



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 276 698**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 38/57 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00968584 .3**

86 Fecha de presentación : **03.10.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1220682**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.07.2002**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que contienen un polipéptido líquido estabilizado.**

30 Prioridad: **04.10.1999 US 157696 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

73 Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72 Inventor/es: **Chen, Bao-Lu y**
Hora, Maninder

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas que contienen un polipéptido líquido estabilizado.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a la preparación de composiciones farmacéuticas líquidas que comprenden interleucina-2 (IL-2) o variantes de la misma, que normalmente son inestables en formulaciones farmacéuticas líquidas.

10 **Antecedentes de la invención**

Recientes avances en el desarrollo de la tecnología de ingeniería genética han proporcionado una amplia variedad de polipéptidos biológicamente activos en cantidades suficientemente grandes para usar como fármacos. Sin embargo, los polipéptidos pueden perder actividad biológica como resultado de inestabilidades físicas, incluida la desnaturación y la formación de agregados solubles e insolubles, y una variedad de inestabilidades químicas, tales como hidrólisis, oxidación y desamidación. La estabilidad de los polipéptidos en formulaciones farmacéuticas líquidas se puede ver afectada, por ejemplo, por factores tales como el pH, la fuerza iónica, la temperatura, los ciclos repetidos de congelación-descongelación y la exposición a fuerzas de cizalladura mecánicas tales como las que se producen durante el procesamiento. LA formación de agregados y la pérdida de actividad biológica también se pueden producir como resultado de la agitación física y las interacciones de moléculas polipeptídicas en solución y en las interfases líquido-aire dentro de los viales de almacenamiento. Se pueden producir cambios conformacionales adicionales en los polipéptidos adsorbidos en las interfases aire-líquido y sólido-líquido durante la compresión-extensión de las interfases resultantes de la agitación durante el transporte o en otro momento. Tal agitación puede causar que la proteína se líe, agregue, forme partículas y, en último término, precipite con otras proteínas adsorbidas. Para una revisión general de la estabilidad de productos farmacéuticos proteicos, véase, por ejemplo, Manning y col. (1989) *Pharm. Res.* 6: 903-918 y Wang y Hanson (1988) *J. Parenteral Sci. Tech.* 42: S14.

La inestabilidad de formulaciones farmacéuticas líquidas que contienen polipéptidos ha urgido el envasado de estas formulaciones en la forma liofilizada junto con un medio líquido adecuado para la reconstitución. Aunque la liofilización mejora la estabilidad durante el almacenamiento de la composición, muchos polipéptidos exhiben una disminución de la actividad, bien durante el almacenamiento en el estado seco (Pikal (1990) *Biopharm.* 27: 26-30) o como resultado de la formación de agregados o la pérdida de actividad catalítica tras la reconstitución como una formulación líquida (véase, por ejemplo, Carpenter y col. (1991) *Develop. Biol. Standard* 74: 225-239; Broadhead y col. (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18: 1169-1206; Mumenthaler y col. (1994) *Pharm. Res.* 11: 12-20; Carpenter y Crowe (1988) *Cryobiology* 25: 459-470; y Roser (1991) *Biopharm.* 4: 47-53).

El documento EP0229016 describe composiciones líquidas de IL-2 que después se liofilizan, donde dichas composiciones comprenden arginina o lisina y ácido tartárico o ácido láctico, y que poseen un pH de 7. Sin embargo, la IL-2 se somete a un pH extremo durante la preparación de las composiciones de IL-2, que pueden hacer que el polipéptido se desnaturalice, lo que afecta a su actividad biológica.

El documento US 5.078.997 describe composiciones líquidas liofilizadas y después reconstituidas de IL-2, que comprenden arginina y un tampón de citrato.

Aunque el uso de aditivos ha mejorado la estabilidad de las proteínas secas, muchas formulaciones rehidratadas continúan teniendo cantidades inaceptables o indeseables de proteína agregada inactiva (véase, por ejemplo, Townsend y DeLuca (1983) *J. Pharm. Sci.* 80: 63-66; Hora y col. (1992) *Pharm. Res.* 9: 33-36; Yoshioka y col. (1993) *Pharm. Res.* 10: 687-691). Asimismo, la necesidad de la reconstitución es un inconveniente e introduce la posibilidad de dosificación incorrecta.

Aunque se ha formulado una serie de composiciones farmacéuticas líquidas para estabilizar la actividad biológica de los polipéptidos contenidos en ellas, la degradación de los polipéptidos en formulaciones líquidas continúa creando problemas a los facultativos médicos. En consecuencia, existe una necesidad de composiciones farmacéuticas adicionales, que comprenden estabilizantes fisiológicamente compatibles que estimulan la estabilidad de los componentes polipeptídicos, de modo que se mantiene su eficacia terapéutica.

Resumen de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para preparar composiciones que comprenden un polipéptido de IL-2 como componente terapéuticamente activo. El procedimiento de la invención se define en las reivindicaciones y se proporcionan procedimientos útiles en su preparación. Las composiciones preparadas mediante el procedimiento de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas que incluyen un polipéptido de IL-2 cuya eficacia como componente terapéuticamente activo está normalmente comprometida durante el almacenamiento en formulaciones líquidas como resultado de la agregación del polipéptido. Las composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas comprenden, además de la IL-2 que exhibe formación de agregados de la IL-2 durante el almacenamiento en una formulación líquida, una cantidad de un aminoácido base suficiente para disminuir la formación de agregados de la IL-2 durante el almacenamiento, donde el aminoácido base es un aminoácido o una combinación de aminoácidos

seleccionados del grupo constituido por arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Las composiciones además comprenden un agente tampón para mantener el pH de la composición líquida dentro de un intervalo aceptable para la estabilidad de la IL-2, donde el agente tampón es un ácido sustancialmente libre de su forma en sal.

5 El aminoácido base sirve para estabilizar la IL-2 frente la formación de agregados durante el almacenamiento de la composición líquida farmacéutica, mientras se usa un ácido sustancialmente libre de su forma de sal, ya que el agente tampón tiene como resultado una composición líquida que posee una osmolaridad que es casi isotónica. La composición farmacéutica líquida puede además incorporar otros agentes estabilizantes, más particularmente metionina, un tensioactivo no iónico tal como polisorbato 80, y EDTA, para incrementar más la estabilidad del polipéptido.
10 Tales composiciones farmacéuticas líquidas se dice que están estabilizadas, ya que la adición del aminoácido base en combinación con un ácido sustancialmente libre de su forma de sal, un ácido en su forma de sal o una mezcla de un ácido y su forma de sal, tiene como resultados un incremento de la estabilidad en el almacenamiento de las composiciones en relación con las composiciones farmacéuticas líquidas formuladas en ausencia de la combinación de estos dos componentes.

15 También se proporcionan procedimientos para incrementar la estabilidad de la IL-2 es una composición farmacéutica líquida y para incrementar la estabilidad en el almacenamiento de tal composición farmacéutica. Los procedimientos comprenden incorporar en la composición farmacéutica líquida una cantidad de una aminoácido base suficiente para disminuir la formación de agregados de la IL-2 durante el almacenamiento de la composición, y un agente tampón,
20 donde el agente tampón es un ácido sustancialmente libre de su forma en sal. Los procedimientos encuentran utilidad en la preparación de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención.

Breve descripción de las figuras

25 La Figura 1 muestra el porcentaje restante de IL-2 soluble en muestras de estabilidad almacenadas a 40°C, analizado mediante HPLC-RP. Las formulaciones contenían 0,2 mg/ml de IL-2, succinato sódico 10 mM a pH 6 y sorbitol 270 mM o sacarosa o manitol.

30 La Figura 2 muestra el porcentaje restante de IL-2 soluble en muestras de estabilidad almacenadas a 50°C, analizado mediante HPLC-RP. Las formulaciones contenían 0,1 mg/ml de IL-2, succinato sódico 10 mM a pH 6 y 150 mM de varios aminoácidos indicados en la figura.

35 La Figura 3 muestra el porcentaje restante de IL-2 soluble en muestras de estabilidad almacenadas a 40°C, analizado mediante HPLC-RP. Las formulaciones contenían 0,2 mg/ml de IL-2, succinato sódico 10 mM a pH 6 y 50, 100 ó 270 mM de sorbitol.

40 La Figura 4 muestra el porcentaje restante de IL-2 soluble en muestras de estabilidad almacenadas a 50°C, analizado mediante HPLC-RP. Las formulaciones contenían 0,2 mg/ml de IL-2, succinato sódico 10 mM a pH 6 y 50, 100 ó 150 mM de arginina.

La Figura 5 muestra la semivida ($t_{1/2}$, en días) de IL-2 soluble restante analizado mediante HPLC-RP como función del pH a 50°C. Las formulaciones contenían 0,2 mg/ml de IL-2, 10 mM de tampón (glicina, acetato sódico, citrato sódico, succinato sódico, fosfato sódico, borato sódico) y NaCl 150 mM, sorbitol 270 mM o arginina 150 mM.

45 La figura 6 muestra el gráfico Ln-Ln de la semivida ($t_{1/2}$) frente a la concentración inicial de proteína para las muestras de estabilidad almacenadas a 50°C. Las formulaciones contenían 0,1, 0,2 ó 0,5 mg/ml de IL-2 en succinato sódico 10 mM a pH 6 y L-arginina 150 mM.

50 La Figura 7 muestra el porcentaje restante de IL-2 soluble, analizado mediante HPLC-RP, en muestras tratadas con 1, 3 y 5 ciclos de congelación-descongelación desde -70°C hasta la temperatura ambiente. Las formulaciones contenían 0,2 mg/ml de IL-2, succinato sódico 10 mM, arginina 150 mM y de 0 a 0,1% de polisorbato 80.

55 La Figura 8 muestra el porcentaje restante de IL-2 soluble, analizado mediante HPLC-RP, en muestras tratadas con envío desde Emeryville, California, a San Louis, Missouri, y de San Louis de vuelta a Emeryville en hielo. Se usaron dos formulaciones que contenían varias cantidades de polisorbato 80: una formulación de arginina, que contenía 0,2 mg/ml de IL-2 en succinato sódico 10 mM a pH 6 y arginina 150 mM; y una formulación de NaCl, que contenía 0,2 mg/ml de IL-2 en citrato sódico 10 mM a pH 6,5 y NaCl 200 mM.

60 La Figura 9 muestra la semivida ($t_{1/2}$, en días) del TFPI soluble restante en cuatro formulaciones analizadas mediante IEX-HPLC como una función de la concentración de arginina a 50°C. Todas las formulaciones contenían 0,15 mg/ml de TFPI y o L-arginina base o L-arginina HCL, tamponada a pH 5,5 con ácido cítrico o ácido cítrico y citrato sódico 10 mM. Las formulaciones de TFPI específicas contenían: (s) 20-150 mM L-arginina, ácido cítrico y citrato sódico 10 mM como tampón; (b) L-arginina base 20-150 mM, titulada con ácido cítrico; (c) L-arginina HCl 100-300 mM, ácido cítrico y citrato sódico 10 mM como tampón; (d) L-arginina base 100-300 mM titulada con ácido cítrico.

65 La Figura 10 muestra la semivida ($t_{1/2}$, en días) del TFPI soluble restante en cuatro formulaciones analizadas mediante IEX-HPLC como una función de la concentración de arginina a 50°C. Todas las formulaciones contenían 0,15 mg/ml de TFPI y o L-arginina base o L-arginina HCL, tamponada a pH 5,5 con ácido succínico o con ácido

succínico y succinato sódico 10 mM. Las formulaciones de TFPI específicas contenían: (a) 20-150 mM L-arginina HCl, ácido succínico y succinato sódico 10 mM como tampón; (b) L-arginina base 20-150 mM, titulada con ácido succínico; (c) L-arginina HCl 100-300 mM, ácido succínico y succinato sódico 10 mM como tampón; (d) L-arginina base 100-300 mM titulada con ácido succínico.

La Figura 11 muestra la semivida ($t_{1/2}$, en días) del TFPI soluble restante en cuatro formulaciones analizadas mediante IEX-HPLC como una función de la concentración de arginina a 50°C. Todas las formulaciones contenían 0,15 mg/ml de TFPI y L-arginina base, tamponada a pH 5,5 con ácido succínico o con ácido cítrico. Las formulaciones de TFPI específicas contenían: (a) 20-150 mM L-arginina base 20-150 mM, titulada con ácido cítrico; (b) 20-150 mM L-arginina base 20-150 mM, titulada con ácido succínico; (c) L-arginina base 100-300 mM titulada con ácido cítrico; (d) L-arginina base 100-300 mM, titulada con ácido succínico.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está dirigida a un procedimiento para la preparación de composiciones farmacéuticas líquidas que comprenden un polipéptido de IL-2 como componente terapéuticamente activo y a procedimientos útiles en su preparación. Para los propósitos de la presente invención, se pretende que el término “líquido” en relación con las composiciones farmacéuticas o formulaciones incluya el término “acuoso”. Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “polipéptido de IL-2” abarca polipéptidos y proteínas de IL-2 naturales (nativas), sintéticas y recombinantes, y variantes biológicamente activas de las mismas, donde dicha variante posee al menos un 70% de identidad de secuencia con dicho polipéptido, como se cualifica en otro lugar de la presente memoria descriptiva. Con “componente terapéuticamente activo” se pretende el polipéptido de IL-2, que se incorpora de forma específica en la composición para que provoque una respuesta terapéutica deseada con respecto al tratamiento, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad o afección en un sujeto cuando la composición farmacéutica se administra a dicho sujeto.

Más particularmente, las composiciones preparadas según la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido de IL-2 que normalmente exhibe formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. Por “formación de agregados” se pretende decir una interacción física entre las moléculas de IL-2 que tiene como resultado la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o grandes agregados visibles que precipitan en la solución. Por “durante el almacenamiento” se pretende decir una composición farmacéutica líquida o formulación una vez preparada, no se administra de inmediato a un sujeto. Más bien, tras la preparación, se envasa para su almacenamiento, bien en forma líquida, en un estado congelado o en forma seca para su posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto. Por “forma seca” se pretende decir que la composición o formulación farmacéutica líquida se seca bien mediante liofilización (es decir, liofilización; véase, por ejemplo, Willians y Polli (1984) *J. Parenteral Sci. Technol.* 38: 48-59), pulverización (véase Masters (1991) en *Spray-Drying Handbook* (5ª ed.; Longman Scientific and Technical, Essex, RU), pág. 491-676; Broadhead y col. (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18: 1169-1206; y Mumenthaler y col. (1994) *Pharm. Res.* 11: 12-20) o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) *Cryobiology* 25: 459-470; y Roser (1991) *Biopharm.* 4: 47-53). La formación de agregados por los polipéptidos de IL-2 durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar de forma adversa a la actividad biológica de esta IL-2, teniendo como resultado la pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede causar otros problemas tales como bloqueo de tubos, membranas o bombas, cuando la composición farmacéutica que contiene la IL-2 se administra usando un sistema de infusión.

Las composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas preparadas de acuerdo con la invención además comprenden una cantidad de un aminoácido base suficiente para disminuir la formación de agregados por el péptido de IL-2 durante el almacenamiento de la composición. Por “aminoácido base” se pretende decir un aminoácido o una combinación de aminoácidos seleccionados del grupo constituido por arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico, donde cualquier aminoácido dado está presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Donde se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en las formas de sus bases libres, todos pueden estar presentes en sus formas de sal o algunas pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras que otras están presentes en sus formas de sal. Los aminoácidos a usar en la preparación de las composiciones son los que llevan una cadena lateral cargada, tal como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, isómero L, D o DL) del aminoácido concreto, o combinaciones de estos estereoisómeros, puede estar presente en las composiciones farmacéuticas preparadas de acuerdo con la invención, siempre que el aminoácido concreto esté presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Preferentemente se usa el estereoisómero L.

En combinación con el aminoácido base como se define en la presente memoria descriptiva, las composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas preparadas de acuerdo con la invención comprenden además un ácido sustancialmente libre de su forma de sal, para mantener el pH de la solución. Tal combinación proporciona una osmolaridad de la solución menor que si se usan un ácido y su forma de sal como agentes tampón en combinación con un aminoácido base para formular una composición farmacéutica estabilizada. La ventaja de tal combinación es que se puede incorporar una concentración superior del estabilizante, el aminoácido base, en la composición farmacéutica sin exceder la isotonicidad de la solución. Por “un ácido sustancialmente libre de su forma de sal” se pretende decir que el ácido que sirve como agente tampón con la composición farmacéutica líquida está presente en ausencia de cualquiera de sus formas de sal. Normalmente, cuando un tampón que comprenda un ácido se usa en una composición farmacéutica líquida, se prepara usando una forma de sal del ácido o una combinación del ácido y una forma de sal del ácido. Por

tanto, por ejemplo, el tampón se prepara usando el ácido con su contraion, tal como sodio, potasio, amonio, calcio o magnesio. Por tanto, un tampón succinato generalmente consiste en una sal de ácido succínico, tal como succinato sódico, o una mezcla de ácido succínico y succinato sódico. Los ácidos adecuados para usar en la formulación de las composiciones líquidas estabilizadas que contienen polipéptido de IL-2 preparadas de acuerdo con la presente invención incluyen, entre otros, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido glutámico, ácido maleico, ácido málico, ácido acético, ácido tartárico y ácido aspártico, más preferentemente ácido succínico y ácido cítrico, más preferentemente ácido succínico.

