

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 007**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/22** (2006.01)

**A61K 9/20** (2006.01)

**A61K 38/21** (2006.01)

**A61K 47/34** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2011 PCT/KR2011/002335**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011 WO11122923**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2011 E 11763095 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2552422**

54 Título: **Formulación de interferón beta de acción prolongada que usa un fragmento de inmunoglobulina**

30 Prioridad:

**02.04.2010 KR 20100030577**

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

**23.01.2018**

73 Titular/es:

**HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)  
550, Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon  
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, DAE JIN;  
KIM, MIN YOUNG;  
KIM, JIN SUN;  
HONG, SUNG HEE;  
JUNG, SUNG YOUB y  
KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 651 007 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

Formulación de interferón beta de acción prolongada que usa un fragmento de inmunoglobulina

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a una formulación de interferón beta de acción prolongada que tiene una duración y una estabilidad *in vivo* mejoradas, que comprende un conjugado de interferón beta que se prepara mediante la unión covalente de interferón beta 1b con una región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico, y a un procedimiento de preparación del mismo. La invención proporciona asimismo dicha formulación para su uso en un procedimiento de tratamiento en un sujeto que tiene infecciones virales, enfermedades autoinmunitarias, cáncer o trastornos degenerativos del sistema nervioso. La formulación de interferón beta de acción prolongada de la presente invención mantiene la actividad *in vivo* del interferón beta 1b en un nivel relativamente alto y aumenta notablemente la semivida en suero del mismo.

**Antecedentes de la invención**

15 El interferón beta se conoce como una sustancia que tiene una actividad antiviral y suprime la proliferación celular, y también tiene las funciones de anti-proliferación, aumento de la citotoxicidad de los linfocitos, regulación inmunitaria natural, activación de macrófagos, potenciación de las respuestas de linfocitos T citotóxicos, y potenciación de la actividad de los macrófagos, y puede ser usado en el tratamiento de infecciones virales, enfermedades autoinmunitarias y cáncer. Actualmente, tres formas de interferón beta recombinante humano han sido aprobadas por las autoridades reguladoras estadounidenses y europeas para el tratamiento de la esclerosis múltiple; un tipo de forma no glicosilada de interferón-beta-1b que posee una serina en la posición 17 producido a partir de una cepa de *Escherichia coli* y dos tipos de forma glicosilada de interferón-beta-1a producidos a partir de células de mamífero.

20 Betaseron es la marca para la forma no glicosilada de interferón-beta-1b que posee una serina en la posición 17 producida a partir de una cepa de *Escherichia coli*, y se da cada dos días a una dosis alta de 250 µg. Avonex (Biogen, Inc.) es la marca para una forma glicosilada de interferón-beta-1a producida a partir de células de mamífero, y se da una vez a la semana por inyección intramuscular, y su aprobación fue seguida por la aprobación de Rebif (Serono, Inc.). A pesar de que Rebif es similar a Avonex y ha de darse tres veces a la semana, éste se aprobó por las diferencias en la eficacia y la formulación.

30 El interferón no glicosilado es problemático en que es muy inestable, y por lo tanto se produce una precipitación debido al aumento de la sensibilidad con la desnaturalización térmica y la agregación hidrófoba. Mientras tanto, el interferón glicosilado tiene una semivida relativamente larga en el cuerpo, en comparación con el interferón no glicosilado, y la semivida se prolonga a partir de dos días (inyección intravenosa) a una semana (inyección intramuscular), dependiendo de su vía de administración. No obstante, enfermedades para las que el interferón beta es eficaz requieren un tratamiento crónico, y por consiguiente puede exigirse una formulación de acción prolongada capaz de actuar durante una semana o más para resolver el problema de la inestabilidad del interferón beta. Por lo tanto, se han realizado grandes esfuerzos para mejorar la estabilidad en suero del interferón beta y mantener los fármacos en la sangre a niveles elevados durante un periodo de tiempo prolongado, maximizando así la eficacia farmacéutica de los fármacos. Estas formulaciones de interferón beta de acción prolongada necesitan aumentar la estabilidad del interferón beta y mantener los títulos a niveles suficientemente altos sin causar respuestas inmunitarias en los pacientes.

40 Para estabilizar el interferón beta y prevenir la agregación hidrófoba, un polímero que tiene una alta solubilidad, tal como polietilenglicol (PEG), se usó de manera convencional para modificar químicamente la superficie de un péptido. Mediante la unión a regiones específicas del interferón beta objetivo, PEG aumenta el peso molecular de un péptido para evitar la depuración en los riñones y la agregación y por consiguiente mejora la estabilidad para aumentar la semivida *in vivo* sin causar efectos secundarios graves. Por ejemplo, el documento WO99/55377 desvela que un PEG con un tamaño de 20 KDa está unido al grupo sulfhidrilo (-SH) del residuo de cisteína en el interferón beta-1a para mejorar la solubilidad y la estabilidad en un pH neutro (agregación reducida) y para reducir la inmunogenicidad. El documento US 0962978 B2 desvela que un PEG con un tamaño de 20, 30 o 40 KDa está unido al extremo N-terminal del interferón beta-1a. Además, el documento US 2004/0126361 desvela que un PEG con un tamaño de 10 o 30 KDa está unido al extremo N-terminal del interferón beta-1b. Estos procedimientos aumentan el peso molecular de PEG para prolongar la duración *in vivo* de un fármaco peptídico, mientras que el peso molecular aumentado reduce notablemente un título del fármaco peptídico y la reactividad respecto al interferón beta, lo que conlleva a una reducción en el rendimiento y un aumento en los costes de producción.

