciona del grupo que consiste en acetato de amonio o de sodio, succinato de sodio, fosfato de sodio y/o de potasio y citrato/fosfato de sodio; y dicha formulación comprende además excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de eventos patológicos caracterizados por crecimiento celular benigno no fisiológico o maligno de tejidos u órganos, y en cuyo caso dicha formulación se encuentra en forma liofilizada y para administración parenteral.
2. Una formulación farmacéutica estabilizada para uso según la reivindicación 1 y dicha formulación comprende además, en calidad de aminoácidos, glicina, histidina o leucina; en calidad de surfactantes, polisorbato 20 o polisorbato 80 y en calidad de polímero estabilizador, polietilenglicol o dextrano o almidón de hidroxietilo.
3. La formulación farmacéutica estabilizada para uso según la reivindicación 2, en la cual la solución reguladora de pH se emplea en un intervalo de concentración entre 10 y 20 mM; en la cual la sacarosa o trehalosa se emplea en un intervalo de concentración entre 5 y 100 mg/mL; en la cual la glicina, histidina o leucina se emplean en un intervalo de concentración entre 1 y 20 mg/mL; en la cual el polisorbato se emplea en un intervalo de concentración entre 0.01 y 1 mg/mL y en la cual el polietilenglicol, el dextrano o el almidón de hidroxietilo se emplean en un intervalo de concentración entre 5 y 50 mg/mL.
4. La formulación farmacéutica estabilizada para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la cual dicha formulación es para uso en el tratamiento de tumores sólidos malignos o benignos, y en cuyo caso la formulación es para emplearse independientemente o en una combinación con quimioterapia, radioterapia o las combinaciones de ambas.
5. La formulación farmacéutica estabilizada para uso según la reivindicación 4, en cuyo caso dicha formulaciones para uso en el tratamiento de carcinoma de laringe, papilomatosis de laringe, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia aguda linfocítica, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células T, leucemia de células B, linfoma del sistema nervioso central, lipoma, quiste epidermoide, quiste intradérmico, liposarcoma, neurofibroma, hiperplasia sebacea, hemangioma cavernosa, adenoma hepatocelular, hiperplasia nodular focal, astrocitoma, glioblastoma multiforme, ependimoma, ganglioneuroma, astrocitoma pilocítico juvenil, gliomas mezclados, oligodendrogliomas, glioma de nervio óptico, craniofaringioma, meduloblastoma; meningioma, tumor pineal, adenoma pituitario, tumores neuroectodérmicos primitivos, neuroma acústico, tumores vasculares, carcinomatosis meníngeo, neurofibromatosis, pseudotumores de cerebro, esclerosis tuberosa, tumores metastásicos de cerebro, angiomas conforma de cereza, hiperplasia de glándula sebacea, carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas, dermatofibroma, granuloma piogénico, nevus dérmico, queratosis seborreica, queratosis actínica.
6. La formulación farmacéutica estabilizada para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en cuyo caso dicha formulaciones para uso en el tratamiento de eventos proliferativos como fibrosis, displasias, e hiperplasias.
7. La formulación farmacéutica estabilizada para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en cuyo caso dicha formulación es para aplicación intramuscular, intratumoral o perilesional.