Las composiciones farmacéuticas líquidas que contienen polipéptido de IL-2 preparadas de acuerdo con la invención son composiciones “estabilizadas”. Por “estabilizada” se pretende decir que en las composiciones líquidas se ha incrementado su estabilidad al almacenamiento en relación con las composiciones preparadas en ausencia de la combinación de un aminoácido base y un agente tampón como se describe en la presente memoria descriptiva. Esta estabilidad al almacenamiento incrementada se observa en la formulación líquida, ya sea almacenada directamente en dicha forma para su uso posterior, almacenada en estado congelado y descongelada antes de usar, o preparada en forma seca, tal como liofilizada, seca al aire o pulverizada, para su posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma antes de usar. Preferentemente, las composiciones de la invención se almacenan directamente en su forma líquida para obtener todas las ventajas de la conveniencia de poseer una mayor estabilidad al almacenamiento en la forma líquida, facilidad de administración sin reconstitución y capacidad para suministrar la formulación en jeringas precargadas listas para usar o en forma de preparaciones multidosis si la formulación es compatible con agentes bacteriostáticos.

Las composiciones preparadas de acuerdo con la invención están relacionadas con el descubrimiento de que la adición del aminoácido arginina, lisina, ácido aspártico o ácido glutámico en su forma de base libre o en su forma de sal en combinación con un ácido sustancialmente libre de su forma de sal, tiene como resultado una composición farmacéutica líquida que contiene el polipéptido IL-2 preparada sin la combinación de estos dos componentes. La mayor estabilidad al almacenamiento de la composición se consigue a través de la influencia del aminoácido sobre la estabilidad del polipéptido IL-2 terapéuticamente activo, más particularmente su influencia sobre la agregación del polipéptido IL-2 durante el almacenamiento en formulaciones líquidas. Además, la de un aminoácido base como se ha definido en la presente memoria descriptiva y un ácido sustancialmente libre de su forma en sal en las formulaciones que contienen el polipéptido IL-2 tiene como resultado composiciones farmacéuticas líquidas que son casi isotónicas sin tener que incluir agentes isotonicantes adicionales, tales como cloruro sódico. Por “casi isotónico” se pretende decir que la composición líquida posee una osmolaridad de aproximadamente 240 mmol/kg a aproximadamente 360 mmol/kg, preferentemente de aproximadamente 240 a aproximadamente 340 mmol/kg, más preferentemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 330 mmol/kg, incluso más preferentemente de aproximadamente 260 a aproximadamente 320 mmol/kg, más preferentemente de aproximadamente 270 a aproximadamente 310 mmol/kg.

El aminoácido base incorporado en las composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas preparadas de acuerdo con la invención protege el polipéptido IL-2 terapéuticamente activo frente a la agregación, incrementando de este modo la estabilidad del polipéptido IL-2 durante el almacenamiento de la composición. Por “incrementando la estabilidad” se quiere decir que la formación de agregados por el polipéptido IL-2 durante el almacenamiento de la composición farmacéutica líquida disminuye en relación con la de agregados del polipéptido IL-2 durante el almacenamiento en ausencia de este agente estabilizante concreto. La disminución de la formación de agregados con adición del aminoácido base se produce de un modo dependiente de la concentración. Es decir, concentraciones crecientes del aminoácido base conducen a un incremento de la estabilidad de un polipéptido IL-2 en una composición farmacéutica líquida cuando ese polipéptido normalmente exhibe formación de agregados durante su almacenamiento en una formulación líquida en ausencia del aminoácido base. La determinación de la cantidad de un aminoácido base concreto a añadir a una composición farmacéutica líquida para disminuir la formación de agregados para incrementar la estabilidad del polipéptido IL-2 y así incrementar la estabilidad en el almacenamiento de la composición, se puede determinar con facilidad sin experimentación innecesaria usando procedimientos generalmente conocidos para un experto en la técnica.

Por tanto, por ejemplo, el efecto del aminoácido base concreto sobre la agregación del polipéptido IL-2 durante el almacenamiento en una composición líquida se puede determinar con facilidad midiendo el cambio en el polipéptido IL-2 soluble en solución en el tiempo. La cantidad de polipéptido IL-2 soluble en solución se puede cuantificar mediante un número de ensayos analíticos adaptados para la detección del polipéptido de interés. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, HPLC de fase inversa (RP)-HPLC, (SEC)-HPLC de exclusión por tamaño y absorbancia UV, como se describe en los siguientes ejemplos. Cuando un polipéptido IL-2 de interés forma agregados tanto solubles como insolubles durante el almacenamiento en formulaciones líquidas, se puede usar una combinación de RP-HPLC y SEC-HPLC para distinguir entre dicha porción del polipéptido IL-2 soluble que está presente como agregados solubles y la porción que está presente en forma molecular no agregado biológicamente activa, como se describe en el siguiente ejemplo 1.

En el caso de agregación, una cantidad eficaz de aminoácido base a incorporar en una composición farmacéutica líquida que contiene el polipéptido IL-2 con el fin de obtener la composición farmacéutica estabilizada de acuerdo con el procedimiento de la invención se vería como una cantidad que tuviera como resultado una disminución de la formación de agregados en el tiempo y, por tanto, una mayor retención de polipéptido IL-2 en solución en su forma molecular no agregada biológicamente activa. Por tanto, como se describe en los siguientes ejemplos, una cantidad eficaz de agente estabilizante para usar en la preparación de una composición estabilizada de acuerdo con el procedimiento de la invención sería una cantidad que tuviera como resultado una retención de IL-2 superior en su forma molecular monomérica.

La mayor estabilidad en el almacenamiento de las composiciones líquidas estabilizadas que contienen polipéptido IL-2 preparadas de acuerdo con la invención también se puede asociar con los efectos inhibidores del aminoácido base sobre la desamidación de los residuos de glutamina y/o asparagina en el polipéptido terapéuticamente activo durante el almacenamiento. El efecto de un aminoácido base concreto sobre la desamidación de estos residuos durante el almacenamiento en una composición líquida se puede determinar con facilidad mediante el control de la cantidad de polipéptido IL-2 presente en su forma desamidada en el tiempo. Los procedimientos para medir especies moleculares, es decir nativas o desamidadas, de un polipéptido IL-2 concreto presente en fase de solución son generalmente conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen separación cromatográfica de las especies moleculares e identificación usando patrones de peso molecular de polipéptidos, tales como con RP-HPLC como se describe en los ejemplos siguientes.

El uso de la combinación de un aminoácido base tamponado mediante un ácido sustancialmente libre de su forma de sal para incrementar la estabilidad del polipéptido IL-2 en las composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas preparadas de acuerdo con la invención proporciona ventajas sobre, por ejemplo, el uso de un aminoácido en un sistema tampón de ácido succínico/succinato de sodio. Esta nueva combinación permite la preparación de formulaciones casi isotónicas que poseen concentraciones superiores del aminoácido estabilizante que pueden conseguirse con el uso de un sistema tampón que es una mezcla de un ácido y su forma de sal. La concentración superior del aminoácido estabilizante permite incrementos todavía mayores en la estabilidad del polipéptido y, por tanto, incrementa la estabilidad en el almacenamiento de la formulación.

Por ejemplo, cuando se usa ácido succínico para tamponar la base arginina añadida a una formulación líquida que comprende la proteína interleucina 2 (IL-2) y que posee un pH óptimo de dicha proteína (pH 5,8), la concentración de arginina se puede incrementar a 230 mM manteniendo al mismo tiempo la isotonicidad de la formulación. Esto tiene como resultado la duplicación del periodo de caducidad de almacenamiento de la IL-2 a 50°C, que es una medida de la estabilidad de la proteína. Aunque se puede conseguir un periodo de caducidad de almacenamiento de la IL-2 similar usando la misma concentración de arginina y ácido succínico/succinato sódico como agente tampón, se debe añadir arginina en su forma ácida para obtener un pH similar, y la formulación resultante es hipertónica (véase el Ejemplo 1, Tabla 1).

La capacidad para usar concentraciones más elevadas de un aminoácido como principal agente estabilizante elimina la necesidad de más estabilizantes polipeptídicos tradicionales tales como seroalbúmina bovina o seroalbúmina humana, que son agentes estabilizantes menos deseables a causa de su potencial contaminación viral.

Además, es deseable la isotonicidad de las composiciones farmacéuticas líquidas, ya que tiene como resultado una reducción del dolor tras la administración y minimiza los posibles efectos hemolíticos asociados con las composiciones hipertónicas o hipotónicas. Por tanto, las composiciones estabilizadas preparadas de acuerdo con la invención no sólo poseen una mayor estabilidad en el almacenamiento, sino también poseen el beneficio añadido del dolor sustancialmente reducido tras la administración en comparación con formulaciones que usan otros sistemas tampón más tradicionales que consisten en un ácido y una forma en sal del ácido. Por ejemplo, la composición farmacéutica líquida estabilizada, cuando se inyecta exhibe una reducción del dolor asociado con quemazón y ardor en comparación con la inyección de solución salina normal (véase el Ejemplo 7).

Habiendo identificado las ventajas de preparar composiciones de polipéptido IL-2 de acuerdo con el procedimiento de la invención con un aminoácido base como principal agente estabilizante y un ácido sustancialmente libre de su forma en sal como agente tampón, se encuentra dentro de la experiencia en la técnica determinar, sin experimentación innecesaria, las concentraciones preferidas de cada uno de estos componentes que se van a incorporar en una composición farmacéutica líquida que comprende un polipéptido terapéuticamente activo de interés que exhiba formación de agregados como se describe en la presente memoria descriptiva para obtener una mayor estabilidad del polipéptido IL-2 durante el almacenamiento de dicha composición. Siguiendo los protocolos descritos en, por ejemplo, el Ejemplo 1 que figura más adelante, el técnico experto puede valorar un intervalo de concentraciones deseadas del aminoácido base y los diversos ácidos tampón para usar en las composiciones farmacéuticas líquidas que se describen en la presente memoria descriptiva. Preferentemente, la cantidad de aminoácido base incorporada en la composición se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM, preferentemente de aproximadamente 130 mM a aproximadamente 375 mM, más preferentemente de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 350 mM, incluso más preferentemente de aproximadamente 175 mM a aproximadamente 325 mM, todavía más preferentemente de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 300 mM, incluso más preferentemente de aproximadamente 190 mM a aproximadamente 280 mM, más preferentemente de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 260 mM, dependiendo de la proteína presente en la composición. Aunque el agente tampón puede ser el ácido en su forma de sal, o una mezcla del ácido y su forma de sal, preferentemente el agente tampón es el ácido sustancialmente libre de su forma de sal, por las razones ventajosas descritas en la presente memoria descriptiva. El ácido usado como agente tampón se añade, preferentemente, en un intervalo de concentraciones de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 240 mM, de aproximadamente 60 mM a aproximadamente 230 mM, de aproximadamente 70 mM a aproximadamente 220 mM, más preferentemente de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 210 mM, más preferentemente de aproximadamente 90 mM a aproximadamente 200 mM, dependiendo del ácido usado como agente tampón y estabilizándose el pH óptimo para el polipéptido IL-2 frente a la formación de agregados.

En una forma de realización, el aminoácido base es base arginina presente a una concentración de aproximadamente 230 mM y el ácido usado como agente tampón es ácido succínico a una concentración de aproximadamente 128 mM. Esto permite la preparación de una composición farmacéutica líquida que contiene un polipéptido que posea una osmolaridad que sea casi isotónica y un pH de aproximadamente 5,8. En otra forma de realización, el aminoácido base es arginina base presente a una concentración de aproximadamente 300 mM y el ácido usado como agente tampón es ácido cítrico a una concentración de aproximadamente 120 mM. Esto permite la preparación de una composición farmacéutica líquida que contiene un polipéptido IL-2 que posee una osmolaridad que es casi isotónica y un pH de aproximadamente 5,5. En otra forma de realización, el aminoácido base es arginina base presente a una concentración de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM y el ácido usado como agente tampón es ácido cítrico a una concentración de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 180 mM. Esto permite la preparación de una composición farmacéutica líquida que contiene un polipéptido que posea una osmolaridad de aproximadamente 256 mmol/kg a aproximadamente 363 mmol/kg a un pH de aproximadamente 5,5.

Por tanto, en otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica líquida estabilizada comprende arginina base a una concentración de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 350 mM, y ácido succínico a una concentración de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 190 mM. En una forma de realización preferida, la arginina base está presente en la composición farmacéutica líquida de IL-2 a una concentración de aproximadamente 230 mM y el ácido succínico está presente a una concentración de aproximadamente 128 mM. Esta composición de IL-2 preferida posee un pH de aproximadamente 5,8 y una osmolaridad de aproximadamente 250 mmol/kg a aproximadamente 330 mmol/kg. La concentración de IL-2 de una variante de la misma en estas composiciones es de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 2,0 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 0,02 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,03 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,03 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml.

Como se muestra en los siguientes ejemplos, el pH de una formulación farmacéutica que contiene polipéptido IL-2 afecta a la estabilidad del polipéptido contenido en ella, principalmente a través de su efecto sobre la formación de agregados de polipéptido IL-2. Por tanto, la cantidad de ácido tampón presente en las composiciones farmacéuticas preparadas de acuerdo con la invención variará en función del pH óptimo para la estabilizada de un determinado polipéptido IL-2 de interés. La determinación de este pH óptimo se puede conseguir usando procedimientos en general disponibles en la técnica, y que además se ilustran en los ejemplos descritos en la presente memoria descriptiva. Los intervalos de pH preferidos para las composiciones de la invención son de aproximadamente un pH 4,0 a aproximadamente un pH de 9,0, más particularmente de aproximadamente un pH 5,0 a aproximadamente un pH de 6,5, dependiendo del polipéptido. Por tanto, en una forma de realización, el pH es de aproximadamente 5,8.

Las composiciones farmacéuticas estabilizadas que comprenden un aminoácido base tamponado con un ácido sustancialmente libre de su forma de sal, también pueden comprender agentes estabilizantes adicionales, que además potencian la estabilidad de un polipéptido de IL-2 terapéuticamente activo en la misma. Los agentes estabilizantes de particular interés para la presente invención incluyen, entre otros, metionina y EDTA, que protegen el polipéptido IL-2 frente a la oxidación de metionina; y un tensioactivo no iónico que protege al polipéptido IL-2 frente a la agregación asociada con la congelación-descongelación o a la cizalladura mecánica.

De este modo, se puede añadir el aminoácido metionina para inhibir la oxidación de los residuos de metionina en sulfóxido de metionina, cuando el polipéptido IL-2 que actúa como agente terapéutico es un polipéptido IL-2 que comprende al menos un residuo de metionina susceptible a tal oxidación. Por "inhibe" se quiere decir la acumulación mínima de especies de metionina oxidada en el tiempo. La inhibición de la oxidación de metionina tiene como resultado una mayor retención del polipéptido IL-2 en su forma molecular adecuada. Se puede usar cualquier estereoisómero de metionina (isómero L, D o DL) o combinaciones de los mismos. La cantidad que se debe añadir debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de modo que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para las agencias reguladoras. Normalmente, esto significa que la composición contiene como máximo de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de sulfóxido de metionina. En general, esto se puede conseguir añadiendo metionina de forma que la proporción entre metionina añadida y los residuos de metionina oscila de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, más preferentemente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 100:1.

La cantidad preferida de metionina que se debe añadir se puede determinar con facilidad mediante la preparación de la composición que comprende el polipéptido IL-2 de interés con concentraciones diferentes de metionina y determinando el efecto relativo sobre la formación de especies oxidativas del polipéptido usando patrones de peso molecular de polipéptidos, tales como con RP-HPLC, como se describe más adelante en el Ejemplo 2. La concentración de metionina que maximiza la inhibición de la oxidación de los residuos de metionina sin producir efectos adversos sobre la inhibición relacionada con los aminoácidos de la agregación del polipéptido IL-2 representaría una cantidad preferida de metionina que se debe añadir a la composición para mejorar más la estabilidad del polipéptido.

La degradación del polipéptido IL-2 debido a congelación descongelación o a cizalladura mecánica durante el procesamiento de la composición líquida de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se puede inhibir mediante la incorporación de tensioactivos en las composiciones líquidas que contienen polipéptido IL-2 el fin de reducir la tensión superficial en la interfase solución-aire. Los tensioactivos típicos empleados son tensioactivos no iónicos, incluidos ésteres de sorbitol de polioxietileno tales como polisorbato 80 (Tween 80) y polisorbato 20 (Tween 20); ésteres de polioxipropileno-polioxietileno tales como Pluronic F68; alcoholes de polioxietileno tales como Brij

35; simeticona; polietilen glicol tal como PEG400; lisofosfatidilcolina; y polioxietilen-p-t-octilfenol tal como Triton X-100. La estabilización clásica de productos farmacéuticos mediante tensioactivos o emulsionantes se describe, por ejemplo, en Levine y col. (1991) *J. Parenteral Sci. Technol.* 45(3): 160-165, en la presente memoria descriptiva por referencia. Un tensioactivo preferido empleado en la práctica de la presente invención es polisorbato 80.