55 El documento US2005908626 describe una proteína de fusión de interferón beta 1a y Fc (γ4) mediante un enlazador peptídico, el documento WO200103737 describe una proteína de fusión de interferón beta 1a y Fc de IgG1, Fc de IgG4 o IgG1CH. En el documento US600735 B2, una fusión directa de interferón beta 1a y el fragmento Fc de IgG1 se compara con una fusión a través del enlazador G4S. El documento US20060228332 describe una proteína de fusión de interferón beta 1a y un fragmento de inmunoglobulina (Fc), y el documento WO2004020405 describe una proteína de fusión de interferón beta y una transferrina no glicosilada (mTf). Estas proteínas de fusión son ventajosas en que puede superarse el bajo rendimiento de la pegilación y la no especificidad, mientras que son

perjudiciales en que la semivida en suero no aumenta como se esperaba, y en algunos casos, el título es bajo. Para maximizar el aumento de la semivida en suero, se han usado varios tipos de enlazadores peptídicos, pero éstos causan respuestas inmunitarias.

5 Se han realizado otros intentos. El documento US20040115168A1 describe la glicopegilación para unir una cadena de azúcar de interferón beta-1a con PEG, pero un bajo rendimiento de pegilación es problemático, y la patente coreana n.º 10-0541850 describe un procedimiento de adición de una o más cadenas de azúcar, en el que se usan variantes de interferón beta-1a para realizar una sustitución parcial de aminoácidos en la posición 7, pero la sustitución de aminoácidos de la forma nativa puede generar un problema en la estabilidad *in vivo*.

### **Divulgación de la invención**

#### **10 Problema técnico**

En consecuencia, los presentes inventores han usado un procedimiento de unión de manera selectiva en el sitio de una región Fc de inmunoglobulina, un polímero no peptídico y un interferón beta entre sí por un enlace covalente con el fin de mejorar la semivida en suero del interferón beta y para maximizar la actividad *in vivo* del mismo simultáneamente. Como resultado, la semivida en suero del conjugado de interferón beta se aumentó notablemente, 15 lo que resulta mucho mejor que la pegilación conocida de interferón beta. Además, se halló que el conjugado de interferón beta 1b no glicosilado-Fc que tiene problemas de baja solubilidad y una dosis alta, aunque con ventajas de fácil procedimiento de producción y bajos costos de producción, muestra que la semivida en suero y el título son similares o superiores al conjugado de interferón beta 1a glicosilado-Fc.

#### **Solución al problema**

20 Es objeto de la presente invención proporcionar una excelente formulación de interferón beta de acción prolongada que mantenga la actividad *in vivo* del interferón beta 1b y aumente notablemente la semivida en suero de la misma, y un procedimiento de preparación de la misma.

#### **Efectos ventajosos de la invención**

25 El conjugado de interferón beta 1b de la presente invención mantiene una actividad *in vivo* de un péptido a un nivel relativamente alto y aumenta notablemente la semivida en suero del mismo.

#### **Breve descripción de los dibujos**

30 FIG. 1 es el resultado de RP HPLC del conjugado de interferón beta 1b-PEG-Fc de inmunoglobulina;  
 FIG. 2 es el resultado de SDS-PAGE al 12 % del conjugado de interferón beta 1b-PEG-Fc de inmunoglobulina;  
 FIG. 3 es el resultado de SDS-PAGE al 12 % del conjugado de interferón beta 1a-PEG-Fc de inmunoglobulina;  
 FIG. 4 es el resultado de SDS-PAGE al 12 % del conjugado de interferón beta 1b-PEG de 20 kDa; y  
 FIG. 5 es el resultado de SDS-PAGE al 12 % del conjugado de interferón beta 1b-PEG de 20 kDa.

#### **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

35 En un aspecto para alcanzar los objetos anteriores, la presente invención proporciona una formulación de interferón beta de acción prolongada que tiene una duración y una estabilidad *in vivo* mejoradas, que comprende un conjugado de interferón beta que se prepara mediante la unión covalente de interferón beta 1b con una región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico que tiene dos grupos terminales reactivos.

40 El interferón beta en la formulación de la presente invención es una proteína que tiene una actividad antiviral y suprime la proliferación celular, y también tiene las funciones de anti-proliferación, aumento de la citotoxicidad de los linfocitos, regulación inmunitaria natural, activación de macrófagos, potenciamiento de las respuestas de linfocitos T citotóxicos, y potenciamiento de la actividad de los macrófagos, y puede ser usado para el tratamiento de infecciones virales, enfermedades autoinmunitarias, cáncer y esclerosis múltiple. El interferón beta es un interferón beta 1b.

45 El interferón beta en la formulación de la presente invención puede ser preferentemente un conjugado específico en el extremo N-terminal. Los presentes inventores demostraron que se une al extremo N-terminal a fin de mejorar la actividad.

El término "actividad", como se usa en la presente memoria, significa que el interferón beta exhibe su función por la unión al receptor de interferón beta.

Tal conjugación específica en el extremo N-terminal puede lograrse mediante el control del pH, y preferentemente, en el intervalo de 4,5 a 7,5.

50 El término "N-terminal", como se usa en la presente memoria, se puede usar de forma intercambiable con "región N-terminal".

La región Fc de inmunoglobulina usada en la preparación de interferón beta de acción prolongada es segura para su uso como un vehículo farmacéutico ya que es un polipéptido biodegradable que es metabolizado *in vivo*. Además, la región Fc de inmunoglobulina tiene un peso molecular relativamente bajo, en comparación con las moléculas enteras de inmunoglobulina, y por consiguiente es ventajosa en la preparación, la purificación y el rendimiento del conjugado. La región Fc de inmunoglobulina no contiene fragmento Fab alguno, que es altamente no homogéneo debido a las diferentes secuencias de aminoácidos según las subclases de anticuerpos, y por consiguiente se puede esperar que la región Fc de inmunoglobulina pueda aumentar en gran medida la homogeneidad de las sustancias y sea menos antigénica.