Figura 1

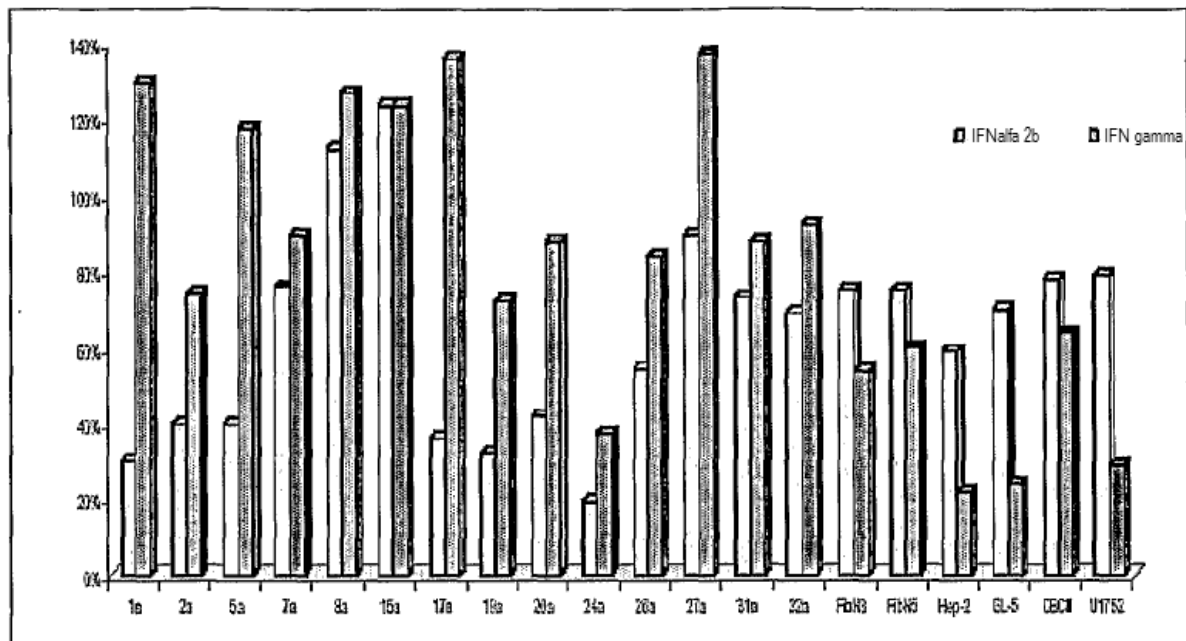


Figura 2

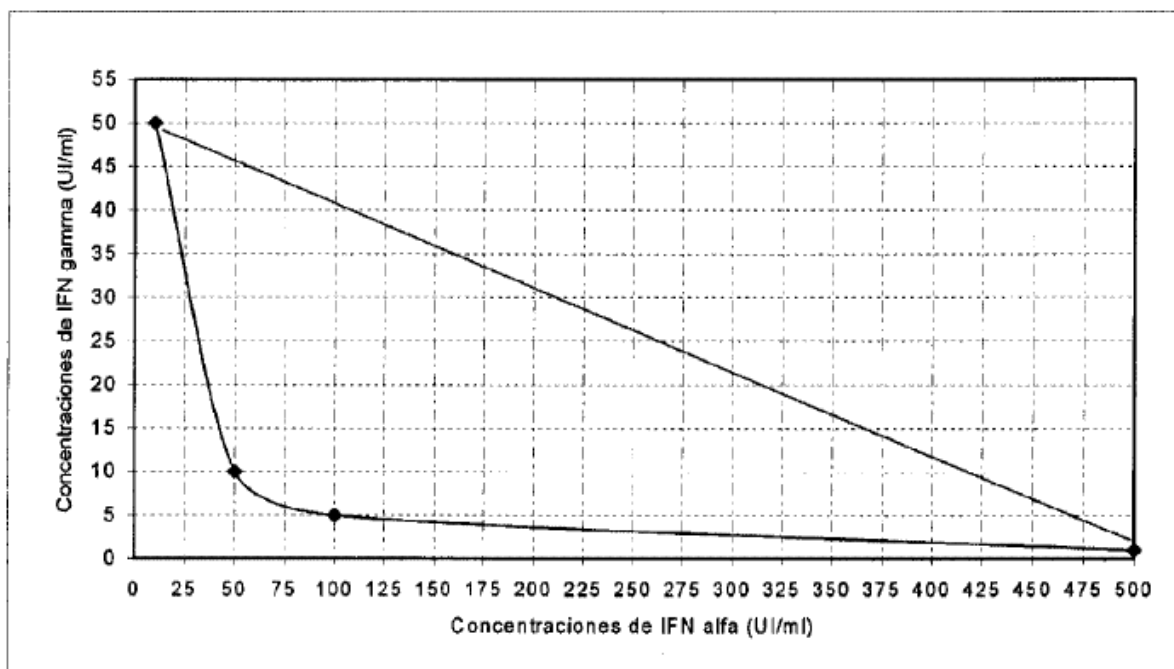