Además de los agentes descritos anteriormente, se pueden añadir otros agentes estabilizantes, tales como albúmina, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o una de sus sales tales como EDTA disódico, para potenciar más la estabilidad de las composiciones farmacéuticas líquidas. La cantidad de albúmina se puede añadir a concentraciones de aproximadamente 1% p/v o menores. El EDTA actúa como secuestrante de iones metálicos conocido por catalizar muchas reacciones de oxidación, lo que proporciona un agente estabilizante adicional.

En una forma de realización de la invención, la composición farmacéutica líquida estabilizada comprende IL-2 o una variante de la misma, arginina base a una concentración de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 350 mM, ácido succínico a una concentración de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 190 mM, metionina a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 10 mM, EDTA a aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5,0 mM y polisorbato 80 a aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,2%. En una forma de realización preferida, la arginina base está presente en esta composición farmacéutica líquida de IL-2 a una concentración de aproximadamente 230 mM y el ácido succínico está presente a una concentración de aproximadamente 128 mM. Esta composición de IL-2 preferida posee un pH de aproximadamente 5,8 y una osmolaridad de aproximadamente 250 mmol/kg a aproximadamente 330 mmol/kg. La concentración de IL-2 o de la variante de la misma en estas composiciones es de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 2,0 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 0,02 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,03 mg/ml a aproximadamente 0,8 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,03 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml.

Cuando sea deseable, también se pueden incluir azúcares o alcoholes de azúcares en las composiciones farmacéuticas líquidas que contienen polipéptido IL-2 de la presente invención. Se puede usar cualquier azúcar tal como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluidos, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa-Na. La sacarosa es el aditivo de azúcar más preferido. Alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo de C4-C8 que posee un grupo OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitom, siendo el manitol el aditivo alcohol de azúcar más preferido. Los azúcares o los alcoholes de azúcar mencionados anteriormente se pueden usar individualmente o en combinación. No existe un límite fijo de la cantidad usada, siempre que el azúcar o el alcohol de azúcar sean solubles en la preparación líquida y no afecte de forma adversa a los efectos estabilizantes conseguidos usando los procedimientos de la invención. Preferentemente, la concentración del azúcar o del alcohol de azúcar se encuentra entre aproximadamente 1,0% p/v y aproximadamente 15,0% p/v, más preferentemente entre aproximadamente 2,0% p/v y aproximadamente 10,0% p/v.

Las composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas preparadas de acuerdo con la invención pueden contener otros compuestos que incrementar la eficacia o estimulan las cualidades deseables del polipéptido IL-2 de interés que sirve como componente terapéuticamente activo siempre que el principal efecto estabilizante obtenido con el aminoácido base no se vea afectado de forma adversa. LA composición debe ser segura para administrar a través de la vía que se escoja, debe ser estéril y debe conservar su actividad terapéutica deseada.

Las composiciones preparadas de acuerdo con la presente invención se preparan, preferentemente, mediante la premezcla de los agentes estabilizantes y tampón, y cualquier otro excipiente antes de la incorporación del polipéptido de interés. Cualquier excipiente adicional que se pueda añadir para estabilizar más las composiciones de la presente invención no debe afectar de forma adversa a los efectos estabilizantes del principal agente estabilizante, es decir un aminoácido base, en combinación con el agente tampón, es decir un ácido sustancialmente libre de su forma de sal, como se usa para obtener las nuevas composiciones descritas en la presente memoria descriptiva. Tras la adición de una cantidad preferida de un aminoácido base para alcanzar la disminución de la formación de agregados de un polipéptido IL-2 de interés, se ajusta el pH de la composición líquida usando el agente tampón, preferentemente dentro de un intervalo descrito en la presente memoria descriptiva, más preferentemente al pH óptimo para el polipéptido IL-2 de interés. Aunque el pH se puede ajustar después de la adición del polipéptido IL-2 de interés en la composición, preferentemente se ajusta antes de la adición de este polipéptido, ya que esto puede reducir el riesgo de desnaturalización del polipéptido IL-2. A continuación, los dispositivos mecánicos adecuados se usan para obtener una mezcla adecuada de los constituyentes.

Los polipéptidos IL-2 presentes en las composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas preparadas de acuerdo con la invención pueden ser nativos u obtenerse mediante técnicas recombinantes, y pueden proceder de cualquier fuente, incluidas fuentes mamíferos tales como, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, primates, cerdos y seres humanos, siempre que cumplan el criterio especificado en la presente memoria descriptiva, es decir, siempre que formen agregados durante su almacenamiento en formulaciones líquidas. Preferentemente, tales polipéptidos IL-2 derivan de una fuente humana, y más preferentemente son proteínas humanas recombinantes de huéspedes microbianos.

También se abarca dentro del término "polipéptido IL-2", como se usa en la presente memoria descriptiva, las variantes biológicamente activas de un polipéptidos IL-2 de interés que sirve como componente terapéuticamente activo en las composiciones farmacéuticas de la invención. Tales variantes deben conservar la actividad biológica deseada del polipéptido IL-2 nativo de forma que la composición farmacéutica que comprende la variante del polipéptido IL-2

posea el mismo efecto terapéutico que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido IL-2 nativo, cuando se administra a un sujeto. Es decir, el polipéptido IL-2 variante servirá como componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica de un modo similar al observado para el polipéptido IL-2 nativo. En la técnica se dispone de procedimientos para determinar si un polipéptido IL-2 variante conserva la actividad biológica deseada y, por tanto, sirve como componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica. La actividad biológica se puede medir usando ensayos diseñados específicamente para medir la actividad del polipéptido IL-2 nativo o la proteína, incluidos ensayos descritos en la presente invención. Además, se puede analizar la presencia de anticuerpos aparecidos frente al polipéptido IL-2 nativo biológicamente activo para determinar su capacidad para unirse al polipéptido IL-2 variante, donde una unión eficaz es indicativa de un polipéptido con una conformación similar a la del polipéptido IL-2 nativo.

Variantes biológicamente activas y adecuadas de un polipéptido IL-2 nativo o natural de interés pueden ser fragmentos, análogos y derivados de dicho polipéptido. Por “fragmento” se quiere decir un polipéptido compuesto por únicamente una parte de la secuencia polipeptídica y estructura intactas, y puede ser una delección en el extremo C o una delección en el extremo N del polipéptido nativo. Por “análogo” se quiere decir un análogo de l polipéptido nativo o de un fragmento del polipéptido nativo, donde el análogo comprende una secuencia polipeptídica y estructura nativas que poseen una o más sustituciones, inserciones o delecciones de aminoácidos. También abarcados en el término análogo se encuentran “muteínas”, tal como las descritas en la presente memoria descriptiva, y los péptidos que poseen uno o más peptoides (similares a los péptidos) (véase la publicación internacional N° WO 91/04282). Por “derivado” se quiere decir cualquier modificación adecuada del polipéptido nativo de interés, de un fragmento del polipéptido nativo o de sus respectivos análogos, tal como glicosilación fosforilación u otra adición de restos extraños, siempre que se conserve la actividad biológica deseada del polipéptido nativo. Los procedimientos para preparar fragmentos polipeptídicos, análogos y derivados están, generalmente, disponibles en la técnica.

Por ejemplo, se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos del polipéptido IL-2 mediante mutaciones en la secuencia de ADN clonada que codifica el polipéptido nativo de interés. Los procedimientos de mutagénesis y alteraciones de la secuencia de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Walker y Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing company, Nueva York), Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492; Kunkel y col. (1987) *Methods Enzymol.* 154: 367-382; Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, Nueva York); patente de EE.UU. n° 4.873.192; y las referencias citadas en dicho documento; que se incorporan en la presente memoria descriptiva por referencia. En el modelo de Dayhoff y col. (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington D.C.), incorporado en la presente memoria descriptiva por referencia, se pueden encontrar directrices en cuanto a las sustituciones adecuadas de aminoácidos que no afectan a la actividad biológica del polipéptido de interés. Se pueden preferir las sustituciones conservadoras, tales como el intercambio de un aminoácido con otro de propiedades similares. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen, entre otras, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln y Phe↔Trp↔Tyr.

Al construir las variantes del polipéptido IL-2 se hacen modificaciones de forma que las variantes continúan poseyendo la actividad deseada. Obviamente, ninguna mutación realizada en el ADN que codifica el polipéptido variante debe colocar la secuencia fuera del marco de lectura y, preferentemente, no creará regiones complementarias que pudieran producir una estructura de ARNm secundaria. Véase la publicación de solicitud de patente EP n° 75.444.

Las variantes biológicamente activas de un polipéptido IL-2 tendrán al menos un 70%, preferentemente al menos un 80%, más preferentemente aproximadamente del 90% al 95% o más, y más preferentemente de aproximadamente 98% o más de identidad de secuencia aminoacídica con la secuencia aminoacídica de la molécula polipeptídica de IL-2 de referencia, que sirve de base para la comparación. Una variante biológicamente activa de un polipéptido de IL-2 nativo de interés puede diferir del polipéptido nativo en tan pocos como 1-15 aminoácidos, tan pocos como de 1-10, tal como 6-10, tan pocos como 5, tan pocos como 4, 3, 2 o incluso un residuo de aminoácido. Por “identidad de secuencia” se quiere decir que se encuentran los mismos residuos de aminoácidos en la variante del polipéptido y la molécula polipeptídica que sirve como referencia cuando un segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos de la variante se alinea y compara con la secuencia de aminoácidos de la molécula de referencia. El porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se calcula mediante la determinación del número de posiciones en la que se produce el aminoácido idéntico en ambas secuencias, para dar el número de posiciones que coinciden, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en el segmento que se está comparando con la molécula de referencia y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Para los propósitos de una alineación óptima de las dos secuencias, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos de la variante de IL-2 puede poseer dos residuos de aminoácidos adicionales o una delección de residuos de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la molécula de referencia. El segmento contiguo usado para la comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia comprenderá al menos veinte (20) residuos de aminoácidos contiguos y pueden ser 30, 40, 50, 200 o más residuos. Las correcciones de el incremento de la identidad de secuencia asociado con la inclusión de huecos en la secuencia de aminoácidos de la variante se pueden realizar asignando penalizaciones por hueco. Los procedimientos de alineación sede secuencia son bien conocidos en la técnica para las secuencias de aminoácidos y para las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos.

Por tanto, la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias cualesquiera se puede conseguir usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de las secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17. Dicho algoritmo se utiliza en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software de alineación de secuencia GCG. Al comparar secuencias de aminoácidos, con el programa ALIGN se pueden utilizar una tabla de residuos en peso PAM 120, una penalización por longitud del hueco de 12 y una penalización del hueco de 4. Otro ejemplo preferido, no limitante de un algoritmo matemático para usar al comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación= 100, longitud de palabras= 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de interés. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación= 50, longitud de palabras= 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas al polipéptido de interés. Para obtener las alineaciones de los huecos con fines comparativos, se puede utilizar el BLAST gapped como se describe en Altschul y col. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389. Como alternativa, se puede usar el PSI-blast para realizar una búsqueda iterativa que detecte las relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul y col. (1997) *supra*. Al utilizar los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-blast, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (p. ej., XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. También véase el programa ALIGN (Dayhoff (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5: Supl. 3 (Nacional Biomedical Research Foundation, Washington D.C.) y los programas del Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 (disponibles en Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), por ejemplo, el programa GAP, donde se utilizan los parámetros por defecto del programa.

Al considerar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos, algunas posiciones de residuos de aminoácidos pueden diferir como resultado de sustituciones conservadoras de aminoácidos, que no afectan a las propiedades de la función de la proteína. En estos casos, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse en orden creciente para que justifique la similitud de los aminoácidos sustituidos de forma conservadora. Tales ajustes son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Myers y Millar (1988) *Computer Applic. Biol. Sci.* 4: 11-17.

La estructura química exacta de un polipéptido depende de una serie de factores. Dado que en la molécula están presentes grupos amino y carboxilo ionizables, se puede obtener un polipéptido concreto en forma de sal ácida o básica o en forma neutra. Todas estas preparaciones que conservan su actividad biológica al introducirse en condiciones ambientales adecuadas se incluyen en la definición de polipéptidos tal como se usa en la presente memoria descriptiva. Además, la secuencia de aminoácidos primaria del polipéptido se puede aumentar por derivación usando restos de azúcar (glicosilación) o mediante otras moléculas complementarias tales como lípidos, fosfatos, grupos acetilo y similares. También se puede aumentar mediante conjugación con sacáridos. Ciertos aspectos de tal aumento se consiguen a través de sistemas de procesamiento postraduccionales del huésped productor; otras de estas modificaciones se pueden introducir *in vitro*. En cualquier caso, tales modificaciones se incluyen en la definición de polipéptido como se usa en la presente memoria descriptiva, siempre que la actividad del polipéptido no se destruya. Cabe esperar que tales modificaciones puedan afectar cuantitativa o cualitativamente a la actividad, bien potenciando o bien disminuyendo la actividad del polipéptido, en los diversos ensayos. Además, los residuos de aminoácidos individuales en la cadena se pueden modificar mediante oxidación, reducción u otra derivación, y el polipéptido puede escindirse para obtener fragmentos que retengan la actividad. Tales alteraciones que no destruyen la actividad no eliminan la secuencia del polipéptido de la definición de polipéptido de interés como se usa en la presente memoria descriptiva.

La técnica proporciona sustancial orientación en cuanto a la preparación y el uso de las variantes polipeptídicas. En la preparación de las variantes polipeptídicas, un experto en la técnica puede determinar con facilidad qué modificaciones en la secuencia de nucleótidos o en la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa tendrán como resultado una variante adecuada para usar como componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica de la presente invención y cuya formación de agregados disminuya en presencia de un aminoácido base y un ácido sustancialmente libre de su forma de sal, la forma de sal del ácido o una mezcla del ácido y su forma de sal, como se describe en la presente memoria descriptiva.

De acuerdo con la presente invención, el polipéptido presente como componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica líquida preparada de acuerdo con la invención es interleucina-2 (IL-2) o una variante de la misma, preferentemente IL-2 recombinante. La interleucina 2 es una linfocina producida por los linfocitos de sangre periférica normales y está presente en el cuerpo en concentraciones bajas. Induce la proliferación de células T estimuladas por antígeno o por mitógenos tras la exposición a lectinas vegetales, antígenos u otros estímulos. La IL-2 fue descrita por primera vez por Morgan y col. (1976) *Science* 193: 1007-1008 y inicialmente se denominó factor de crecimiento de células T por su capacidad para inducir proliferación de linfocitos T estimulados. Es una proteína con un peso molecular indicado en el intervalo de 13.000 a 17.000 (Gillis y Watson (1980) *J. Exp. Med.* 159: 1709) y posee un punto isoelectrónico en el intervalo de 6-8,5. En la actualidad se reconoce que además de sus propiedades como factor de crecimiento, modula varias funciones *in vitro* e *in vivo* del sistema inmunitario. La IL-2 es una de varias moléculas reguladoras-mensajeras producidas por linfocitos que median en las interacciones y las funciones celulares. Se ha mostrado que esta linfocina natural posee actividad antitumoral frente a una variedad de neoplasias malignas, bien sola o bien combinada con células asesinas activadas por linfocinas (LAK) o con linfocitos infiltrantes de tumores (véase, por ejemplo, Rosenberg y col. (1987) *N. Engl. J. Med* 316: 889-897; Rosenberg (1988) *Ann. Surg.* 108: 121-135; Topalian y col. 1988) *J. Clin. Oncol* 10: 33-40). Aunque la actividad antitumoral de la IL-2 ha sido descrita

mejor en pacientes con melanoma metastásico y carcinoma de células renales, otras enfermedades, principalmente el linfoma, parecen responder también al tratamiento con IL-2.

Por "IL-2 recombinante" se quiere decir la interleucina 2 que posee actividad biológica comparable a la IL-2 de secuencia nativa y que se ha preparado mediante técnicas de ADN recombinante, como se describe, por ejemplo, en Taniguchi y col. (1983) *Nature* 302: 305-310 y Devos (1983) *Nucleic Acids Research* 11: 4307-4323 o IL-2 alterada por mutaciones como describen Wang y col (1984) *Science* 224: 1431-1433. En general, se clona la codificación genética para IL-2 y después se expresa en organismos transformados, preferentemente un microorganismo, y más preferentemente *E. coli*, como se describe en la presente memoria descriptiva. El organismo huésped expresa el gen extraño para producir IL-2 en condiciones de expresión. La IL-2 recombinante sintética también se puede preparar en eucariotas, tal como levaduras o células humanas. Los procedimientos de crecimiento, recolección, alteración o extracción de la IL-2 de las células se describen sustancialmente en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.604.377; 4.738.927; 4.656.132; 4.569.790; 4.748.234; 4.530.787; 4.572.298 y 4.931.543; incorporadas en la presente memoria descriptiva en su totalidad por referencia.