La expresión "región Fc de inmunoglobulina", como se usa en la presente memoria, se refiere a una proteína que contiene la región 2 constante de cadena la pesada (CH2) y la región 3 constante de cadena la pesada (CH3) de una inmunoglobulina, con exclusión de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, la región 1 constante de la cadena pesada (CH1) y la región 1 constante de la cadena ligera (CL1) de la inmunoglobulina. Puede incluir además una región bisagra en la región constante de la cadena pesada. Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede contener una parte o la totalidad de la región Fc que incluye la región 1 constante de la cadena pesada (CH1) y/o la región 1 constante de la cadena ligera (CL1), excepto para las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, siempre que tenga una función fisiológica sustancialmente similar o mejor que la proteína nativa. También, puede ser un fragmento que tiene una delección en una porción relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de CH2 y/o CH3. Es decir, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede comprender 1) un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio CH4, 2) un dominio CH1 y un dominio CH2, 3) un dominio CH1 y un dominio CH3, 4) un dominio CH2 y un dominio CH3, 5) una combinación de uno o más dominios y una región bisagra de la inmunoglobulina (o una porción de la región bisagra), y 6) un dímero de cada dominio de las regiones constantes de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera.

Además, la región Fc de inmunoglobulina en la formulación de la presente invención incluye un derivado (mutante) de secuencia de la misma, así como una secuencia de aminoácidos nativa. Un derivado de secuencia de aminoácidos tiene una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos nativa debido a una delección, una inserción, una sustitución no conservadora o conservadora o combinaciones de las mismas de uno o más restos de aminoácidos. Por ejemplo, en una Fc de IgG, los restos de aminoácidos conocidos por ser importantes en la unión, en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322 o 327 a 331, pueden usarse como un objetivo adecuado para la modificación. Además, son posibles diversos derivados, incluyendo los derivados que tienen una delección de una región capaz de formar un enlace disulfuro, una delección de varios restos de aminoácidos en el extremo N-terminal de una forma Fc nativa o una adición de residuo de metionina en el extremo N-terminal de una forma Fc nativa. Además, para eliminar funciones efectoras, una delección puede ocurrir en un sitio de unión del complemento, tal como un sitio de unión a C1q y un sitio ADCC. Técnicas de preparación de tales derivados de secuencia de la región Fc de inmunoglobulina se desvelan en los documentos WO 97/34631 y WO 96/32478.

Los intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos, que generalmente no alteran la actividad de las moléculas, son conocidos en la materia (H. Neurath, R.L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York, 1979). Los intercambios que ocurren con más frecuencia son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, en ambas direcciones.

La región Fc, si se desea, puede modificarse por fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación y similares.

Los derivados de Fc anteriormente mencionados son derivados que tienen una actividad biológica idéntica a la de la región Fc o una mejor estabilidad estructural, por ejemplo, contra el calor, pH o similares.

Además, estas regiones Fc puede obtenerse a partir de formas nativas aisladas de seres humanos y otros animales, incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsters, ratas y conejillos de indias, o pueden ser recombinantes o derivados de los mismos, obtenidos a partir de células o microorganismos animales transformados. En la presente memoria, se pueden obtener a partir de una inmunoglobulina nativa mediante el aislamiento de las inmunoglobulinas enteras de organismos humanos o animales y tratarse con una enzima proteolítica. La papaína digiere la inmunoglobulina nativa en regiones Fab y Fc y el tratamiento con pepsina da lugar a la producción de fragmentos pF<sup>c</sup> y F(ab)<sub>2</sub>. Estos fragmentos pueden ser sometidos, por ejemplo, a cromatografía de exclusión por tamaños para aislar Fc o pF<sup>c</sup>.

Preferentemente, una región Fc derivada de humanos es una región Fc de inmunoglobulina recombinante que se obtiene a partir de un microorganismo.

Además, la región Fc de inmunoglobulina en la formulación de la presente invención puede encontrarse en la forma que tiene cadenas de azúcar nativas, un aumento de cadenas de azúcar en comparación con una forma nativa o una disminución de cadenas de azúcar en comparación con la forma nativa, o puede encontrarse en una forma desglicosilada. El aumento, disminución o eliminación de las cadenas de azúcar de Fc de inmunoglobulina puede lograrse por procedimientos comunes en la materia, tales como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático y un procedimiento de modificación por ingeniería genética usando un microorganismo. La eliminación de las cadenas de azúcar de una región Fc da como resultado una fuerte disminución de la afinidad de unión al

complemento (clq) y a una disminución o pérdida en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo o citotoxicidad dependiente del complemento, con lo que no induce respuestas inmunitarias innecesarias *in vivo*. A este respecto, una región Fc de inmunoglobulina en una forma desglicosilada o aglicosilada puede ser más adecuada con el objeto de la presente invención como vehículo farmacéutico.

- 5 El término "desglicosilación", como se usa en la presente memoria, significa eliminar enzimáticamente restos de azúcar a partir de una región Fc, y el término "aglicosilación" significa que una región Fc se produce en una forma no glicosilada por una procariota, preferentemente *E. coli*.

Además, la región Fc de inmunoglobulina puede ser una región Fc que se deriva de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, o que se realiza por combinaciones de las mismas o híbridos de las mismas. Preferentemente, se deriva de IgG o IgM, que se encuentran entre las proteínas más abundantes en la sangre humana, y lo más preferentemente de IgG, que es conocida por potenciar la semivida de las proteínas unidas al ligando.