Figura 3

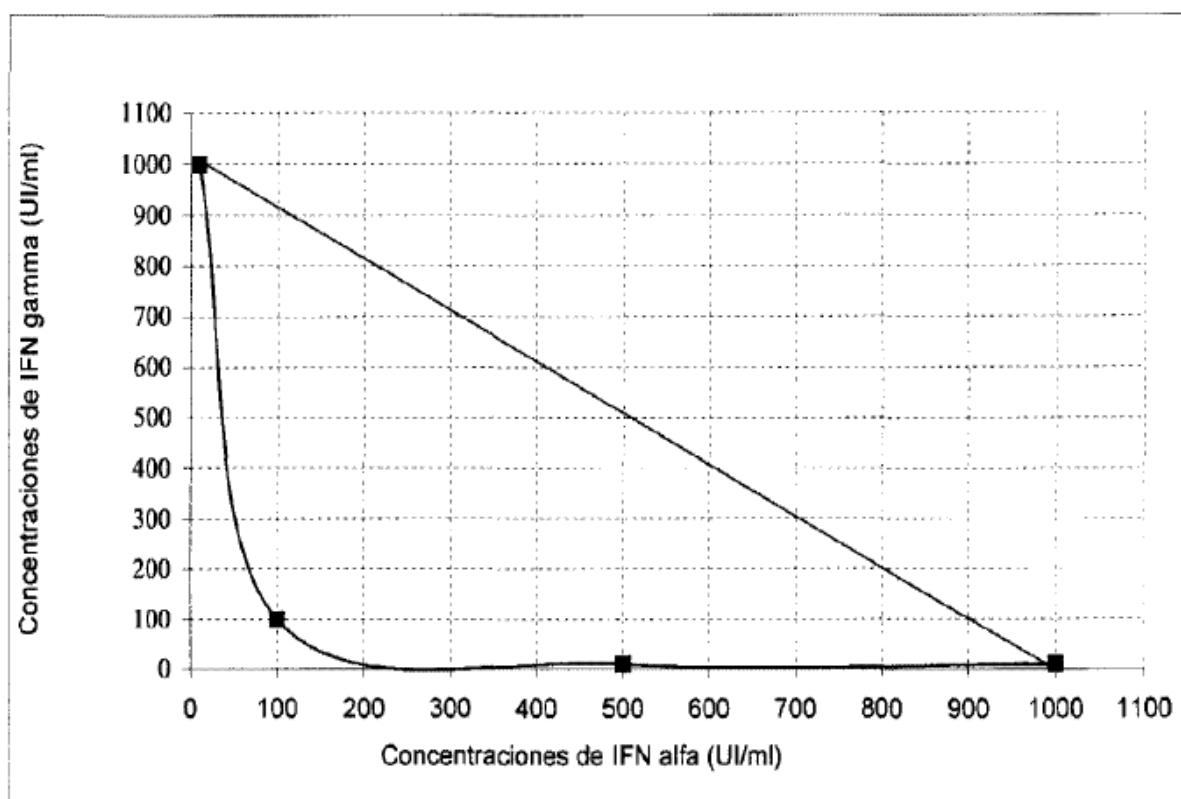


Figura 4

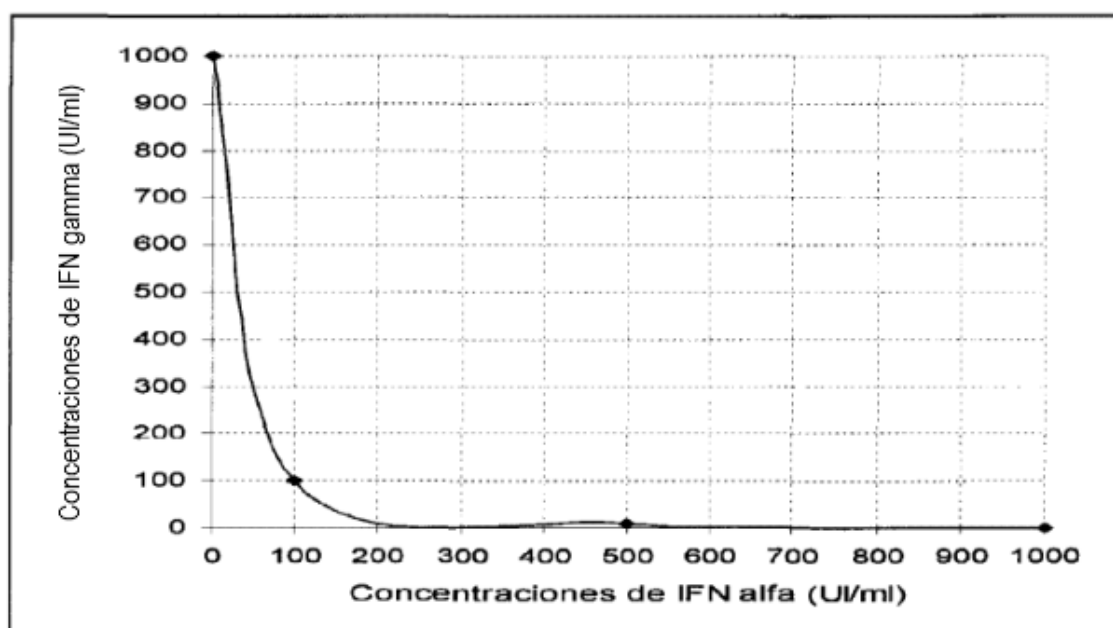