Para ejemplos de proteínas IL-2 variantes, véase la solicitud de patente europea N° 1136.489; la solicitud de patente europea N° 83101035.0 presentada el 3 de febrero de 1983 (publicada el 19 de octubre de 1983 bajo n° de publicación 91539); la solicitud de patente europea n° 82307036.0, presentada el 22 de diciembre de 1982 (publicada el 14 de septiembre de 1983 bajo n° de publicación 88195); las muteínas de IL-2 recombinante descritas en la solicitud de patente europea N° 83306221.9 presentada el 13 de octubre de 1983 (publicada el 30 de mayo de 1984 bajo n° de publicación 109748), que es el equivalente a la patente belga n° 893.016, patente de EE.UU. de propiedad común n° 4.518.584; las muteínas descritas en las patentes de EE.UU. N° 4.752.585 y WO 99/60128; y la muteína de IL-2 usada en los ejemplos de la presente memoria descriptiva y descritos en la patente de EE.UU. n° 4.931.543; todas las cuales se incorporan en la presente memoria descriptiva por referencia. Además, la IL-2 se puede modificar con polietilenglicol para proporcionar mayor solubilidad y un perfil farmacocinético alterado (véase la patente de EE.UU. n° 4.766.106, incorporada en su totalidad en la presente por referencia).

Una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición farmacéutica líquida que contiene polipéptido IL-2 estabilizada preparada de acuerdo con la invención se administra a un sujeto. Por "cantidad farmacéuticamente eficaz" se quiere decir una cantidad que es útil en el tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o afección. Las vías típicas de administración incluyen, entre otras, administración oral y administración parenteral, incluida la inyección o infusión intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial e intraperitoneal. En una de tales formas de realización, la administración es mediante inyección, preferentemente inyección subcutánea. Entre las formas inyectables de las composiciones de la invención se incluyen, entre otras, soluciones, suspensiones y emulsiones.

La composición farmacéutica líquida estabilizada que comprende el polipéptido de interés deberá formularse en una formulación farmacéutica unitaria y puede ser una forma inyectable o infundible tal como solución, suspensión o emulsión. Además, se puede almacenar congelada o preparar en forma seca, tal como polvo liofilizado, que se puede reconstituir en la solución líquida, suspensión o emulsión antes de la administración mediante cualquiera de los diversos procedimientos, incluidas las vías de administración oral o parenteral. Preferentemente, se almacena en la formulación líquida para obtener ventaja de la mayor estabilidad en el almacenamiento conseguida de acuerdo con los procedimientos de la presente invención como se indica más adelante. La composición farmacéutica estabilizada se esteriliza, preferentemente, mediante filtración por membrana y se almacena en recipientes unidos o multidosis, tales como viales o ampollas sellados. Procedimientos adicionales para formular una composición farmacéutica generalmente conocidas en la técnica se pueden usar para potenciar más la estabilidad en el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas descritas en la presente memoria descriptiva, siempre que no afecten de forma adversa a los efectos beneficiosos de los agentes estabilizantes y tampón preferidos descritas en los procedimientos de la invención. En *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1990) (18 ed., Mack Pub. Co., Eaton, Pensilvania), incorporado en la presente memoria descriptiva por referencia, se puede encontrar una discusión exhaustiva de la formulación y selección de vehículos, estabilizantes etc. farmacéuticamente aceptables.

Por "sujeto" se quiere decir cualquier animal. Preferentemente, el sujeto es un mamífero, más preferentemente el sujeto es humano. Los mamíferos de particular importancia a parte de los seres humanos incluyen, entre otros, perros, gatos, vacas, caballos, ovejas y cerdos.

Cuando la administración es con el fin de tratamiento, la administración puede ser profiláctica o terapéutica. Cuando se proporciona profilácticamente, la sustancia se proporciona antes de la aparición de cualquier síntoma. La administración profiláctica de la sustancia sirve para prevenir o atenuar cualquier síntoma posterior. Cuando se proporciona terapéuticamente, la sustancia se proporciona en el inicio de un síntoma (o poco después). La administración terapéutica de la sustancia sirve para atenuar cualquier síntoma real.

Por tanto, por ejemplo, las formulaciones que comprenden una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la invención que comprende la secuencia nativa de la IL-2 o la variante de la misma se pueden usar para el propósito de tratamiento prevención y diagnóstico de una serie de indicaciones clínicas que responden al tratamiento con este polipéptido. Las variantes biológicamente activas de la IL-2 de secuencia nativa, tales como muteínas de IL-2 que retienen actividad de IL-2, en particular la muteína de IL-2 sub. Ser 125 y otras muteínas en los que la cisteína de la posición 125 ha sido sustituida por otro aminoácido, se pueden formular y usar del mismo modo que la IL-2 de secuencia nativa. En consecuencia, las formulaciones de la invención que comprenden IL-2 de secuencia nativa o

una variante de la misma son útiles para el diagnóstico, prevención y tratamiento (local o sistémico) de infecciones bacterianas, virales, parasitarias, protozoarias y fúngicas; para aumentar la citotoxicidad mediada por células; para estimular la actividad de las células asesinas (LAK) activadas por linfocinas; para mediar la recuperación de la función inmunitaria en estados con deficiencia inmunitaria adquirida; para la reconstitución de la función inmunitaria normal en seres humanos y animales envejecidos; en el desarrollo de ensayos diagnósticos tales como los que emplean amplificación enzimática, radiomarcaje, radioimagen y otros procedimientos conocidos en la técnica para controlar los niveles de IL-2 en el estado patológico; para la estimulación del crecimiento de células T *in vitro* con propósitos terapéuticos y diagnósticos; para bloquear los sitios receptores para las linfocinas; y en otras varias aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y de investigación. Las diversas aplicaciones terapéuticas y diagnósticas de la IL-2 humana o variantes de las mismas, tales como muteínas de IL-2, se han investigado y comunicado en Rosenberg y col. (1987) *N. Engl. J. Med* 316: 889-897; Rosenberg (1988) *Ann. Surg* 208: 121-135; Topalian y col. (1988) *J. Clin. Oncol.* 6: 839-853; Rosenberg y col. (1988) *N. Engl. J. Med* 319: 1676-1680; Weber y col. (1992) *J. Clin. Oncol* 10: 33-40; Grima y col. (1982) *Cell. Immunol.* 70(2): 248-259; Mazumder (1997) *Cancer J Sci. Am.* 3 (suppl. 1): S37-42; Mazumder y Rosenberg (1984) *J. Exp. Med.* 159 (2): 495-507; y Mazumder y col. (1983) *Cancer Immunol. Immunother.* 15(1): 1-10. Formulaciones de la invención que comprenden IL-2 o variante de la misma se pueden usar como el único agente terapéuticamente activo o pueden usarse en combinación con otras células B o T inmunológicamente relevantes u otros agentes terapéuticos. Ejemplos de células relevantes son células B o T, células asesinas naturales, células LAK y similares, y reactivos terapéuticos de ejemplo que pueden usarse en combinación con IL-2 o una variante de la misma son los diversos interferones, especialmente interferón gamma, factor de crecimiento de células B, IL-1 y anticuerpos, por ejemplo anticuerpos anti-HER2 o anti-CD20. Las formulaciones de la invención que comprenden IL-2 o una variante de la misma se pueden administrar a seres humanos o animales por vía oral, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intravenosa, intranasal o liberación pulmonar, según el médico considere adecuado. La cantidad de IL-2 (bien de secuencia nativa o una variante de la misma que retenga la actividad biológica de la IL-2, tales como las muteínas descritas en la presente memoria descriptiva) administrada puede variar entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 15 mUI/m². Para indicaciones tales como carcinoma de células renales y melanoma metastásico, la IL-2 o la variante de la misma biológicamente activa se pueden administrar en forma de bolo intravenoso de dosis elevada a 300.000 a 800.000 UI/kg/8 horas.

La presente invención proporciona un procedimiento para incrementar la estabilidad de un polipéptido IL-2 en una composición farmacéutica líquida, donde el polipéptido IL-2, que sirve como componente terapéuticamente activo, exhibe formación de agregados durante el almacenamiento en una formulación líquida. El procedimiento comprende incorporar en la composición farmacéutica líquida un aminoácido base en una cantidad suficiente para disminuir la formación de agregados del polipéptido IL-2 durante el almacenamiento de la composición farmacéutica líquida y un ácido sustancialmente libre de su forma de sal, donde el ácido sirve como agente tampón para mantener el pH de la composición líquida dentro de un intervalo aceptable, como se ha descrito previamente en la presente memoria descriptiva.

Incrementar la estabilidad de un polipéptido IL-2 o variante del mismo mediante la incorporación de un aminoácido base, o de un aminoácido base más uno o más agentes estabilizantes adicionales descritos en la presente memoria descriptiva, en combinación con el agente tampón descrito en la presente memoria descriptiva, es decir un ácido sustancialmente libre de su forma de sal, la forma de sal del ácido o una mezcla del ácido y su forma de sal, conduce a un incremento de la estabilidad de la composición farmacéutica líquida que contiene el polipéptido durante el almacenamiento. Por tanto, la invención también proporciona un procedimiento para incrementar la estabilidad en el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida cuando dicha composición comprende un polipéptido de IL-2 que forma agregados durante el almacenamiento en una formulación líquida. Por "incrementar la estabilidad en el almacenamiento" se quiere decir que la composición farmacéutica exhibe mayor retención del polipéptido de IL-2 o variante del mismo en su propia conformación no agregada y biológicamente activa durante el almacenamiento y, por tanto, menos que una disminución en la eficacia terapéutica, que una composición farmacéutica líquida preparada en ausencia de un aminoácido base o un aminoácido base más uno o más de los agentes estabilizantes adicionales descritos en la presente memoria descriptiva, en combinación con el agente tampón descrito en la presente memoria descriptiva.

La estabilidad en el almacenamiento de una composición farmacéutica que contiene polipéptido de IL-2 preparada de acuerdo con los procedimientos de la invención se puede evaluar usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Normalmente, la estabilidad en el almacenamiento de tales composiciones se evalúa usando los perfiles de estabilidad en el almacenamiento. Estos perfiles se obtienen controlando los cambios en la cantidad de polipéptido de IL-2 presente en su forma molecular no agregada, biológicamente activa y su potencia en el tiempo en respuesta a la variable de interés, tal como el pH de la concentración, el agente estabilizante, la concentración del agente estabilizante, etc., como se demuestra en los siguientes ejemplos. Estos perfiles de estabilidad se pueden generar a varias temperaturas representativas de posibles condiciones de almacenamiento, tales como temperatura de congelación, temperatura de refrigeración, temperatura ambiente o temperatura elevada, tal como a 40-50°C. A continuación se compara la estabilidad en el almacenamiento entre perfiles mediante la determinación, por ejemplo, de la semivida de la forma molecular no agregada y biológicamente activa del polipéptido de IL-2 de interés. Por "semivida" se quiere decir el tiempo necesario para una disminución del 50% en la forma molecular no agregada y biológicamente activa del polipéptido de IL-2 de interés. Las composiciones que comprenden arginina base y un ácido sustancialmente libre de su forma de sal preparadas de acuerdo con los procedimientos de la presente invención tendrán una semivida que es al menos de aproximadamente el doble a aproximadamente diez veces mayor, preferentemente al menos de aproximadamente tres veces a al menos aproximadamente 10 veces mayor, más preferentemente al menos de aproximadamente

cuatro veces a al menos aproximadamente 10 veces mayor, más preferentemente al menos de aproximadamente cinco veces a al menos aproximadamente diez veces mayor, que la semivida de una composición líquida preparada en ausencia de un aminoácido base base o un aminoácido base más uno o más de los agentes estabilizantes adicionales descritos en la presente memoria descriptiva, en combinación con un ácido sustancialmente libre de su forma de sal, la forma de sal del ácido o una mezcla del ácido y su forma de sal. Para los propósitos de la presente invención, una composición farmacéutica con una mayor estabilidad en el almacenamiento como resultado de haberse preparado de acuerdo con la presente invención se considera una composición farmacéutica "estabilizada". Tal composición estabilizada posee, preferentemente, una semivida de al menos aproximadamente 18 meses, más preferentemente de al menos 20 meses, todavía más preferentemente de al menos aproximadamente 22 meses, más preferentemente de al menos aproximadamente 24 meses cuando se almacena a 2-8°C.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Experimental

La IL-2 es un potente mitógeno que estimula la proliferación de células T. Posee una amplia aplicación terapéutica como tratamiento de las metástasis de cáncer, como adyuvante para el tratamiento del cáncer y como agente complementario para enfermedades infecciosas.

Con el progreso de varios ensayos clínicos en los que se usa tratamiento con IL-2, se ha constatado que el desarrollo de una formulación líquida estable para esta proteína es altamente deseable. Tal formulación sería más versátil que las formulaciones liofilizadas tradicionales, ya que podría suministrarse en diferentes posologías de acuerdo con varios regímenes de dosificación. También sería más conveniente administrar una formulación líquida, ya que no sería necesaria la reinstitución. Tal formulación podría suministrarse en jeringas precargadas listas para usar, o en forma de preparaciones multidosis si se piensa que son compatibles con agentes bacteriostáticos.

Se ha comunicado que la IL-2 en formulaciones líquidas se degrada a través de al menos tres vías durante su almacenamiento: agregación, oxidación de la metionina y desamidación (Kunitani y col. (1986) *J. Chromatography* 359: 391-401; Kenney y col. (1986) *Lymphokine Res.*, 5: 523-527). Además, la IL-2 es susceptible de sufrir daños causados por congelación y tensión por cizalladura mecánica. Por tanto, el desarrollo de la formulación para IL-2 necesita abordar tanto los daños agudos como la degradación crónica.

En consecuencia, se ha desarrollado una nueva formulación de rhIL-2 monomérica y estable. En esta formulación, las moléculas de proteínas se encuentran presentes en solución en su forma monomérica, no en forma agregada. Por tanto, no hay oligómeros ni agregados covalentes o hidrófobos. La formulación contiene diversos agentes estabilizantes, los más importantes la arginina y la metionina. Para estabilizar la proteína contra daños físicos y químicos tales como la agregación, la oxidación de metionina y la desamidación durante el almacenamiento prolongado. Además, en la formulación se ha incluido un tensioactivo no iónico, polisorbato 80, para proteger a la proteína de daños agudos causados por la congelación-descongelación y la tensión por cizalladura mecánica. Como se muestra en los ejemplos siguientes, la adición a la formulación de rhIL-2 de los agentes estabilizantes de la invención incrementa su estabilidad en el almacenamiento.

La molécula de IL-2 usada en estos ejemplos es la muteína de IL-2 recombinante humana, aldesleucina, con la cisteína de la posición 125 sustituida por serina (des-alanil-1, interleucina 2 humana serina-125). Se expresa en *E. coli* y posteriormente se purifica mediante diafiltración y cromatografía de intercambio de cationes, como se describe en la patente de EE.UU. n° 4.931.543. La masa purificada para usar en el desarrollo era de aproximadamente 3 mg/ml de IL-2 y se formuló en citrato sódico 10 mM a pH 6, en NaCl 200-250 mM (el tampón concentrado de CM) o en un tampón que contiene succinato sódico 10 mM a pH 6 y L-arginina 150 mM.

El inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) es otra proteína que exhibe la degradación mediante agregación durante el almacenamiento en una formulación farmacéutica líquida (Chen y col. (1999) *J. Pharm. Sci.* 88: 881-888). El ejemplo 8, que se expone más adelante, está dirigido a formulaciones líquidas que demuestran la eficacia de usar un ácido en su forma de base libre para disminuir la formación de agregados y un sistema tampón suministrado por un ácido sustancialmente libre de su forma de sal. El ejemplo 8 se proporciona únicamente con fines informativos.

Los siguientes protocolos se usaron en los ejemplos para determinar el efecto de un agente estabilizante concreto sobre la IL-2 o la degradación TFPI, y, por tanto, la estabilidad de esta proteína durante el almacenamiento en formulaciones líquidas.

Medición de la absorbancia UV

La absorbancia UV de soluciones proteicas se midió usando un espectrómetro Hewlett Packard Diode Array (modelo 8452). El instrumento se blanqueó con el adecuado tampón de formulación. La absorbancia a 280 nm se registró usando una cubeta de cuarzo de 1,0 cm de longitud. El coeficiente de extinción de $0,70 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ se usó para convertir los datos de absorbancia en concentración de IL-2 en mg/ml.

RP-HPLC

La RP-HPLC se realizó en un sistema Waters 626 LC equipado con un automuestreador 7171 (Waters Corporation, Milford, Maine) usando una columna Vydac 214BTP54 C4 y una precolumna Vydac 214GCC54 (Separations Group, Hesperia, California). Las columnas se equilibraron inicialmente con una fase móvil A (10% de acetonitrilo, 0,1% de TFA). A continuación se cargaron 20 µg de una muestra de IL-2 y la proteína se eluyó aplicando una fase móvil B (100% de acetonitrilo, 0,1% de TFA) de 0 a 100% en 50 minutos a un caudal de 1,0 ml/min. La principal especie de IL-2 soluble eluyó a aproximadamente 32 minutos y se detectó mediante UV 214 nm usando un detector Waters 486. La adquisición y el procesamiento de los datos se realizaron en un sistema Perkins-Elmer Turbochrom (PE Nelson, Cupertino, California).

Este procedimiento de RP-HPLC detecta la principal especie de IL-2 monomérica en forma de un pico B, una especie oxidativa de metionina (principalmente Met¹⁰⁴ oxidada) en forma de pico A. Una especie desamidada (probablemente Asn⁸⁸) como pico B' y otra especie desconocida de elución antes o después de estos picos.