10 El término "combinación", como se usa en la presente memoria, significa que los polipéptidos que codifican regiones Fc de inmunoglobulina de cadena única del mismo origen se unen a un polipéptido de cadena sencilla de un origen diferente para formar un dímero o multímero. Es decir, un dímero o multímero puede formarse a partir de dos o más fragmentos seleccionados entre el grupo que consiste en fragmentos Fc de IgG, Fc de IgA, Fc de IgM, Fc de IgD y Fc de IgE.

15 El término "híbrido", como se usa en la presente memoria, significa que las secuencias que codifican dos o más regiones Fc de inmunoglobulina de diferente origen están presentes en una región Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla. En la presente invención, son posibles varios tipos de híbridos. Es decir, los dominios híbridos pueden estar compuestos de uno a cuatro dominios seleccionados entre el grupo que consiste en CH1, CH2, CH3 y CH4 de Fc de IgG, Fc de IgM, Fc de IgA, Fc de IgE y Fc de IgD, y pueden incluir la región bisagra.

20 Por otra parte, IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la presente invención incluye combinaciones o híbridos de las mismas. Las subclases preferentes son IgG2 e IgG4, y lo más preferente es la región Fc de IgG4 que rara vez tiene funciones efectoras tales como CDC (citotoxicidad dependiente del complemento).

25 Al igual que el vehículo farmacéutico en la formulación de la presente invención, la región Fc de inmunoglobulina más preferente es una región Fc no glicosilada derivada de la IgG4 humana. La región Fc derivada de humanos es más preferente que una región Fc derivada de no humanos, que puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y causar respuestas inmunitarias indeseables tales como la producción de un nuevo anticuerpo contra el antígeno.

30 La expresión "polímero no peptídico", como se usa en la presente memoria, se refiere a un polímero biocompatible que incluye dos o más unidades de repetición unidas entre sí por cualquier enlace covalente con exclusión de un enlace peptídico.

35 El polímero no peptídico que se puede usar en la presente invención puede seleccionarse entre el grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxetilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, éter polivinilético, polímeros biodegradables tales como APL (ácido (poliláctico)) y APLG (ácido poliláctico-glicólico), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos, y preferentemente, polietilenglicol. Los derivados de los mismos bien conocidos en la materia y que se preparan con facilidad dentro de la experiencia de la materia, también se incluyen en el ámbito de la presente invención.

40 El enlazador peptídico que se usa en la proteína de fusión obtenida por un procedimiento de fusión en marco convencional tiene inconvenientes ya que se escinde con facilidad *in vivo* por una enzima proteolítica, y por consiguiente no se puede obtener como se esperaba un efecto suficiente para aumentar la semivida en suero del fármaco activo por un vehículo. Sin embargo, en la presente invención, el polímero que tiene resistencia a la enzima proteolítica puede ser usado para mantener la semivida en suero del péptido que es similar a la del vehículo. Por lo tanto, cualquier polímero no peptídico se puede usar sin limitación alguna, con tal de que sea un polímero que tenga la función antes mencionada, es decir, un polímero que tenga resistencia a la enzima proteolítica *in vivo*. El polímero no peptídico tiene un peso molecular en el intervalo de 1 a 100 kDa, más preferentemente 1 a 90 kDa, más preferentemente 1 a 80 kDa, más preferentemente 1 a 70 kDa, más preferentemente 1 a 60 kDa, más preferentemente 1 a 50 kDa, más preferentemente 1 a 40 kDa, más preferentemente 1 a 30 kDa, y lo más preferentemente 1 a 20 kDa. El polímero no peptídico de la presente invención, unido a la región Fc de inmunoglobulina, puede ser un polímero o una combinación de diferentes tipos de polímeros.

45 El polímero no peptídico usado en la presente invención tiene un grupo reactivo capaz de unirse a la región Fc de inmunoglobulina y al fármaco proteico.

55 El polímero no peptídico tiene un grupo reactivo en ambos extremos, que se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en un grupo reactivo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida. El derivado de succinimida puede ser propionato de succinimidilo,

hidroxisuccinimidilo, succinimidilcarboximetilo o carbonato de succinimidilo. En particular, cuando el polímero no peptídico tiene un grupo reactivo aldehído como dos o tres grupos terminales reactivos, es eficaz en la unión en ambos extremos con un polipéptido fisiológicamente activo y una inmunoglobulina con reacciones no específicas mínimas. Un producto final generado por alquilación reductora por un enlace aldehído es mucho más estable que el unido por un enlace amida. El grupo reactivo aldehído se une de forma selectiva a un extremo N-terminal a un pH bajo, y se une a un residuo de lisina para formar un enlace covalente a un pH alto, tal como a pH 9,0.

Los dos grupos terminales reactivos del polímero no peptídico pueden idénticos o diferentes unos de otros. Por ejemplo, el polímero no peptídico puede poseer un grupo maleimida en un extremo y un grupo aldehído, un grupo propionaldehído o un grupo butiraldehído en el otro extremo. Cuando un polietilenglicol que tiene un grupo reactivo hidroxilo en ambos extremos del mismo se usa como el polímero no peptídico, el grupo hidroxilo puede ser activado en diversos grupos reactivos por reacciones químicas conocidas, o un polietilenglicol que tiene un grupo reactivo modificado disponible comercialmente puede ser usado para preparar el conjugado proteico de la presente invención.

La formulación de acción prolongada de la presente invención tiene un excelente efecto para mantener una duración y una estabilidad *in vivo*. De conformidad con el Ejemplo específico de la presente invención, la formulación de interferón beta de acción prolongada de la presente invención tiene un aumento de aproximadamente 10 veces en la semivida, en comparación con el interferón beta nativo (Tabla 1).