Figura 5

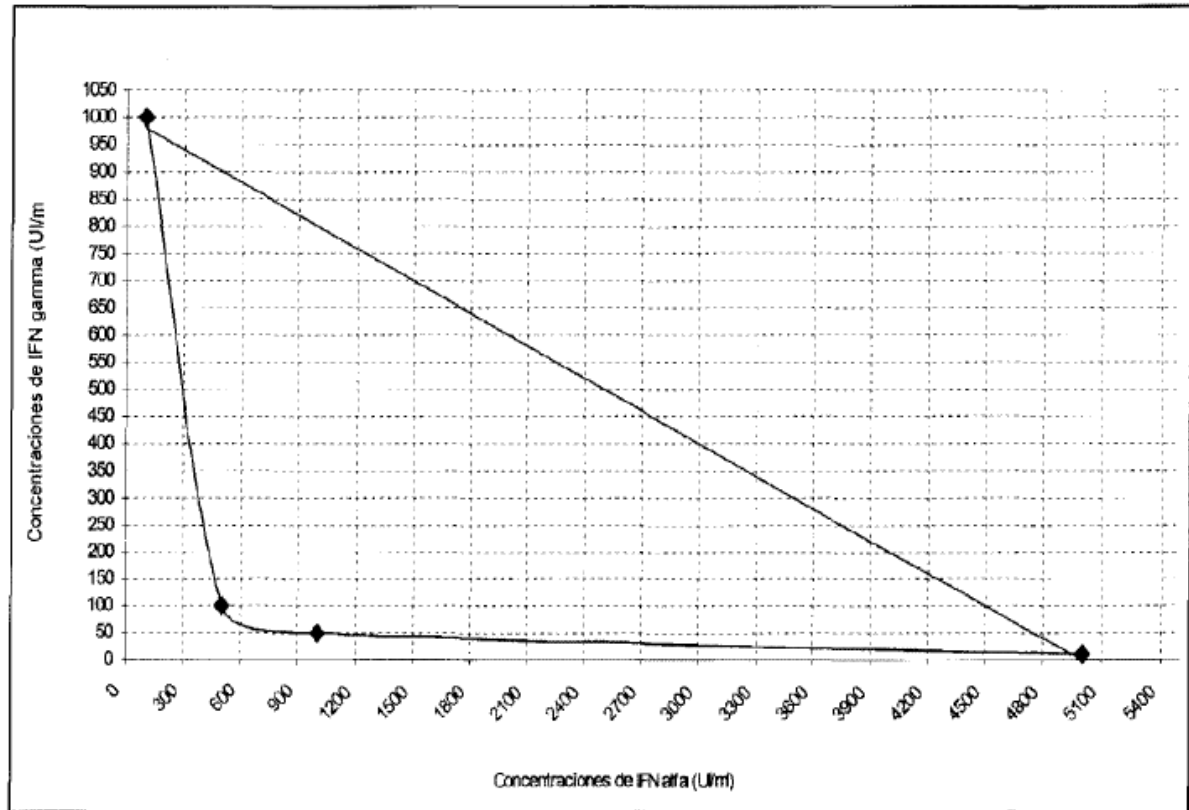


Figura 6