SEC-HPLC

La HPLC de exclusión por tamaño se realizó en una columna TOSHAAS G2000SWx1 y una columna GUARD TSK SW x1 (TOSHAAS, Montgomeryville, Pensilvania). Se aplicó una única fase móvil con fosfato sódico 10 mM a pH 7 y sulfato amónico 200 mM a un caudal de 1,0 ml/min. La especie monomérica de IL-2 eluyó a aproximadamente 14 minutos y se detectó mediante UV 214 nm usando un detector Waters 486. La adquisición y el procesamiento de los datos se realizaron en un sistema Perkins-Elmer Turbochrom.

Usando un protocolo de SEC-HPLC nativa especialmente desarrollado para controlar la IL-2, la rhIL-2 eluyó principalmente en forma de una única especie, probablemente en la forma monomérica ya que la adición de agentes de disociación de la agregación, tal como SDS, urea y DTT, no afectó a la elución de esta especie.

IEX-HPLC

La HPLC-(IEX) de intercambio iónico se realizó en una columna de vidrio Pharmacia Mono-S HR 5/5 usando un sistema Waters 626 LC con un automuestreador de calor/frío 717 como se describe en Chen y col. (1999) *J. Pharm. Sci* 88: 881-888. La columna se equilibró con 80% de fase móvil A (70:30 v/v, acetato sódico 20 mM:acetonitrilo a pH 5,4) y 20% de fase móvil B (70:30 v/v, acetato sódico 20 mM y cloruro amónico 1M:acetonitrilo a pH 5,4). Tras la inyección se eluyó el TFPI humano recombinante (rh) incrementando la fase móvil B al 85% en 21 minutos a un caudal de 0,7 ml/minuto. El rhTFPI eluyó a aproximadamente 16,5 minutos en forma de un único pico y se detectó mediante absorbancia de UV a 280 nm con un detector de absorbancia Waters 486. La adquisición y el procesamiento de los datos se realizaron en un sistema Perkins-Elmer Turbochrom. La concentración de proteína se estimó integrando el área del pico y comparándola con una curva estándar generada a partir de muestras de concentraciones conocidas.

SDS-PAGE

El SDS-PAGE se realizó de acuerdo con el protocolo de Laemmli. Alrededor de 5 µg de IL-2 se cargaron en cada calle de un gel preverificado de tris-glicina Norvex al 18% y se llevó a cabo la electroforesis a 100 voltios. Las bandas proteicas se marcaron mediante tinción con azul de Coomassie y se analizaron mediante un densitómetro de Molecular Dynamics equipado con el sistema Imagequant T (Molecular Dynamics, Sunnyvale, California).

Proliferación de células HT-2 y tinción MTT para determinar la bioactividad de la IL-2

La potencia de la IL-2 se determinó mediante un bioensayo *in vitro* usando la proliferación de células HT-2 y tinción MTT (Gillis y col., (1978) *J. Immunology* 120: 2027-2032; Watson (1979) *J. Exp. Med.* 150(6): 1510). Brevemente, 1 x 10⁴ de células HT-2 murinas, que eran dependientes de IL-2 para crecimiento, se cargaron en un pocillo de placa de cultivo tisular que contiene patrones, controles o muestras. Tras una incubación de 22 a 26 horas a 37°C se añadió tinción MTT en los pocillos y la incubación continuó a 37°C durante de 3 a 4 horas. A continuación se añadió SDS al 20% para decolorar durante la noche a temperatura ambiente. La absorbancia de los pocillos se leyó a 570 nm y se convirtió en la bioactividad de IL-2 según los patrones internacionales de la OMS.

Mediciones del pH y la osmolaridad

El pH de la solución de las diversas formulaciones se midió mediante un peachímetro de Orion (modelo 611, Orion Research Incorporated Laboratory Products Group, Boston, Massachusetts). El peachímetro se calibró mediante el procedimiento de calibración con dos tampones sugerido por el fabricante usando un pH 4 convencional (Fisher Scientific, n° cat SB 101-500) y un pH 7 convencional (Fisher Scientific, Cat n° cat SB 107-500).

La osmolaridad de la solución de estas formulaciones se midió mediante Osmómetro de presión de vapor de Wescor (modelo 5500, Wescor Inc., Logan, Utah). El osmómetro se calibró mediante dos patrones suministrados por el fabricante: patrón 290 mmol/kg (Wescor, N° Reorder OA-010) y patrón de 1.000 mmol/kg (Wescor, N° Reorder OA-029). Estos protocolos se usaron para cuantificar los efectos de varios agentes estabilizantes sobre la degradación de la rhIL-2 a través de agregación de proteína, oxidación de metionina y desamidación.

Ejemplo 1

Efectos de diversos agentes solubilizantes sobre la agregación proteica y la estabilidad en el almacenamiento de la rhIL-2

La agregación proteica es la principal ruta de degradación para la rhIL-2 en medio líquido en condiciones de pH variables de levemente ácidas a alcalinas, la rhIL-2 en soluciones formuladas con estas condiciones de pH, cuando se almacena a temperaturas elevadas, rápidamente tiene como resultado la agregación proteica, lo que conduce a una precipitación visible. La proteína precipitada visible se puede eliminar mediante filtración a través de un filtro de 0,2 μm . La proteína soluble restante en solución se puede cuantificar mediante una serie de ensayos analíticos tales como RP-HPLC, SEC-HPLC y absorbancia UV. La agregación también produce una disminución de la bioactividad, que se puede determinar mediante el bioensayo *in vitro* descrito en la presente memoria descriptiva.

Usando los procedimientos analíticos que se describen en la presente memoria descriptiva, la estabilidad en almacenamiento de la rhIL-2 en varias condiciones se siguió mediante cambios de control de la cantidad de rhIL-2 soluble como función del tiempo de incubación a temperaturas elevadas.

1.A. Efectos de azúcares y aminoácidos

Se estudió el efecto de azúcares sobre la estabilidad en el almacenamiento de la rhIL-2 para sorbitol, sacarosa y manitol en formulaciones que contienen 0,2 mg/ml de rhIL-2, succinato sódico 10 mM a pH 6 y 270 mM de uno de estos azúcares. La cantidad de rhIL-2 soluble restante en las muestras de estabilidad se representó frente al tiempo de incubación como se muestra en la figura 1. Las curvas de sacarosa y manitol superpuestas una en otra indican sus efectos sobre la estabilidad en almacenamiento de IL-2 son similares. La curva para sorbitol es ligeramente superior que la de los otros dos azúcares, lo que sugiere que el sorbitol posee un efecto de estabilización ligeramente superior que los otros dos azúcares.

El efecto de los aminoácidos sobre la estabilidad en el almacenamiento se muestra en la Figura 2. Las formulaciones contenían 0,1 mg/ml de IL-2, succinato sódico 10 mM a pH 6 y 150 mM de uno de los nueve aminoácidos escogidos. Como se muestra en la Figura 2, el rango de estabilidad es Arg > Asp > Lys > Met > Asn > Leu = Ser = Pro = Gly.

El efecto estabilizante del sorbitol y la arginina se confirmó en estudios posteriores, que mostraron que la estabilidad en el almacenamiento de la rhIL-2 se vio afectada de un modo dependiente de la concentración. Por tanto, la estabilidad en el almacenamiento de la rhIL-2 aumenta cuando se incrementa la concentración de sorbitol de 50 mM a 150 mM y, finalmente, a 270 mM (Figura 3). De igual forma, la estabilidad en el almacenamiento de la rhIL-2 aumenta con la concentración creciente de arginina en la formulación (Figura 4).

1.B. Efecto del pH de la formulación

Se estudiaron los perfiles de pH de la estabilidad en el almacenamiento de la rhIL-2 en formulaciones que contienen NaCl, Sorbitol y arginina. En la Figura 5 se representan gráficamente Las semividas de la IL-2 soluble restante a 50°C frente al pH. Aquí, la semivida ($t_{1/2}$) se definió como el tiempo necesario para que se produzca una disminución del 50% de la proteína soluble en las muestras de estabilidad. Una semivida mayor indica mayor estabilidad en el almacenamiento.

Como se muestra en la Figura 5, el pH óptimo para estabilizar la rhIL-2 frente a la agregación proteica depende del agente estabilizante presente en la solución. La estabilidad máxima en el almacenamiento de la rhIL-2 en NaCl se alcanza a pH 4, donde la rhIL-2 posee una semivida a 50°C de aproximadamente 23 días. La rhIL-2 en las formulaciones de sorbitol muestra una mayor estabilidad a medida que el pH disminuye, produciéndose la estabilidad máxima a pH 5, donde la semivida a 50°C es de aproximadamente 26 días. La mayor estabilidad (es decir, la semivida más prolongada) se podría conseguir con arginina como agente estabilizante en una formulación con un pH de aproximadamente 6,0, donde la semivida de la proteína a 50°C fue de aproximadamente 32 días. Estos resultados sugieren que la arginina es una agente estabilizante preferido en relación con sorbitol o NaCl, ya que el pH óptimo para la estabilización de la proteína se produce a un pH más fisiológicamente aceptable.

1.C. Efecto del sistema tampón

Es bastante habitual usar un sistema tampón de 10 mM en una formulación para proporcionar un pH adecuado y mantener una cierta cantidad de capacidad tampón. Por ejemplo, se puede conseguir un pH de formulación de 5,8 usando 10 mM de una mezcla de ácido succínico y su forma de sal, tal como succinato sódico. Si se selecciona tal sistema tampón, en la formulación se pueden usar como principal agente estabilizante 150 mM de arginina HCl pero no 150 mM de arginina base, ya que 150 mM de arginina base impedirían ajustar el pH a 5,8 con el tampón 10 mM.

No obstante, la arginina HCl da lugar a una osmolaridad superior de lo que lo hace la arginina base. Por tanto, una formulación que contenga 150 mM de arginina HCl ajustada a un pH 5,8 con tampón de ácido succínico y succinato sódico 10 mM ya está cerca de la isotonicidad, posee una osmolaridad de aproximadamente 253 mmol/kg y una

semivida a 50°C de aproximadamente 8 días (Tabla 1). Además, es deseable una concentración mayor de arginina en la formulación, ya que la estabilidad en el almacenamiento se incrementa con los incrementos en este agente estabilizante. Cuando la concentración de arginina aumenta a 230 mM con la adición de arginina HCl y el pH se ajusta a 5,8 con tampón de ácido succínico y succinato sódico 10 mM, la semivida a 50°C se duplica (alrededor de 17 días), aunque la solución es hipertónica, posee una osmolaridad de aproximadamente 372 mmol/kg.

Cuando el ácido succínico servía como sistema tampón para ajustar la solución a pH 5,8 y la arginina estaba presente en forma de arginina base, el incremento de la concentración de arginina base a 230 mM tuvo como resultado una duplicación similar de la semivida a 50°C, aumentándola a aproximadamente 16 días. Sin embargo, este incremento en la estabilidad en el almacenamiento se consiguió manteniendo la solución casi isotónica, con la formulación con una osmolaridad de aproximadamente 271 mmol/kg (véase la Tabla 1). De este modo, se podía usar arginina base 230 mM en la formulación para incrementar la estabilidad en el almacenamiento de la rhIL-2 sin superar la isotonicidad de la formulación.

TABLA 1

Osmolaridad de la solución y estabilidad en el almacenamiento de las formulaciones de rhIL-2

La estabilidad en el almacenamiento se muestra en semividas ($t_{1/2}$) para la rhIL-2 soluble restante medida mediante RP-HPLC tras su almacenamiento a 50°C. Las formulaciones de arginina HCl contenían 0,5 mg/ml de rhIL-2, EDTA 1 mM y 150 mM o 230 mM de L-arginina HCl y 10 mM de ácido succínico y succinato sódico para ajustar el pH a 5,8. Las formulaciones de arginina base contenían 0,5 mg/ml de rhIL-2, EDTA 1 mM y 150 mM o 230 mM de L-arginina base y 81 mM o 128 mM de ácido succínico para ajustar el pH a 5,8.

Formulación (todas contenían EDTA 1 mM y a pH 5,8)	Osmolaridad (mmol/kg)	$t_{1/2}$ a 50°C (día)
ArgHCl 150 mM, Succinato Na/ácido succínico 10 mM	253	8,0
Arg base 150 mM, ácido succínico 81 mM	192	9,9
ArgHCl 230 mM, Succinato Na/ácido succínico 10 mM	372	16,9
Arg base 230 mM, ácido succínico 128 mM	271	116,0

Estos dos procedimientos de ajuste de pH se analizaron con otros sistemas tampón (Tabla 2). Cuando en la formulación se usó arginina HCl 150 mM y el pH se ajustó a 5,8 mediante un ácido y su sal sódica, todas las formulaciones estaban por debajo de la isotonicidad, lo que es aproximadamente 290 mmol/kg. La semivida a 50°C para la rhIL-2 en estas formulaciones varió de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 días. Cuando en la formulación se usó arginina base 230 mM y el pH se ajustó a 5,8 mediante un ácido sustancialmente libre de su forma de sal como sistema tampón, las formulaciones en las que se ajustó su pH con ácido cítrico o ácido succínico mostraron osmolaridades de la solución todavía por debajo de la isotonicidad, mientras que otras formulaciones estaban ligeramente por encima de la isotonicidad, como en el caso del ácido fosfórico, o son hipertónicas, como en el caso del ácido glutámico o acético. No obstante la semivida a 50°C para todas las formulaciones se incrementó a por encima de 30 días. Por tanto, usando ácido cítrico o ácido succínico, Ambos sustancialmente libres de sus formas de sal, como sistema tampón, la concentración de arginina podría incrementarse a 230 mM usando arginina base, que tuvo como resultado un incremento de la estabilidad en el almacenamiento de la rhIL-2.

TABLA 2

Osmolaridad de la solución y estabilidad en el almacenamiento de las formulaciones de rhIL-2

La estabilidad en el almacenamiento se muestra en semividas ($t_{1/2}$) para la rhIL-2 soluble restante medida mediante RP-HPLC tras su almacenamiento a 50°C. Todas las formulaciones contenían 0,2 mg/ml de rhIL-2, metionina 5 mM, EDTA disódico 1 mM, 0,1% de polisorbato 80 y 150 mM de L-arginina HCl con ajuste de pH a 5,8 mediante 10 mM de un ácido y su forma de sal o 230 mM de L-arginina base con ajuste de pH a 5,8 mediante titulación con un ácido sustancialmente libre de su forma de sal.

Formulación	Osmolaridad (mmol/kg)	$t_{1/2}$ (día)
ArgHCl 150 mM, Citrato sódico/ácido cítrico 10 mM	248	20,5
Arg base 230 mM, ácido cítrico 86 mM	228	36,1
ArgHCl 150 mM, Succinato sódico/ácido succínico 10 mM	257	19,1
Arg base 230 mM, ácido succínico 128 mM	285	29,2
ArgHCl 150 mM, Fosfato sódico/ácido fosfórico 10 mM	260	15,6
Arg base 230 mM, ácido fosfórico 193 mM	329	29,9
ArgHCl 150 mM, Glutamato sódico sódico/ácido glutámico 10 mM	264	14,6
Arg base 230 mM, ácido glutámico 225 mM	407	47,5
ArgHCl 150 mM, acetato sódico/ácido acético 10 mM	259	20,8
Arg base 230 mM, ácido acético 250 mM	408	31,9

1.D. Efecto de la concentración proteica

Se estudió el efecto de la concentración proteica sobre la estabilidad en el almacenamiento en una formulación que contenía succinato sódico 10 mM a pH 6 y arginina 150 mM. Como se muestra en la Figura 6, en la que la semivida a 50°C para la rhIL-2 soluble se representó frente a la concentración proteica inicial, la estabilidad en el almacenamiento de la rhIL-2 aumenta a medida que la concentración proteica disminuye. Este hallazgo concuerda con la observación experimental de que la agregación es la principal ruta de la degradación para la rhIL-2 en formulaciones líquidas.

1.E. Efecto del tensioactivo no iónico polisorbato 80

El efecto del polisorbato 80 (Tween 80 o Tw 80) sobre la estabilidad en el almacenamiento se estudió en una formulación que contenía 0,5 mg/ml de IL-2, arginina base 230 mM, ácido succínico 128 mM para ajustar el pH a 5,8, EDTA 1 mM y 0,02 y 0,1% de polisorbato 80. Como se muestra en la Tabla 3, ambas formulaciones que contienen polisorbato 80 exhiben una reducción de la semivida de IL-2 soluble a 50°C, de 16 días a aproximadamente 9 días, medido mediante RP-HPLC. Por tanto, la inclusión de polisorbato 80 en la formulación se percibiría como desfavorable sobre la base de únicamente su efecto sobre la agregación proteica. No obstante, este agente posee un efecto estabilizante frente al daño proteico agudo asociado con la congelación-descongelación y la cizalladura mecánica, que es beneficioso durante el procesamiento de formulaciones líquidas que contienen esta proteína, como se muestra en los siguientes ejemplos.

La estabilidad en el almacenamiento de dos formulaciones basadas en sorbitol también se estudió. Aunque sus semividas medidas mediante RP-HPLC y la bioactividad fueron comparables con las de las formulaciones de arginina, las semividas estimadas mediante SEC-HPLC fueron mucho menores, lo que sugiere que es probable que en estas formulaciones esté presente una porción mayor de proteína rhIL-2 en formas solubles agregadas.