La formulación de acción prolongada de la presente invención puede administrarse mediante cualquiera de las vías habituales, siempre que el interferón beta sea capaz de alcanzar un tejido deseado. Se contempla una variedad de modos de administración, incluyendo vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal, pero la presente invención no se limita a estos modos ejemplificados de administración. Sin embargo, ya que los péptidos se digieren después de la administración oral, los principios activos de una composición para administración oral han de estar recubiertos o formularse para la protección contra la degradación en el estómago. Preferentemente, la formulación de acción prolongada se puede administrar en una forma inyectable. Además, la formulación de acción prolongada de la presente invención puede administrarse usando un determinado aparato capaz de transportar los principios activos a una célula diana.

La formulación de acción prolongada que comprende el conjugado de la presente invención puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para administración oral, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un aglutinante, un lubricante, un disgregante, un excipiente, un solubilizante, un agente dispersante, un estabilizante, un agente de suspensión, un agente colorante y un perfume. Para preparaciones inyectables, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un agente tampón, un agente conservante, un analgésico, un solubilizante, un agente isotónico y un estabilizador. Para preparaciones para administración tópica, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir una base, un excipiente, un lubricante y un agente conservante. La formulación de acción prolongada de la presente invención puede formularse en una variedad de formas de dosificación en combinación con los vehículos anteriormente mencionados farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, para administración oral, la formulación de acción prolongada se puede formular en comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para preparaciones inyectables, la formulación de acción prolongada se puede formular en una ampolla de dosis única o un recipiente multidosis. La formulación de acción prolongada también se puede formular en soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas y preparaciones de liberación sostenida.

Los ejemplos del vehículo, excipiente y diluyente adecuados para las formulaciones incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio o aceites minerales. Además, las formulaciones pueden incluir adicionalmente materiales de carga, agentes anti-coagulantes, lubricantes, humectantes, perfumes y antisépticos.

La formulación de acción prolongada de la presente invención puede ser determinada por varios factores relacionados, incluyendo los tipos de enfermedades a tratar, las vías de administración, la edad del paciente, el sexo, el peso y la gravedad de la enfermedad, así como por los tipos del fármaco como un componente activo. Puesto que la formulación de acción prolongada de la presente invención tiene una excelente duración y título *in vivo*, se puede reducir notablemente la frecuencia de administración y la dosis de la formulación de acción prolongada de la presente invención.

La formulación de acción prolongada de la presente invención mejora la duración y la estabilidad *in vivo* del interferón beta, y por consiguiente se puede usar eficazmente para el tratamiento o la prevención de la enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en infecciones virales, enfermedades autoinmunitarias, cáncer y trastornos degenerativos del sistema nervioso.

El cáncer incluye cáncer de ovarios, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de pulmón, leucemia, linfoma, melanoma, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, neuroma, carcinoma, sarcoma, adenoma y mieloma.

Las enfermedades degenerativas del sistema nervioso incluyen esclerosis múltiple, más particularmente, esclerosis múltiple remitente recidivante, primaria progresiva y secundaria progresiva.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de una formulación de interferón beta de acción prolongada, que comprende las etapas que consisten en:

- 5 (1) unir de manera covalente un polímero no peptídico que tiene un grupo reactivo de derivados de aldehído, maleimida o succinimida en ambos extremos del mismo, con un grupo amina o un grupo tiol de interferón beta 1b;
- 10 (2) aislar un producto de reacción de la mezcla de reacción de (1), en el que el producto de reacción comprende un interferón beta unido covalentemente con el polímero no peptídico en un sitio distinto del extremo N-terminal;
- y
- (3) unir de manera covalente un Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptídico del producto de reacción aislado para producir un conjugado que comprende la región Fc de inmunoglobulina y el interferón beta que están unidos a cada extremo del polímero no peptídico.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una formulación de acción prolongada de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene una infección viral, enfermedad autoinmunitaria, cáncer o trastorno degenerativo del sistema nervioso.

Como se usa en la presente memoria, un sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, un caballo, una oveja, un gato, un perro, una vaca o un cerdo.

### **Modo de la invención**

20 En lo sucesivo, una mejor comprensión de la presente invención se puede obtener a través de los siguientes Ejemplos que se exponen para ilustrarse, pero no deben interpretarse como el límite de la presente invención.

#### **Ejemplo 1. Purificación de interferón beta 1b pegilado**

El interferón beta 1b (interferón beta 1b Hanmi) producido por el presente inventor se preparó a una concentración de 1 mg/ml y para la pegilación del interferón beta en su extremo N-terminal, se añadió PropionilALD<sub>2</sub> PEG 3,4 kDa en una relación molar de interferón y PEG de 1:15 y se disolvió completamente. A partir de ahí, se le añadieron a los mismos NaCNBH<sub>3</sub> 20 mM como agente reductor y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 90 min. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó 10 veces con fosfato de potasio 50 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0), y se aplicó a una columna SP HP (Hitrap 5 ml, GE Healthcare). La columna SP HP se equilibró con fosfato de potasio 20 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0), y el caudal fue de 5 ml/min. Para la purificación de interferón monopegilado, se aplicaron fosfato de potasio 20 mM que contenía detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0) y NaCl 1 M de 0 a 40 % con 40 volúmenes de columna para purificar el interferón beta 1b monopegilado.