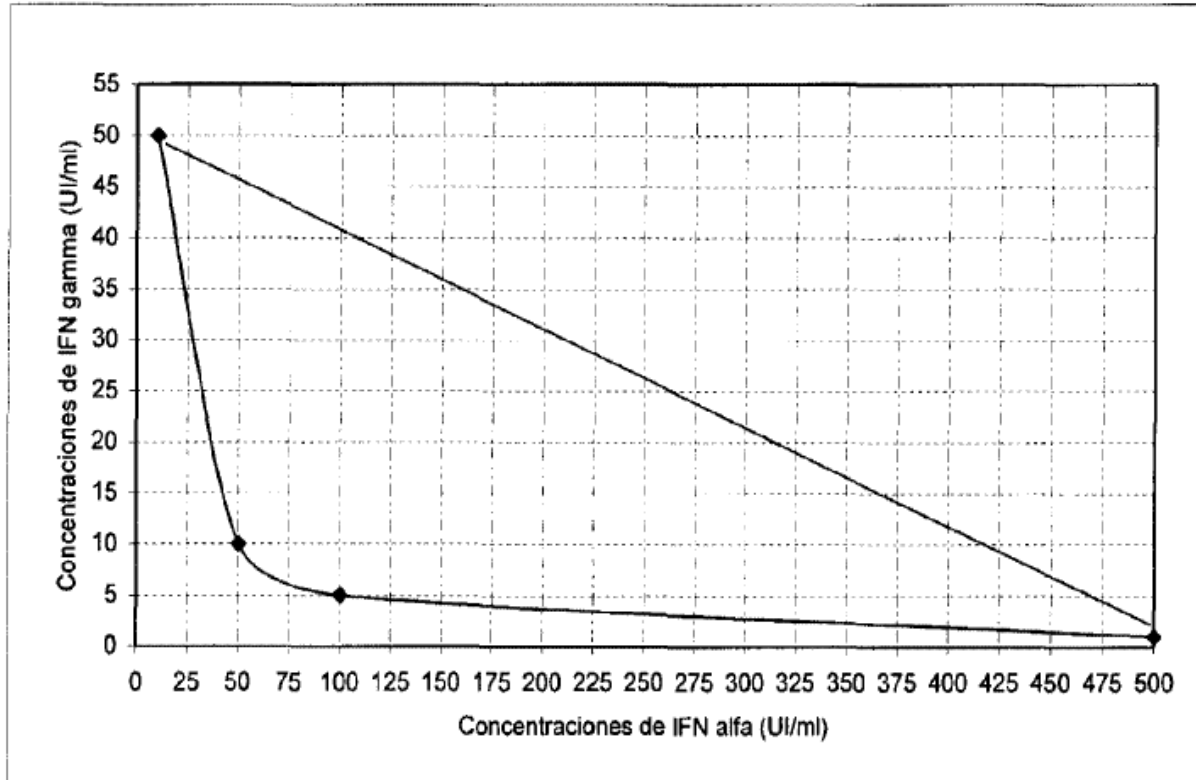


Figura 7

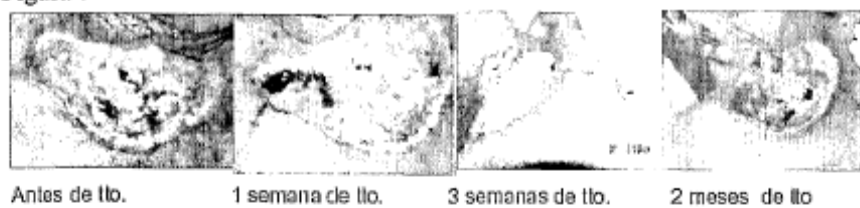


Figura 8



Figura 9