TABLA 3

Semividas ($t_{1/2}$) de la rhIL-2 soluble restante (pico B) medida mediante RP-HPLC, SEC-HPLC y bioensayo *in vitro* en formulaciones de rhIL-2 almacenadas a 50°C

Formulación (todas contenían EDTA 1 mM y a pH 5,8)	t _{1/2} a 50°C (día)		
	RP	SEC	Bioactividad
Arg base 230 mM, ácido succ 128 mM pH 5,8	16,0	21,3	25,6
Arg base 230 mM, ácido succ 128 mM, 0,02% Tw 80, pH 5,8	9,7	12,4	NA
Arg base 230 mM, ácido succ 128 mM, 0,1% Tw 80, pH 5,8	9,1	12,2	24,5
270 mM sorbitol, NaSuc 10 mM, 0,1% Tw 80, pH 4,5	31,7	3,6	NA
270 mM sorbitol, NaSuc 10 mM, 0,1% Tw 80, pH 5,0	14,4	2,4	21,3

En la Tabla 3, la semivida para una formulación de rhIL-2 con arginina base-ácido succínico determinada mediante el procedimiento de RP-HPLC es ligeramente menor que la determinada mediante el procedimiento de SEC-HPLC y es mucho menor que la determinada mediante el procedimiento de bioensayo *in vitro*. La elución de la principal especie de rhIL-2 en SEC-HPLC se evaluó para analizar más estas diferencias. Las muestras con u sin tratamiento de SDS, urea y DTT no mostraron cambios en el tiempo de elución para la especie principal. Lo que indica que la rhIL-

2 en estas formulaciones estaba presente en forma de una especie monomérica. No obstante, el protocolo de la SEC-HPLC podría no ser capaz de distinguir otras especies monoméricas, por ejemplo, la especie de metionina oxidativa del pico A, de la especie intacta mayoritaria, la especie del pico B. Por tanto, cabría esperar una pequeña diferencia en la determinación de la semivida.

El bioensayo *in vitro* utilizado para determinar la bioactividad en los datos presentados en la Tabla 3 se llevó a cabo con SDS al 0,1% en el diluyente del ensayo. Por tanto, antes de aplicar las muestras a la placa de cultivo tisular para que interaccionen con las células HT-2 murinas, las muestras se diluyeron con diluyente de ensayo que contenía SDS al 0,1%. Era posible que la dilución con SDS podría haber disociado algún agregado de rhIL-2 en estas muestras a su forma monomérica, lo que tiene como resultado una sobreestimación de la bioactividad de una formulación dada. Por tanto, las muestras de estabilidad se analizaron usando diluyente de ensayo con (+S) y sin (-S) la adición de SDS. Las muestras también se analizaron con (+F) y sin(-F) un tratamiento de filtración de 0,2 μ m, ya que la filtración es capaz de eliminar los agregados proteicos grandes según se juzga mediante inspección visual. Los valores de bioactividad medidos para las muestras con estos tratamientos se muestran en la Tabla 4 junto con los resultados de estabilidad en el almacenamiento obtenidos usando el protocolo de RP-HPLC por comparación. Los valores se presentan en forma de un porcentaje de los valores de bioactividad obtenidos en muestras similares almacenadas a -70°C.

En general, las formulaciones diluidas con SDS y no filtradas antes del contacto con las células HT-2 muestran mayores valores de bioactividad que las formulaciones diluidas sin SDS en el diluyente de ensayo y filtradas antes de realizar el ensayo. Entre estos resultados de bioactividad, los obtenidos usando filtración y diluyendo sin SDS son bastante comparables con los resultados de la RP-HPLC. Por tanto, este procedimiento se recomienda para la medición de la verdadera bioactividad para la rhIL-2 monomérica.

TABLA 4

Comparación de resultados entre el análisis RP-HPLC para rhIL-2 soluble y análisis de bioactividad in vitro para las muestras de estabilidad almacenadas 2 semanas a 40°C o 50°C

Todos los resultados se presentan en forma de porcentajes de los obtenidos para sus respectivas muestras a -70°C. Las formulaciones contenían 0,5 mg/ml de rhIL-2, L-arginina base 230 mM, ácido succínico 128 mM a pH a 5,8, EDTA 1 mM, con (n° 1) y sin (n° 2) 0,1% de polisorbato 80. Las muestras para el bioensayo se trataron con y sin filtración a través de 0,22 μ m antes de la dilución usando diluyentes con y sin SDS al 0,1%.

Muestra en HPLC	% Bioactividad (porcentaje con respecto a muestras a -70°C)				% RP (porcentaje con respecto a muestras a -70°C)
	-F+S ^a	+F+S ^a	-F-S ^a	+F-S ^{ab}	
N° 1 a 40°C	106	100	104	100	101
N° 1 a 50°C	92	79	60	53	58
N° 2 a 40°C	101	69	106	112	98
N° 2 a 50°C	60	38	62	47	42
a “-F” para no filtrados, “+F” para filtrados, “-S” para diluyente sin SDS y “+S” para diluyente con SDS.					
b Este es el protocolo recomendado para la IL-2 monomérica.					

1.F. Compatibilidad del conservante

La compatibilidad del conservante se investigó por la necesidad de desarrollar una formulación multidosis. El efecto de los conservantes sobre la estabilidad de la IL-2 se evaluó en dos estudios acelerados. El estudio 1 analizó alcohol bencílico, m-cresol y fenol en una formulación que contenía 0,2 mg/ml de IL-2, succinato sódico 10 mM a pH 6 y arginina 160 mM. El estudio 2 analizó cloruro de bencetonio, cloruro de benzalconio, metil/propil parabén y clorobutanol en una formulación que contenía 0,2 mg/ml de IL-2, L-arginina base 230 mM, ácido succínico 128 mM a pH 5,8, EDTA disódico 1 mM, 0,1% de polisorbato 80. Las semividas para la rhIL-2 soluble medidas mediante RP-HPLC para estas formulaciones almacenadas a 40°C se presentan en la Tabla 5.

ES 2 276 698 T3

Todos los conservantes analizados disminuyeron la estabilidad de la rhIL-2 a la temperatura elevada. En el estudio 1, la semivida para la rhIL-2 soluble fue de aproximadamente 74 días a 40°C sin ninguno de los conservantes. La adición de alcohol bencílico o de m-cresol o de fenol, redujo la semivida de forma significativa en 5-10 veces. En el estudio 2, los efectos de los conservantes fueron mucho menos intensos. La semivida para la rhIL-2 soluble disminuyó menos de la mitad para el cloruro de bencetonio y disminuyó más de 2 veces para otros conservantes. En general, el cloruro de bencetonio posee la menor reducción en la estabilidad de la rhIL-2 entre los conservantes analizados.

TABLA 5

Semivida ($t_{1/2}$) de la rhIL-2 soluble a 40°C para las formulaciones que contienen conservantes

Estudio 1: las formulaciones contenían 0,2 mg/ml de rhIL-2, succinato sódico 10 mM a pH 6, L-arginina 150 mM y conservantes. Estudio 2: las formulaciones contenían 0,2 mg/ml de rhIL-2, L-arginina base 230 mM, ácido succínico 128 mM a pH 5,8, EDTA disódico 1 mM, 0,1% de polisorbato 80 y conservantes.

Conservante	$t_{1/2}$ a 40°C (día)
Estudio 1	
Sin conservantes	74,0
0,9% (p/v) Alcohol bencílico	16,0
0,25% (p/v) m-cresol	7,5
0,5% (p/v) fenol	11,0
Estudio 2	
Sin conservantes	261,0
0,01% (p/v) cloruro de bencetonio	185,0
0,01% (p/v) cloruro de benzalconio	67,0
0,18% (p/v) metil parabén y 0,02% (p/v) propil parabén	113,0
0,5% (p/v) clorobutanol	84,0

Aunque los conservantes tuvieron un pronunciado efecto desestabilizante sobre la rhIL-2 a la temperatura elevada, también se analizaron sus efectos sobre la estabilidad en el almacenamiento a corto plazo de la rhIL-2 a 4°C o 25°C. Se llevó a cabo un estudio nuevo para analizar seis conservantes en una misma formulación que contenía 0,2 mg/ml de rhIL-2, L-arginina base 230 mM, ácido succínico 128 mM, EDTA 1 mM, metionina 5 mM y 0,1% de polisorbato 80 a pH 5,8. La Tabla 6 expone los resultados de la cantidad de rhIL-2 soluble conservada tras un año de almacenamiento. Ninguna formulación, cuando se comparan con el control, muestra pérdida significativa al nivel de rhIL-2 soluble mediante RP-HPLC y el bioensayo *in vitro*, con la excepción de la formulación que contiene 0,25% de m-cresol, que mostró niveles detectables.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 276 698 T3

TABLA 6

Estabilidad en el almacenamiento de un año de formulaciones con conservante a 4°C o 25°C presentada en porcentaje de la rhIL-2 soluble total restante determinada mediante las áreas de los picos integrados de la RP-HPLC y la bioactividad in vitro

La formulación control contenía 0,2 mg/ml de rhIL-2, L-arginina base 230 mM, ácido succínico 128 mM, EDTA 1 mM, metionina 5 mM y 0,1% de polisorbato 80 a pH 5,8.

Conservante	% de IL-2 inicial mediante RP-HPLC		Bioactividad in vitro (x10 ⁰ UI/ml)		
	4°C	25°C	t= 0	1 año/4°C	25°C/1 año
Control	102	93	3,8	3,3	2,5
0,9% alcohol bencílico	100	88	4,8	4,0	5,0
0,25% m-cresol	98	60	5,8	2,6	2,5
0,5% fenol	99	87	4,7	3,9	3,2
0,01% cloruro de benzalconio	102	93	5,5	3,9	4,4
0,01% cloruro de bencetonio	98	89	5,4	3,2	4,7
0,5% clorobutanol	99	91	5,1	3,6	4,5

Ejemplo 2

Efectos de varios factores sobre la oxidación de metionina y la estabilidad en el almacenamiento de la rhIL-2

La oxidación de la metionina en la IL-2 se ha caracterizado anteriormente (Kunitani y col. (1986) *J. Chromatography* 359: 391-402; Sasaoki y col. (1989) *Chem. Pharm. Bull.* 37 (8): 2160-2164). La IL-2 posee cuatro residuos de metionina en las posiciones 23, 39, 36 y 104 en la cadena polipeptídica. Entre estas, la Met¹⁰⁴ está en la superficie de la proteína y es más oxidativa. Esta especie oxidativa de metionina se puede resolver como una especie de elución precoz (pico A) con respecto a la especie principal de IL-2 (pico B) del cromatograma de RP-HPLC. La Met²³ y la Met³⁹ son menos susceptibles a la oxidación, que sólo se produce en condiciones oxidativas extremas, probablemente a causa de su existencia en el interior de la molécula proteica. Las especies oxidativas de estos residuos de MET pueden eluir como especies antes que la Met¹⁰⁴ en la RP-HPLC. La Met⁴⁶ está enterrada profundamente en la molécula proteica y no oxida con facilidad a menos que la proteína se despliegue por completo.

La investigación de la oxidación de la metionina en IL-2 concentrada sobre la oxidación de Met104, ya que es el residuo de metionina más susceptible a la oxidación y la prevención de su oxidación también impedirá la oxidación de otros residuos de metionina.

2.A. Efecto del pH

La oxidación de metionina se estudió a un intervalo de pH de 3 a 9 en formulaciones que contienen 0,2 mg/ml de IL-2, NaCl 150 mM y 10 mM de varias especies tampón. La oxidación de metionina en estas formulaciones se estudió cuantificando el porcentaje de especies del pico A (es decir, las especies de Met¹⁰⁴ oxidadas) en las muestras de IL-2 a t= 0 y t= 3 meses. Como se indica en la Tabla 7, el efecto del pH no se nota a t= 0, a excepción de en la muestra

ES 2 276 698 T3

tamponada mediante citrato a pH= 6. En comparación con otras muestras, que poseen el 5% de las especies de pico A, la muestra de citrato mostró un incremento del nivel de pico A al 6%.

A t= 3 meses, el nivel del pico A aumenta a condiciones de pH mayor, lo que sugiere un mecanismo catalizado por base para la oxidación de metionina de la Met¹⁰⁴. A pH 6, el succinato es un tampón mejor que el citrato a la hora de minimizar la oxidación de metionina, hay que en la formulación con succinato se observan valores menores del pico A.

TABLA 7

Análisis RP-HPLC de la oxidación de metionina, expresada en forma de porcentaje de la cantidad total de IL-2 soluble (pico A + pico B) presente en forma de la especie de metionina oxidada del pico A (% del pico A de IL-2 soluble total) para muestras de formulación de pH 3 a pH 9 a t= 0 y 3 meses

Las formulaciones contenían 0,2 mg/ml de IL-2, NaCl 150 mM y pH ajustado mediante 10 mM de varias especies tampón.

Tampón y pH	% pico A de IL-2 soluble total				
	t= 0	t= 3 meses			
		-70°C	4°C	25°C	40°C
10 mM de glicina, pH 3	5	4	5	6	7
10 mM de acetato, pH 4	5	5	6	7	6
10 mM de acetato, pH 5	NA	7	8	9	9
10 mM de citrato pH 6	6	6	8	12	14
10 mM de succinato pH 6	5	6	7	4	9
10 mM de fosfato pH 7	5	7	8	11	5
10 mM de borato pH 9	5	11	15	14	NA

2.B. Efectos de EDTA, polisorbato 20, polisorbato 80 y MgCl₂

Los efectos de un quelante de metales, dos tensioactivos no iónicos y un ion metálico divalente sobre la oxidación de metionina se indican en la Tabla 8. La presencia de polisorbato 20 o polisorbato 80 en las formulaciones incrementa el nivel de las especies de metionina oxidada a t= 0 y t= 1 mes. En contraste con ello, EDTA y MgCl₂ reducen el nivel de especies de metionina oxidada tras 1 mes de almacenamiento a 40 y 50°C.

ES 2 276 698 T3

TABLA 8

Porcentaje de la cantidad total de IL-2 soluble (pico A + pico B) presente en forma de especies de metionina oxidada del pico A (% de pico A) en las muestras de IL-2 a $t=0$ y $t=1$ mes

La muestra control contenía 0,2 mg/ml de IL-2, 10 mM de succinato sódico a pH 6 r 150 mM de arginina.

Formulación	% pico A (oxidación de metionina)				
	t= 0	t= 1 mes			
		-70°C	4°C	40°C	50°C
Control	2,8	3,5	5,1	19,7	36,3
1 mM de EDTA	2,5	3,5	5,0	9,5	14,0
0,1% de polisorbato 80	5,8	4,3	6,9	21,5	41,4
1 mM de EDTA + 0,1% de polisorbato 80	5,9	4,2	6,9	12,1	19,2
0,1% de polisorbato 20	4,1	5,4	9,6	25,3	42,8
5 mM de $MgCl_2$	3,9	4,8	6,9	9,7	12,1

2.C. Efecto de la metionina

Se estudió la adición de metionina en formulaciones para impedir la oxidación de metionina en la IL-2. La Tabla 9 indica los cambios en el pico a y la cantidad total de IL-2 soluble (pico A + pico B) para las formulaciones que contienen cantidades variables de metionina tras 2 semanas de almacenamiento a 50°C. El incremento de la concentración de metionina en las formulaciones reduce el nivel de pico A de forma significativa a $t=0$ y a $t=2$ semanas, mientras que la cantidad de IL-2 soluble conservada tras 2 semanas de almacenamiento no se ve afectada. A 5 mM de metionina, se observa una disminución multiplicada por 3 del pico A a $t=2$ semanas. Por tanto, la adición de metionina tiene como resultado una reducción significativa de la oxidación de metionina de la proteína y posee poco efecto sobre la agregación de la IL-2.

ES 2 276 698 T3

TABLA 9

Cambio en el pico A y en la proteína soluble total en muestra de IL-2 a t= 0 y a t= 2 semanas a 50°C

Las formulaciones contenían 0,2 mg/ml de IL-2, 230 mM de arginina, 128 mM de ácido succínico a pH 5,8, EDTA 1 mM, 0,1% de polisorbato 80 y de 0 a 10 mM de metionina.

Formulación	% pico A (oxidación de metionina)		% IL-2 restante
	t= 0	t= 2 sem a 50°C	T= 2 sem a 50°C
Sin metionina	2,1	6,3	76
1 mM de metionina	1,4	2,7	77
5 mM de metionina	1,2	2,1	77
10 mM de metionina	1,2	1,9	76

Además de los resultados a temperatura elevada, también se registró el nivel de oxidación de metionina a 4°C y a 25°C tras 3 meses de almacenamiento para formulaciones con y sin 5 mM de metionina. Como se muestra en la Tabla 10, la presencia de 5 mM de metionina en la formulación tiene como resultado una disminución multiplicada por 3 del nivel del pico A a 4°C y a 25°C. Por tanto, la adición de 5 mM de metionina impidió de forma eficaz la oxidación de la Met104.

TABLA 10

Nivel de oxidación de metionina expresado en forma de porcentaje de la cantidad total de IL-2 soluble (pico a + pico B) presente en las especies de metionina oxidada del pico A (% pico A de IL-2 soluble total) y porcentaje de la IL-2 soluble restante en las muestras almacenadas durante 3 meses a 4°C o a 25°C

Las formulaciones contenían 0,2 mg/ml de IL-2, 230 mM de arginina, 128 mM de ácido succínico a pH 5,8, EDTA 1 mM, 0,1% de polisorbato 80 y de 0 a 5 mM de metionina.