#### **Ejemplo 2. Preparación del conjugado de interferón beta 1b-Fc de inmunoglobulina**

El interferón beta 1b pegilado obtenido en el Ejemplo 1 se acopló con un Fc de inmunoglobulina. La reacción se realizó a una relación molar de interferón beta:Fc de inmunoglobulina de 1:10 y una concentración total de proteínas de 50 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. En este momento, se le añadieron al mismo NaCNBH<sub>3</sub> 20 mM como agente reductor. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó 15 veces con fosfato de potasio 50 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0), y se aplicó a una columna SP HP (Hitrap 5 ml, GE Healthcare). La columna SP HP se equilibró con fosfato de potasio 20 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0), y el caudal fue de 5 ml/min. Para la elución de la proteína acoplada, se aplicaron fosfato de potasio 20 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0) y NaCl 1 M mediante un gradiente lineal de 0 a 40 % con 40 volúmenes de columna. La columna SP HP se usó para eliminar Fc de inmunoglobulina que no ha reaccionado. La solución de proteína de acoplamiento eluida de la columna SP HP se diluyó 20 veces con Tris-HCl 20 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 8,0), y se aplicó a una columna Q HP (Hitrap 5 ml, GE Healthcare). La columna Q HP se equilibró con Tris-HCl 20 mM que contenía 0,05 % de zwittergent 3-14 (pH 8,0), y el caudal fue de 5 ml/min. Para la purificación del interferón beta-PEG-Fc de inmunoglobulina, se aplicaron Tris-HCl 20 mM que contenía 0,05 % de zwittergent 3-14 (pH 8,0) y NaCl 1 M por un gradiente lineal de 0 a 40 % con 40 volúmenes de columna. El conjugado de interferón beta 1b-Fc de inmunoglobulina purificado de la columna Q HP se analizó por RP-HPLC, y los resultados se muestran en la FIG. 1.

#### **Ejemplo 3. Purificación del interferón beta 1a pegilado**

Para la pegilación del interferón beta 1a (GEMA Biotech), la composición tamponada se cambió a fosfato de potasio 50 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0) y NaCl 100 mM. El interferón beta 1a se preparó a una concentración de 1 mg/ml, y para la pegilación del interferón beta en su extremo N-terminal, se añadió butirALD<sub>2</sub> PEG 3,4 kDa en una relación molar de interferón y PEG de 1:20 y se disolvió completamente. A partir de entonces, se le añadieron a los mismos NaCNBH<sub>3</sub> 20 mM como agente reductor, y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 90 min. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó 10 veces con fosfato de

potasio 20 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0), y se aplicó a una columna SP HP (Hitrap 5 ml, GE Healthcare). La columna SP HP se equilibró con fosfato de potasio 20 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0), y el caudal fue de 5 ml/min. Para la purificación del interferón monopegilado, se aplicaron fosfato de potasio 20 mM que contenía detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0) y NaCl 1 M de 0 a 40 % con 40 volúmenes de columna para la purificación. Tras la reacción de PropionilALD<sub>2</sub> PEG 3,4 kDa con un interferón beta 1a, se purificó el interferón beta monopegilado.

#### Ejemplo 4. Preparación del conjugado de interferón beta 1a-Fc de inmunoglobulina

El interferón beta monopegilado purificado en el Ejemplo 3 se acopló con un Fc de inmunoglobulina. La reacción se realizó a una relación molar de interferón beta:Fc de inmunoglobulina de 1:50 y una concentración total de proteínas de 50 mg/ml a temperatura ambiente durante 2 horas. En este momento, se le añadieron a los mismos NaCNBH<sub>3</sub> 20 mM como agente reductor. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó 15 veces con fosfato de potasio 20 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0), y se aplicó a una columna SP HP (Hitrap 5 ml, GE Healthcare). La columna SP HP se equilibró con fosfato de potasio 20 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0), y el caudal fue de 5 ml/min. Para la elución de la proteína acoplada, se aplicaron fosfato de potasio 20 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0) y NaCl 1 M mediante un gradiente lineal de 0 a 40 % con 40 volúmenes de columna. La columna SP HP se usó para eliminar Fc de inmunoglobulina que no ha reaccionado. Se añadió sulfato de amonio 2 M a la solución de proteína de acoplamiento eluida de la columna SP HP con agitación lenta a una concentración final de sulfato de amonio 1,5 M, y a continuación se aplicó a una columna SOURCE ISO (1 ml, GE Healthcare). La columna SOURCE ISO se equilibró con fosfato de potasio 50 mM (pH 6,0), tampón de sulfato de amonio 1,5 M, y el caudal fue de 3 ml/min. Para eluir la proteína acoplada, se aplicó un tampón de fosfato de potasio 50 mM por un gradiente lineal de 0 a 100 % con 90 volúmenes de columna para la purificación.

#### Ejemplo 5. Preparación del interferón beta 1b PEG 20 kDa

El interferón 1b beta Hanmi se preparó a una concentración de 1 mg/ml, y para la pegilación del interferón beta en su extremo N-terminal, se añadió PropionilALD PEG 20 kDa en una relación molar de interferón y PEG de 1:15 y se disolvió completamente. Como tampón de pegilación, se usaron fosfato potásico 100 mM que contenía 0,05 % de zwittergent 3-14 (pH 6,0) y NaCl 5 mM, y se añadió NaCNBH<sub>3</sub> 20 mM como agente reductor al mismo, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 90 min. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó 10 veces con fosfato de potasio 50 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0), y se aplicó a una columna SP HP (Hitrap 5 ml, GE Healthcare). La columna SP HP se equilibró con fosfato de potasio 20 mM que contenía 0,05 % de detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0), y el caudal fue de 5 ml/min. Para la purificación de interferón monopegilado, se aplicaron fosfato de potasio 20 mM que contenía detergente zwittergent 3-14 (pH 6,0) y NaCl 1 M de 0 a 40 % con 40 volúmenes de columna para purificar el interferón beta 1b monopegilado.

#### Ejemplo 6. Preparación de interferón beta 1a 20 kDa

El interferón beta 1a (GEMA Biotech) se preparó a una concentración de 1 mg/ml, y para la pegilación del interferón beta en su extremo N-terminal, se añadió PropionilALD PEG 20 kDa en una relación molar de interferón y PEG de 1:5 y se disolvió completamente en tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,5) que contenía NaCl 150 mM. Se añadió al mismo NaCNBH<sub>3</sub> 20 mM como agente reductor, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 18 horas. A continuación, la mezcla de reacción se concentró, y se aplicó a una columna Superdex 75 (120 ml, GE Healthcare). La columna se equilibró con tampón fosfato de sodio 30 mM que contenía NaCl 150 mM (pH 6,5), y el caudal fue de 1 ml/min para purificar el interferón beta 1a monopegilado.