Formulación	% pico A de IL-2 soluble total)		% IL-2 restante (pico principal)	
	4°C	25°C	4°C	25°C
0 mM	2,7	4,1	101	97
5 mM	0,8	1,4	101	100

2.D. Efecto de la eliminación de oxígeno mediante purga con nitrógeno y desgasificación

Se analizó la eliminación de oxígeno en viales de muestra de IL-2 para minimizar la oxidación de metionina. El aire contenido en la cámara de aire de un vial de 3 cc con una muestra de 1 ml de IL-2 se purgó con nitrógeno. El oxígeno molecular disuelto se eliminó mediante desgasificación al vacío. La Tabla 11 muestra el cambio en el pico A y la cantidad total de IL-2 soluble (pico A + pico B) tras 1 semana de almacenamiento a 50°C para estas muestras. La purgación con nitrógeno solo disminuye ligeramente el porcentaje de especies de metionina oxidativa del 6,7% al 6,2%. La combinación de desgasificación de la solución y purga con nitrógeno de la cámara de aire reduce más el nivel de pico A en aproximadamente un punto porcentual. Por otro lado, el porcentaje de la cantidad total de IL-2 soluble permanece inalterado con la purga con nitrógeno o con desgasificación.

ES 2 276 698 T3

TABLA 11

Cambio en el porcentaje de la cantidad total de IL-2 soluble (pico A + pico B) presente en forma de la especie de metionina oxidada del pico A (% del pico A) y en porcentaje de la cantidad total de IL-2 soluble restante en las muestras retiradas a t= 00 y t= 1 semana a 50°C

Las formulaciones contenían 0,3 mg/ml de IL-2, 230 mM de arginina, 128 mM de ácido succínico, EDTA 1 mM, 0,1% de polisorbato 80.

Formulación	% pico A (oxidación de metionina)		% IL-2 restante
	t= 0	t= 1 sem a 50°C	
Control	3,1	6,7	81
Purga con nitrógeno	3,1	6,2	82
Desgasificación/purga con nitrógeno	3,0	5,8	81

2.E. Efecto de los conservantes

Se estudió el efecto de los conservantes sobre la oxidación de metionina. La Tabla 12 muestra el cambio en el pico a para mas muestras de formulación con y sin uno de los seis conservantes tras 6 y 12 meses de almacenamiento a 4°C y a 25°C. Todas las formulaciones que contenían conservantes mostraron un nivel similar del pico A con respecto al control, lo que indica que los conservantes no poseen un efecto detectable sobre la oxidación de metionina a excepción de la formulación que contenía 0,25% de m-cresol, que mostró un incremento significativo del nivel del pico A.

TABLA 12

Porcentaje de la cantidad total de IL-2 soluble (pico A + pico B) presente en forma de especie de metionina oxidada del pico A (% del pico A) en varias formulaciones con conservantes almacenadas 6 meses y 12 meses a 4°C y a 25°C

La formulación control contenía 0,2 mg/ml de IL-2, 230 mM de L-arginina base, 128 mM de ácido succínico, EDTA 1 mM, 5 mM de metionina, 0,1% de polisorbato 80 a pH de 5,8.

Conservante	% pico A (oxidación de metionina)				
	t= 0	6 meses		12 meses	
		4°C	25°C	4°C	25°C
Control	1,5	1,6	1,9	1,8	2,6
0,9% de alcohol bencílico	1,6	1,7	2,3	1,9	3,3
0,25% de m-cresol	1,6	1,8	6,7	2,1	3,5
0,5% de fenol	1,6	1,7	2,4	1,8	3,6
0,01 de cloruro de benzalconio	1,5	1,6	2,0	1,0	3,0
=,01% de cloruro de bencetonio	1,5	1,7	2,0	1,8	2,8
0,5% de clorobutanol	1,5	1,6	2,0	1,8	3,2

Ejemplo 3

Efecto de varios factores sobre la desamidación de la IL-2

La desamidación de la IL-2 se ha publicado anteriormente (Kunitani y col. (1986) *J. Chromatography* 359: 391-402. Se ha descubierto que el Asp88 es el principal sitio de desamidación en la IL-2 (Sasaoki y col. (1992) *Chem. Pharm. Bull.* 40 (4): 976-980). Las especies desamidadas se pueden detectar mediante RP-HPLC en forma de un pico justo detrás (Pico B') de la especie principal (pico B). La desamidación de la IL-2 se estudió en formulaciones que contenían arginina, NaCl y sorbitol. La Tabla 14 muestra que las especies desamidadas se pueden detectar únicamente en formulaciones que contengan sorbitol y NaCl, pero no en formulaciones que contengan arginina, tras la incubación a temperaturas elevadas durante 2 semanas. Por tanto, la arginina estabiliza la IL-2 frente a la degradación mediante desamidación.

TABLA 13

Desamidación detectada por RP-HPLC de especies del pico B' en formulaciones que contienen 0,2 mg/ml de IL-2, 10 mM de succinato sódico a pH 6 y 150 mM de arginina, 150 mM de NaCl o 270 mM de sorbitol

Formulación	% pico B'(desamidación) a t= 0 y t= 2 semanas			
	t= 0	-70°C	40°C	50°C
10 mM de NaSuc, 150 mM de Arb, pH 6	0	0	0	0
10 mM de NaSuc, 150 mM de NaCl, pH 6	0	0	0	3
10 mM de NaSuc, 270 mM de sorbitol, pH 6	0	0	2	2

Ejemplo 4

Efecto de la congelación-descongelación sobre la estabilidad de la IL-2

El daño proteico inducido por congelación suele estar causado por tres mecanismos: (1) la proteína tiene una conformación inestable a temperaturas frías (desnaturalización fría); (2) la proteína es susceptible a la desnaturalización en la interfase hielo-agua; (3) la proteína se ve dañada por los cambios en la concentración de sal o desplazamientos del PH tras la congelación.

En el caso de la IL-2 es probable que la pérdida de proteína que se produce durante la congelación-descongelación se deba a la desnaturalización y la agregación en la interfase hielo-agua, ya que el tensioactivo no iónico polisorbato 80 protegía de forma eficaz a la IL-2 de los daños producidos por la congelación-descongelación. Como se muestra en la Figura 7, la cantidad de IL-2 soluble disminuye con cada ciclo de congelación-descongelación en una formulación que contenga 0,2 mg/ml de IL-2, 10 mM de succinato sódico a pH 6 y 150 mM de arginina. La adición de polisorbato 80 en la formulación incrementa la estabilidad de la IL-2 frente a múltiples ciclos de congelación-descongelación. Cuando la concentración de polisorbato 80 alcanza el 0,05% y superior, la IL-2 está completamente protegida frente al daño producido por la congelación-descongelación.

Ejemplo 5

Efecto de la cizalladura mecánica sobre la estabilidad de la IL-2

5.1 Efecto de L polisorbato 80, EDTA, la concentración de proteína y el volumen de llenado

Se llevaron a cabo estudios para analizar la pérdida de IL-2 soluble inducida por cizalladura-tensión. Se evaluaron dos tipos de tensiones por cizalladura: la agitación en un agitador orbital (VWR Scientific, n° cat. 57018-754) y la agitación en vórtex (Fischer Scientific, modelo Genie 2, con una velocidad de 4). Varias formulaciones de IL-2 se cargaron con 1 ml en viales de 3 cc. Estos viales se almacenaron en un frigorífico (muestras control), se colocaron en una bancada de laboratorio durante la noche (muestras estáticas), se agitaron a 200 rpm durante la noche (muestras en agitación) o se agitaron en vórtex durante un minuto (muestras de vórtex). La tabla 14 muestra los resultados del cambio en la cantidad de IL-2 soluble para estas muestras.

En comparación con las muestras control refrigeradas, las muestras estáticas y las muestras de agitación no muestran pérdida alguna en la IL-2. Por tanto, la IL-2 es estable a temperatura ambiente y es estable al tratamiento de agitación. Por otro lado, cuando estas formulaciones se sometieron a agitación en vórtex durante un minuto se detectaron varias cantidades de pérdidas. Las formulaciones que contenían de 0,1 a 0,5 mg/ml de IL-2 o 1 y 5 mM de EDTA o concentraciones bajas de polisorbato 80 (0,005 a 0,05%) todas muestran una pérdida de 25-50% de IL-2 soluble. Por tanto, la agitación en vórtex durante un minuto fue más perjudicial que la agitación durante la noche para las moléculas de IL-2. La pérdida de IL-2 podía impedirse incrementando la concentración de polisorbato 80 en la formulación igual a y superior a 0,1%. Además, los viales completamente llenos sin aire en la cámara de aire también muestran pérdida mínimas de IL-2 solubles tras agitación en vórtex durante un min, lo que indica que la interfase aire-líquido era el principal factor causante del daño.

TABLA 14

Cambio en la cantidad de IL-2 soluble para las muestras almacenadas a temperatura ambiente durante la noche (estáticas), agitadas a 200 rpm durante la noche (de agitación) y agitadas en vórtex durante 1 min (de agitación en vórtex) en comparación con las almacenadas a 4°C

La formulación control contenía 0,2 mg/ml de IL-2, 10 mM de succinato sódico a pH 6 y 150 mM de arginina. La formulación se cargó con 1 ml en viales de vidrio de 3 cc a excepción de la muestra completamente cargada, que tenía la muestra control llena completamente hasta arriba los viales de 3 cc, sin aire en la cámara de aire. La IL-2 soluble se cuantificó mediante RP-HPLC.

Muestra (carga de 1 ml en viales de 3 cc)	% restante de IL-2 soluble		
	Estática durante la noche	En agitación durante la noche	En agitación con vórtex durante 1 min
0,2 mg/ml IL-2 (control)	99,6	100,8	74,7

ES 2 276 698 T3

0,1 mg/ml IL-2	100,3	102,7	72,0
0,5 mg/ml IL-2	99,7	101,0	68,6
1 mM EDTA	97,6	101,2	59,6
5 mM EDTA	99,3	102,7	72,2
0,005% de polisorbato 80	100,6	100,0	46,5
0,01% de polisorbato 80	99,7	100,4	66,1
0,05% de polisorbato 80	99,3	100,3	93,9
0,1% de polisorbato 80	99,2	100,0	89,0
0,2% de polisorbato 80	99,3	99,2	99,8
0,5% de polisorbato 80	99,1	98,4	99,7
1 mM EDTA, 0,1% de polisorbato 80	99,6	100,1	99,8
Viales completamente cargados	99,4	100,1	96,5

5.2. Efecto de la arginina

El efecto de la arginina sobre la estabilidad de la IL-2 frente al daño producido por el vórtex se indica en la Tabla 15. El incremento de la concentración de arginina de 150 mM a 230 mM tiene como resultado un incremento del 3% en la cantidad de IL-2 soluble del 65% al 69% tras someterla a agitación con vórtex durante un minuto. Por tanto, la arginina tiene un pequeño efecto sobre la IL-2 frente al daño por cizalladura, aunque previamente mostró un gran efecto de estabilización sobre la IL-2 frente a la degradación por formación de agregados.

Se estudió el efecto del polisorbato 80 en la formulación de 230 mM de arginina. La adición de una concentración baja de polisorbato 80 (0,02%) desestabiliza la IL-2 y la adición de una concentración elevada de polisorbato 80 (0,1%) estabiliza la IL-2 frente al daño producido por vórtex.

TABLA 15

Porcentaje restante de IL-2 soluble en varias formulaciones tras agitación con vórtex durante 1 minuto analizado mediante RP-HPLC

Formulación (todas contienen 0,2 mg/ml de IL-2 excepto si se indica lo contrario)	% IL-2 restante
Arginina 150 mM, Succinato Na 10 mM, EDTA 1 Mm, pH 5,8	65,5
Arginina 150 mM, ácido succínico 81 mM, EDTA 1 Mm, pH 5,8	65,3
Arginina 230 mM, Succinato Na 10 mM, EDTA 1 Mm, pH 5,8	69,0
Arginina 230 mM, ácido succínico 128 mM, EDTA 1 Mm, pH 5,8	68,9
Arginina 230 mM, ácido succínico 128 mM, EDTA 1 Mm, 0,02% de Tw 80, pH 5,8	55,1
Arginina 230 mM, ácido succínico 128 mM, EDTA 1 Mm, 0,1% de Tw 80, pH 5,8	99,5

5.3. Estudio de transporte

El daño por cizalladura sobre la IL-2 durante el transporte del producto se investigó en un estudio con transporte real. La IL-2 se preparó en una formulación de arginina y una formulación de NaCl, ambas con cantidades variables de polisorbato 80. Estas muestras de IL-2 se enviaron en hielo por vía aérea de Emeryville, California, a St Louis, Missouri, y desde St. Louis de vuelta a Emeryville. La Figura 8 muestra el análisis de RP-HPLC de la cantidad de IL-2 soluble en estas muestras. Sin la presencia de polisorbato en la formulación, se observa una pérdida de aproximadamente el 10% del IL-2 en las muestras formuladas con arginina y con NaCl. Las diferencias en la estabilidad entre la formulación con arginina y la formulación con NaCl son insignificantes, alrededor de un 1%. Con la presencia de polisorbato 80 en la formulación se reduce la pérdida de IL-2. A 0,1% de polisorbato 80 no se observa pérdida, lo que indica que la IL-2 está completamente protegida con esta concentración del tensioactivo. Por tanto, 0,1% de polisorbato 80 es eficaz en la formulación para prevenir el daño agudo en la IL-2 a causa de cizalladura durante el transporte.

ES 2 276 698 T3

En conclusión, la arginina puede servir como principal agente estabilizante en formulaciones farmacéuticas líquidas de IL-2 durante el almacenamiento prolongado para disminuir la agregación de IL-2 y su desamidación. Para incrementar más la concentración de arginina en la formulación y conseguir de este modo una mayor estabilidad de la IL-2 pero conservando la isotonicidad de la solución, se usa preferentemente ácido succínico para titular la arginina base a pH 5,8. Además, se pueden incluir en la formulación metionina y EDTA para impedir la oxidación de metionina de la proteína. Por último, en la formulación se puede incluir un tensioactivo no iónico, tal como polisorbato 80, para prevenir el daño a la IL-2 producido por la congelación-descongelación y la cizalladura mecánica.

Ejemplo 6

Prueba de eficacia del conservante

Varias formulaciones con conservantes antimicrobianos se han sometido a la prueba de eficacia de los conservantes de la farmacopea de Estados Unidos (USP). Los resultados se presentan en la Tabla 16. La muestra control sin conservante no superó la prueba, mientras que todas las formulaciones que contenían conservantes si superaron la prueba.

TABLA 16

Prueba de eficacia de los conservantes de la USP para formulaciones de rhIL-2. La formulación control contenía 0,1 mg/ml de rhIL-2, 230 mM de L-arginina base, 128 mM de ácido succínico, 1 mM de EDTA, 5 mM de metionina, 0,1% de polisorbato 80, a un pH de 5,8

CONSERVANTE	PRUEBA DE LA USP
Control	No superada
0,9% de alcohol bencílico	Superada
1,3% de alcohol bencílico	Superada
1,7% de alcohol bencílico	Superada
0,5% de clorobutanol	Superada
0,5% de fenol	Superada

Ejemplo 7

Propiedades productoras de dolor

Un modelo con ratas desarrollado en la Universidad de Florida, Facultad de Odontología, OMSDS División de neurociencia, se usó para evaluar las propiedades productoras de dolor, más particularmente el dolor de quemazón y de ardor producido por las formulaciones. El modelo se basa en un ensayo del actual inducido en células sensoriales que transportan los mensajes de dolor. Para realizar el ensayo, las células sensoriales (del ganglio de la raíz dorsal de la rata) se aíslan en una cámara de registro. Los registros se realizan de cada célula individual que se preseleccionan según criterios nociceptivos (inductores de dolor). Las puntuaciones del dolor por quemazón, el dolor por ardor y el dolor convencional se computan para la formulación analizada. Una puntuación de dolor de quemazón se define por la respuesta a la formulación de la prueba en relación con la capsaicina (500 nM). La capsaicina es bien conocida por su capacidad para producir dolor de quemazón intenso en seres humanos (Cooper y col. (1986) *Pain* 24: 93-116). Una puntuación del dolor por ardor se computa como la proporción entre la corriente producida por la formulación de la prueba y la producida por una solución tamponada a pH 5,0. La puntuación del dolor convencional clasifica la formulación en relación con solución salina normal (0,9% de NaCl, no tamponado), un producto parenteral hospitalario frecuente que se sabe que produce una sensación de ardor.

Una formulación líquida de L-arginina base-ácido succínico se ha sometido al análisis del dolor mediante este modelo. Los resultados de estas dos soluciones de prueba se muestran en la Tabla 17. Según las puntuaciones calculadas para el dolor de quemazón, el dolor de ardor y la puntuación del dolor convencional, la formulación de L-arginina-ácido succínico exhibió excelentes propiedades en comparación con la solución salina normal. También se ha observado que la corriente de prueba disminuía durante la aplicación de la formulación (disminución dependiente del tiempo), mientras que no disminuyó con solución salina normal. Esto demuestra que esta formulación se tolera mejor que la solución salina según se evalúa en este ensayo.