#### Ejemplo 7. Medición de la actividad *in vivo* y FC de interferón de acción prolongada

La actividad celular *in vitro* se midió para analizar los parámetros de eficacia y farmacocinética de la formulación de interferón beta de acción prolongada. Para la medición de la actividad *in vitro* del interferón beta, se usó en general una célula de WISH (CACT) para llevar a cabo un ensayo de efecto citopático. Las células de WISH se trataron con concentraciones variables de interferón beta y materiales de ensayo de interferón beta de acción prolongada, y la protección contra el virus de la estomatitis vesicular se determinó como el valor de CE50 para medir la actividad *in vitro*.

Además, el plasma sanguíneo fue aislado de animales (rata normal S.D) tratados con interferón beta y la formulación de acción prolongada, y los parámetros farmacocinéticos se calcularon mediante el ensayo de CPE de la misma manera que el ensayo de actividad *in vitro*.

Tabla 1

[Tabla 1]

Material de ensayo	Semivida en suero (h)	Título <i>in vitro</i> (%)
Interferón beta 1a (Avonex)	N.D.	100,0
Interferón beta 1b (Betaseron)	N.D.	16,8
Interferón beta 1a (GEMA Biotech)	N.D.	82,4
Conjugado de interferón beta 1a (GEMA Biotech)-Fc	46,86	10,9
Interferón beta 1a (GEMA Biotech)-PEG 20 KDa	24,28	13,5
Interferón beta 1b Hanmi	4,28	38,1
Conjugado de interferón beta 1b Hanmi-Fc	41,21	40,2
Interferón beta 1b Hanmi-PEG 20 KDa	19,54	30,1

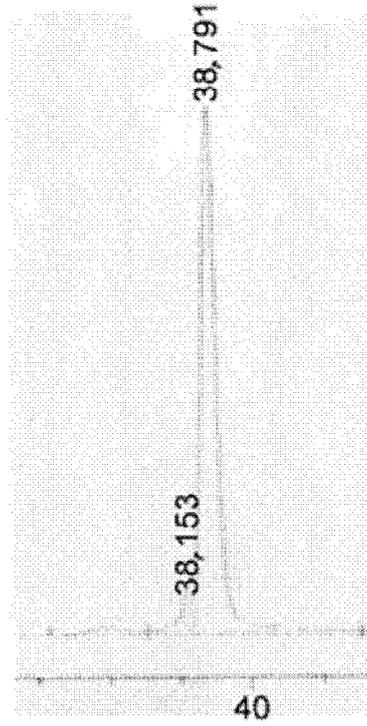
La Tabla 1 muestra la actividad celular *in vitro* y la semivida en suero de cada material de ensayo. En la presente memoria, se determinaron sus actividades celulares *in vitro*, en base al valor del interferón beta 1a (Avonex), y se descubrió que el conjugado de interferón beta 1b Hanmi-Fc tenía un título que era equivalente o superior al del interferón beta 1b Hanmi antes de la preparación del conjugado. Se descubrió que el interferón beta 1b nativo tenía T 1/2 de 4,28 horas, lo que indica una semivida en suero breve. Se descubrió que el conjugado de interferón beta 1b-Fc tenía una semivida en suero inferior y un título superior que el conjugado de interferón beta 1a-Fc. Además, el conjugado de interferón beta-Fc mostró una semivida en suero más larga que el conjugado de interferón beta-PEG 20 kDa.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación de interferón beta de acción prolongada que tiene una duración y una estabilidad *in vivo* mejoradas, que comprende un conjugado de interferón beta que se compone de un interferón beta unido a una región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico seleccionado entre el grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, éter polivinilético, polímeros biodegradables, polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y una combinación de los mismos, en la que el interferón beta es un interferón beta 1b.
2. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 1, en la que cada polímero no peptídico se une al extremo N-terminal del interferón beta.
- 10 3. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 1, en la que el extremo del polímero no peptídico se une a un grupo amina o a un grupo tiol, respectivamente, de la región Fc de inmunoglobulina y del interferón beta.
- 15 4. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 1, en la que la región Fc de inmunoglobulina tiene una secuencia de aminoácidos nativa o una secuencia modificada, en la que uno o más residuos en una secuencia de aminoácidos nativa se modifican por uno cualquiera del procedimiento seleccionado entre el grupo que consiste en delección, inserción, sustitución no conservadora o conservadora y una combinación de las mismas.
5. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 1, en la que la región Fc de inmunoglobulina está aglicosilada.
- 20 6. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 1, en la que la región Fc de inmunoglobulina se compone de uno a cuatro dominios seleccionados entre el grupo que consiste en los dominios CH1, CH2, CH3 y CH4.
7. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 1, en la que la región Fc de inmunoglobulina es un dímero de la región constante de la cadena pesada y de la región constante de la cadena ligera seleccionado entre el grupo que consiste en los dominios CH1, CH2, CH3 y CH4.
- 25 8. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 6, en la que la región Fc de inmunoglobulina comprende además una región bisagra.
9. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 1, en la que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc derivada de IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.
- 30 10. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 9, en la que cada dominio de la región Fc de inmunoglobulina es un dominio híbrido de origen diferente derivado de una inmunoglobulina seleccionada entre el grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE y IgM.
- 35 11. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 9, en la que la región Fc de inmunoglobulina es un dímero o un multímero que se compone de inmunoglobulinas de cadena sencilla compuestas por dominios del mismo origen.
12. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 9, en la que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4.
13. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 12, en la que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4 aglicosilada humana.
- 40 14. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 1, en la que el polímero no peptídico tiene un peso molecular comprendido en el intervalo que va de 1 kDa a 100 kDa.
15. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 1, en la que el polímero no peptídico tiene un peso molecular comprendido en el intervalo que va de 1 kDa a 20 kDa.
- 45 16. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 1, en la que el grupo reactivo del polímero no peptídico se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida.
17. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 16, en la que el derivado de succinimida se selecciona entre el grupo que consiste en propionato de succinimidilo, succinimidilcarboximetilo, hidroxisuccinimidilo y carbonato de succinimidilo.
- 50 18. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 16, en la que el polímero no peptídico tiene un grupo aldehído reactivo en ambos extremos.

19. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 1, en la que la formulación se usa para el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en infecciones virales, enfermedades autoinmunitarias, cáncer y trastornos degenerativos del sistema nervioso.
- 5 20. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 19, en la que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de ovarios, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de pulmón, leucemia, linfoma, melanoma, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, neuroma, carcinoma, sarcoma, adenoma y mieloma.
- 10 21. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 19, en la que los trastornos degenerativos del sistema nervioso son la esclerosis múltiple.
22. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 21, en la que la esclerosis múltiple se selecciona entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple remitente recidivante, primaria progresiva y secundaria progresiva.
- 15 23. La formulación de interferón beta de acción prolongada según la reivindicación 19, que comprende además un fármaco seleccionado entre el grupo que consiste en los agentes antivirales conocidos, agentes anti-cancerígenos, agentes anti-inflamatorios y un agente profiláctico o terapéutico para enfermedades autoinmunitarias y esclerosis múltiple.
24. Un procedimiento de preparación de la formulación de interferón beta de acción prolongada de la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- 20 (1) unir de manera covalente un polímero no peptídico que tiene un grupo reactivo de derivados de aldehído, maleimida o succinimida en ambos extremos del mismo, con un grupo amina o un grupo tiol de interferón beta;
- (2) aislar un producto de reacción de la etapa (1), en el que el producto de reacción comprende un interferón beta unido covalentemente con el polímero no peptídico en un sitio distinto del extremo N-terminal; y
- 25 (3) unir de manera covalente un Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptídico del producto de reacción aislado para producir un conjugado de interferón beta que comprende la región Fc de inmunoglobulina y el interferón beta que están unidos a cada extremo del polímero no peptídico.
- 30 25. Una composición para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene una infección viral, enfermedad autoinmunitaria, cáncer o trastorno degenerativo del sistema nervioso, que comprende una cantidad eficaz de la formulación de acción prolongada de la reivindicación 1.

[Fig. 1]

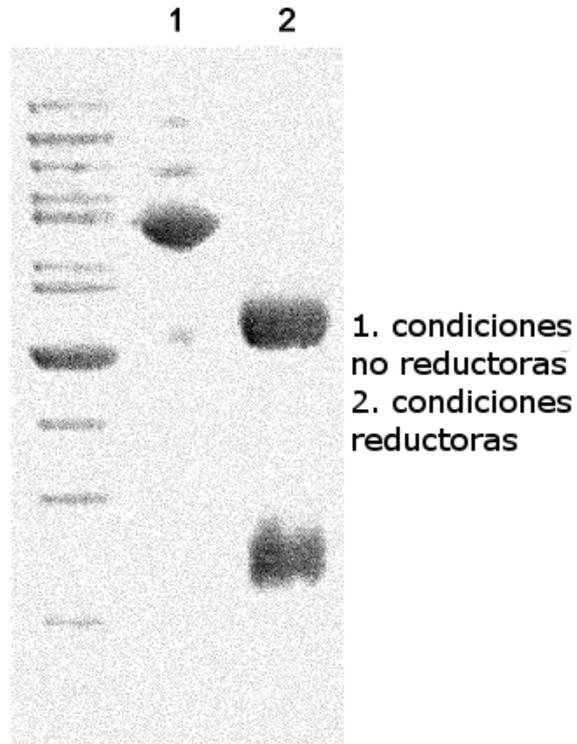


[Fig. 2]

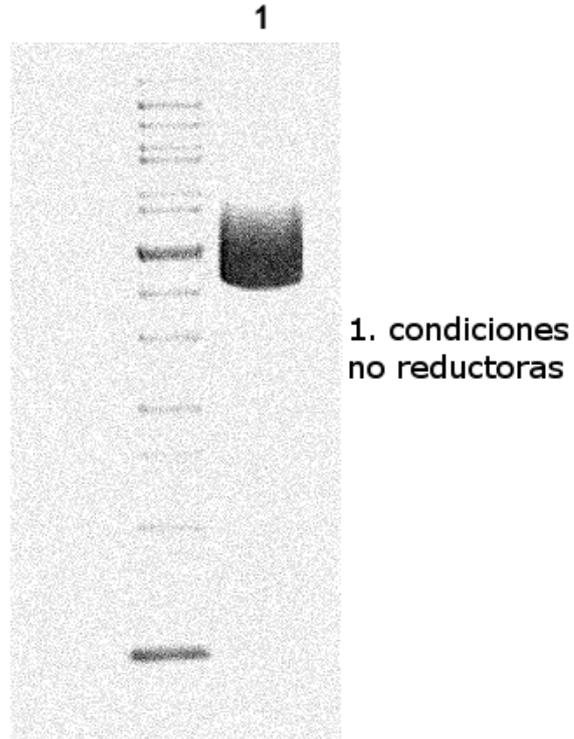


1. condiciones no reductoras  
2. condiciones reductoras

[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]