TABLA 17

Puntuaciones de dolor de quemazón, ardor y convencional para la formulación líquida y 0,9% de NaCl

La formulación líquida contenía 230 mM de L-arginina base, 128 mM de ácido succínico, 1 mM de EDTA, 5 mM de metionina, 0,1% de polisorbato 80 a un pH de 5,8.

Formulación	Dolor quemazón	Dolor por ardor	Puntuación del dolor convencional
0,9% de NaCl	0,084 ± 0,006	2,44 ± 0,62	1,73 ± 0,73
Formulación líquida de rhIL-2	0,044 ± 0,019	0,65 ± 0,23	0,16 ± 0,05

Ejemplo 8

Estudios de estabilidad con TFPI, sólo con fines informativos

Estudios de estabilidad y solubilidad de TFPI en varias formulaciones han demostrado que la L-arginina es un estabilizante (datos no mostrados) del TFPI y las especies tampón cargadas tales como iones citrato poseen un efecto solubilizante más profundo. En este estudio se estudiaron los efectos de la concentración de L-arginina y el sistema tampón sobre la estabilidad del TFPI en varias formulaciones. En particular, se analizó la influencia del sistema tampón en la forma de un ácido sustancialmente libre de su forma de sal frente a una mezcla de un ácido y su forma de sal, como se ha indicado previamente para las formulaciones de IL-2 en los ejemplos anteriores.

Materiales y procedimientos

Se formuló una solución de TFPI a 0,6 mg/ml en citrato sódico 20 mM y 300 mM de L-arginina a pH 5,5. Esta solución de intercambio con tampón a través de diálisis a 4°C usando membranas Spectral Por n° 7 (MWCO 3,500, N° ID 132-110) con varias formulaciones de L-arginina tamponadas a pH 6,5 mediante un sistema tampón con citrato o con succinato. Tras la diálisis, se midió la concentración de TFPI de cada solución mediante espectrofotometría UV/Vis. A continuación, cada solución se diluyó hasta 0,15 mg/ml usando el tampón adecuado. Después, las soluciones preparadas se alicuotaron (1 ml cada una) a viales de 3 cc para determinar la estabilidad en el almacenamiento. En este punto se reservaron bastantes viales para el punto de tiempo t= 0. El resto de los viales se colocó en un incubador a 50°C para un estudio de estabilidad acelerada. A continuación se tomaron puntos de tiempo a 3, 7, 14 y 30 días. Para el análisis a cada punto de tiempo, el contenido de cada vial se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml y después se centrifugó a 10K rpm durante aproximadamente 2 minutos. De este tubo se tomó el sobrenadante centrifugado de las muestras para su análisis usando IEX-HPLC (descripción necesaria), que de estudios previos se sabía que era un ensayo indicador de estabilidad.

Resultados y discusión

El TFPI se formuló hasta una concentración final de 0,15 mg/ml en varias formulaciones que contenían bien L-arginina base o L-arginina HCl. Las formulaciones de L-arginina HCl se tamponaron hasta un pH 5,5 mediante ácido cítrico o ácido succínico 10 mM en combinación con sus respectivos conjugados de sal de sodio. Las formulaciones de L-arginina base se titularon hasta un pH de 5,5, bien mediante ácido cítrico o bien con ácido succínico. Se llevaron a cabo un total de ocho estudios como se enumeran a continuación:

- 1) 20-150 mM de L-arginina HCl tamponada hasta un pH de 5,5 mediante 10 mM de ácido cítrico y citrato sódico;
- 2) 20-150 mM de L-arginina base tamponada hasta un pH de 5,5 mediante ácido cítrico;
- 3) 100-300 mM de L-arginina HCl tamponada hasta un pH de 5,5 mediante 10 mM de ácido cítrico y citrato sódico;
- 4) 100-300 mM de L-arginina base titulada hasta un pH de 5,5 mediante ácido cítrico;
- 5) 20-150 mM de L-arginina HCl tamponada hasta un pH de 5,5 mediante 10 mM de ácido succínico y succinato sódico;
- 6) 20-150 mM de L-arginina base titulada hasta un pH de 5,5 mediante ácido succínico;

7) 100-300 mM de L-arginina HCl tamponada hasta un pH de 5,5 mediante 10 mM de ácido succínico y succinato sódico;

8) 100-300 mM de L-arginina base titulada hasta un pH de 5,5 mediante ácido succínico.

5

Previamente se había determinado que la vía de degradación principal para el TFPI era la agregación/precipitación de proteínas (Chen y col. (1999) *J. Pharm. Sci.* 88: 881-888). La degradación del TFPI se puede seguir mediante control de la proteína soluble restante en las muestras de estabilidad. Las soluciones de TFPI formuladas a diferentes concentraciones de L-arginina se almacenaron a 50°C para un estudio de estabilidad acelerada. Las muestras se tomaron a intervalos de tiempo predeterminados. La proteína soluble en las muestras se separó de la proteína agregada/precipitada mediante centrifugación en un tubo de microcentrífuga. La cantidad de proteína soluble se determinó mediante el procedimiento IEX-HPLC (Chen y col. (1999) *J. Pharm. Sci.* 88: 881-888). A continuación, los datos de ajustaron en forma de una función del tiempo de almacenamiento mediante una ecuación de cinética exponencial sencilla ($Y = Y_0 \exp(-kt)$) para calcular la semivida para la proteína soluble restante usando el software gráfico KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, Pensilvania).

15

Los valores de semivida ($t_{1/2}$) para el TFPI soluble restante para las formulaciones tamponadas mediante adición de citrato o de citrato sódico se muestran en la Tabla 18. Los valores para las formulaciones tamponadas con ácido succínico o succinato sódico se muestran en la Tabla 19. Estos datos demuestran que el valor de la semivida se incrementa con concentraciones crecientes de L-arginina en estas formulaciones. Estos datos también se representan en las Figuras 9 y 19 para los sistemas tampón de citrato y succinato, respectivamente. El valor de la semivida se representa en forma de una curva parabólica y se incrementa como una función de la concentración de arginina. Esto establece que la L-arginina es un estabilizante para el TFPI.

20

Entre los dos sistemas tampón. La diferencia en la estabilidad del TFPI parece insignificante. Aunque el sistema tampón de citrato mostró más variabilidad (Figura 9), las dos curvas de semivida frente a concentración de arginina para el sistema tampón con succinato fueron esencialmente superponibles (Figura 10). El TFPI alcanzó una estabilidad similar a similares concentraciones de L-arginina, con independencia de cuál sistema tampón se usó para el ajuste de pH. La Figura 11 también compara las curvas de la semivida frente a la concentración de arginina entre el sistema tampón con ácido succínico y el sistema con ácido cítrico. Esta figura muestra que no existe una diferencia importante en la estabilidad del TFPI siempre que la concentración de arginina permanezca igual en la formulación. Estos datos demuestran que al efecto estabilizante contribuía principalmente la arginina.

25

30

No obstante, la titulación ácida con ácido succínico o cítrico permite una mayor concentración de arginina en la formulación (y por tanto una mayor estabilidad) manteniendo al mismo tiempo la isotonicidad. Por tanto, por ejemplo, ambas formulaciones 3-3 y 4-3 de la Tabla 18 poseen 300 mM de L-arginina en las formulaciones y sus valores de semivida son similares. Sin embargo, la formulación 3-3 usó 10 mM de ácido cítrico y citrato sódico para tamponar 300 mM de L-arginina base hasta un pH de 5,5 y poseían una osmolaridad de solución de 497 mOs/kg. Esta es una formulación hipertónica y no se prefiere como formulación inyectable. Por otro lado, la formulación 4-3 usó 121 mM de ácido cítrico en combinación con 300 mM de L-arginina base para ajustar el pH a 5,5 y la osmolaridad de la solución era de 295 mOsm/kg. Esta formulación se acerca mucho a una solución isotónica (290 mmol/kg) y, por tanto, es una formulación inyectable más preferida. Si se usó un modo convencional para ajustar el pH, por ejemplo, con 10 mM de ácido cítrico y de citrato sódico, sólo se podría añadir ligeramente más de 150 mM de L-arginina a la formulación sin superar la isotonicidad. La semivida de la formulación de 150 mM de L-arginina (Código 1-6) es de 16 días en comparación con 23 días observados para la formulación de 300 mM de L-arginina (Código 4-3). Por tanto, Formular TFPI con una base ácida (es decir, arginina-base) como estabilizante y un tampón que comprenda un ácido sustancialmente libre de su forma de sal (es decir, ácido succínico) proporciona un medio eficaz de añadir más estabilizante (es decir, arginina) para maximizar el efecto estabilizante del TFPI.

35

40

45

50 Conclusión

55

60

65

Este ejemplo demuestra que la L-arginina estabiliza el TFPI extendiendo su periodo de caducidad durante su almacenamiento. Usando titulación ácida. Se puede añadir más arginina a la formulación para maximizar el efecto estabilizante sin superar la isotonicidad, lo que se prefiere para las formulaciones inyectables.

ES 2 276 698 T3

TABLA 18

Datos de estabilidad para formulaciones con TFPI arginina-citrato a pH 5,5

5 La semivida ($t_{1/2}$) se obtuvo mediante ajuste de los datos de estabilidad a 50°C usando una ecuación cinética exponencial sencilla.

Código	Formulación	Osmolaridad (mmol/kg)	$t_{1/2}$ (día)
1-1	20 mM L-ara HCl, 10 mM ácido cítrico/citrato Na	66	9,4
1-2	40 mM L-ara HCl, 10 mM ácido cítrico/citrato Na	81	12,6
1-3	60 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido cítrico/citrato Na	91	10,7
1-4	80 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido cítrico/citrato Na	106	10,9
1-5	100 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido cítrico/citrato Na	190	12,5
1-6	150 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido cítrico/citrato Na	276	16,0
2-1	20 mM L-Arg base titulada mediante 8,9 mM de ácido cítrico	67	5,7
2-2	40 mM L-Arg base titulada mediante 17,8 mM de ácido cítrico	84	15,0
2-3	60 mM L-Arg base titulada mediante 26,6 mM de ácido cítrico	95	17,0
2-4	80 mM L-Arg base titulada	109	14,6

	mediante 34,2 mM de ácido cítrico		
2-5	100 mM L-Arg base titulada mediante 42,6 mM de ácido cítrico	119	18,2
2-6	150 mM L-Arg base titulada mediante 62,4 mM de ácido cítrico	147	20,4
3-1	100 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido cítrico/citrato Na	239	14,8
3-2	200 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido cítrico/citrato Na	358	19,6
3-3	300 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido cítrico/citrato Na	497	21,7
4-1	100 mM L-Arg base titulada mediante 42,2 mM de ácido cítrico	155	16,7
4-2	200 mM L-Arg base titulada mediante 81,8 mM de ácido cítrico	224	22,5
4-3	300 mM L-Arg base titulada mediante 121 mM de ácido cítrico	295	23,3

TABLA 19

Datos de estabilidad para formulaciones con TFPI arginina-succinato a pH 5,5

La semivida ($t_{1/2}$) se obtuvo mediante ajuste de los datos de estabilidad a 50°C usando una ecuación cinética exponencial sencilla.

Código	Formulación	Osmolaridad (mmol/kg)	$t_{1/2}$ (día)
1-1	20 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido succínico/succinato Na	66	9,9
1-2	40 mM L-Arg HCl, 10 mM	97	11,5

ES 2 276 698 T3

	ácido cítrico/citrato Na		
5	1-3 60 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido succínico/succinato Na	129	15,3
10	1-4 80 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido succínico/succinato Na	163	16,7
15	1-5 100 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido succínico/succinato Na	197	20,5
20	1-6 150 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido succínico/succinato Na	282	21,9
25	2-1 20 mM L-Arg base titulada mediante 12,5 mM de ácido succínico	40	6,7
30	2-2 40 mM L-Arg base titulada mediante 25,2 mM de ácido succínico	62	12,6
35	2-3 60 mM L-Arg base titulada mediante 37,5 mM de ácido succínico	85	16,4
40	2-4 80 mM L-Arg base titulada mediante 49,9 mM de ácido succínico	107	19,6
45	2-5 100 mM L-Arg base titulada mediante 62,4 mM de ácido succínico	129	20,9
50	2-6 150 mM L-Arg base titulada mediante 91,4 mM de ácido succínico	192	23,1
55	3-1 100 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido succínico/succinato Na	207	16,5
60	3-2 200 mM L-Arg HCl, 10 mM ácido succínico/succinato Na	353	21,6
65	3-3 300 mM L-Arg HCl, 10 mM	515	21,7

ES 2 276 698 T3

	ácido succínico/succinato Na		
5	4-1	100 mM L-Arg base titulada mediante 61,3 mM de ácido succínico	127 17,0
10	4-2	200 mM L-Arg base titulada mediante 122 mM de ácido succínico	256 21,4
15	4-3	300 mM L-Arg base titulada mediante 180 mM de ácido succínico	363 22,5
20			

Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de la comprensión, será obvio que se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica líquida que comprende un polipéptido o una variante biológicamente activa del mismo, en el que dicho procedimiento comprende combinar dicho polipéptido o variante del mismo con al menos un aminoácido base y un agente tampón que es un ácido sustancialmente libre de su forma de sal, en el que dicho aminoácido base comprende al menos un aminoácido seleccionado del grupo constituido por arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico, donde cualquier aminoácido se encuentra en su forma de base o en forma de sal; en el que dicha composición posee un pH dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 4,0 a un pH de aproximadamente 9,0, dicho polipéptido es interleucina-2(IL-2) y dicha variante del mismo posee una identidad de secuencia de al menos un 70% con dicho polipéptido, en el que el pH se ajusta antes de la adición del polipéptido.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho aminoácido es al menos uno de los aminoácidos arginina en su forma de base libre y lisina en su forma de base libre.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho ácido se selecciona del grupo compuesto por ácido acético, ácido aspártico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fosfórico y ácido glutámico.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho ácido es ácido succínico y dicho aminoácido es arginina en su forma de base libre.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM de arginina en su forma de base libre y aproximadamente 80 mM a aproximadamente 190 mM de ácido succínico se combinan con dicho polipéptido o variante del mismo.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que aproximadamente 150 mM a aproximadamente 350 mM de arginina en su forma de base libre se combinan con dicha IL-2 o variante de la misma y dicho ácido succínico.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la arginina en su forma de base libre a una concentración de aproximadamente 230 mM y ácido succínico a una concentración de aproximadamente 128 mM se combinan con dicha IL-2 o variante de la misma.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicha composición posee un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5 y una osmolaridad de aproximadamente 250 mmol/kg a aproximadamente 330 mmol/kg.
9. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho ácido es ácido cítrico.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que aproximadamente 175 mM a aproximadamente 400 mM de arginina en su forma de base libre y aproximadamente 40 mM a aproximadamente 200 mM de ácido cítrico se combinan con dicho polipéptido o variante del mismo.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha composición además comprende metionina en una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de al menos un residuo de metionina en dicho polipéptido o variante del mismo durante el almacenamiento de dicha composición.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha composición además comprende un tensioactivo no iónico en una cantidad suficiente para inhibir la agregación de dicho polipéptido o variante del mismo en respuesta a la congelación-descongelación o a la cizalladura mecánica durante el almacenamiento de dicha composición.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicho tensioactivo no iónico es polisorbato 80.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho aminoácido base es arginina en su forma de base libre a una concentración de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 350 mM y el ácido es ácido succínico a una concentración de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 190 mM.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que aproximadamente 230 mM de arginina en su forma de base libre y aproximadamente 128 mM de ácido succínico se combinan con dicha IL-2 o variante de la misma, la composición posee un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5 y una osmolaridad de aproximadamente 250 mmol/kg a aproximadamente 330 mmol/kg.
16. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicha composición posee un periodo de caducidad de al menos aproximadamente 18 meses cuando se almacena a 2-8°C.
17. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicha composición posee un periodo de caducidad de al menos aproximadamente 20 meses cuando se almacena a 2-8°C.
18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que dicha composición además comprende metionina, que está presente en dicha composición a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproxi-

ES 2 276 698 T3

madamente 10 mM, polisorbato 80, que está presente en dicha composición a una concentración de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,2% y aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5,0 mM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o de EDTA disódico.

5 19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en el que dicha IL-2 o dicha variante de la misma está presente en dicha composición a una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 2,0 mg/ml.

10 20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 6, 7 y 14 a 19, en el que dicha IL-2 es IL-2 humana recombinante (rhIL-2) o una variante biológicamente activa de la misma que posea una identidad de secuencia de al menos un 70% con la IL-2 humana.

15 21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que dicha variante de la misma posee una identidad de secuencia de al menos un 80% con la IL-2 humana.

20 22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dicha variante de la misma posee una identidad de secuencia de al menos un 90% con la IL-2 humana.

25 23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que dicha variante de la misma posee una identidad de secuencia de al menos un 95% con la IL-2 humana.

30 24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que dicha variante es interleucina 2 des-alanil-1, serina-125 humana.

35 25. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, que además comprende preparar dicha composición en una forma seca, en la que dicha forma seca se selecciona del grupo constituido por una forma liofilizada y una forma pulverizada.

40

45

50

55

60

65

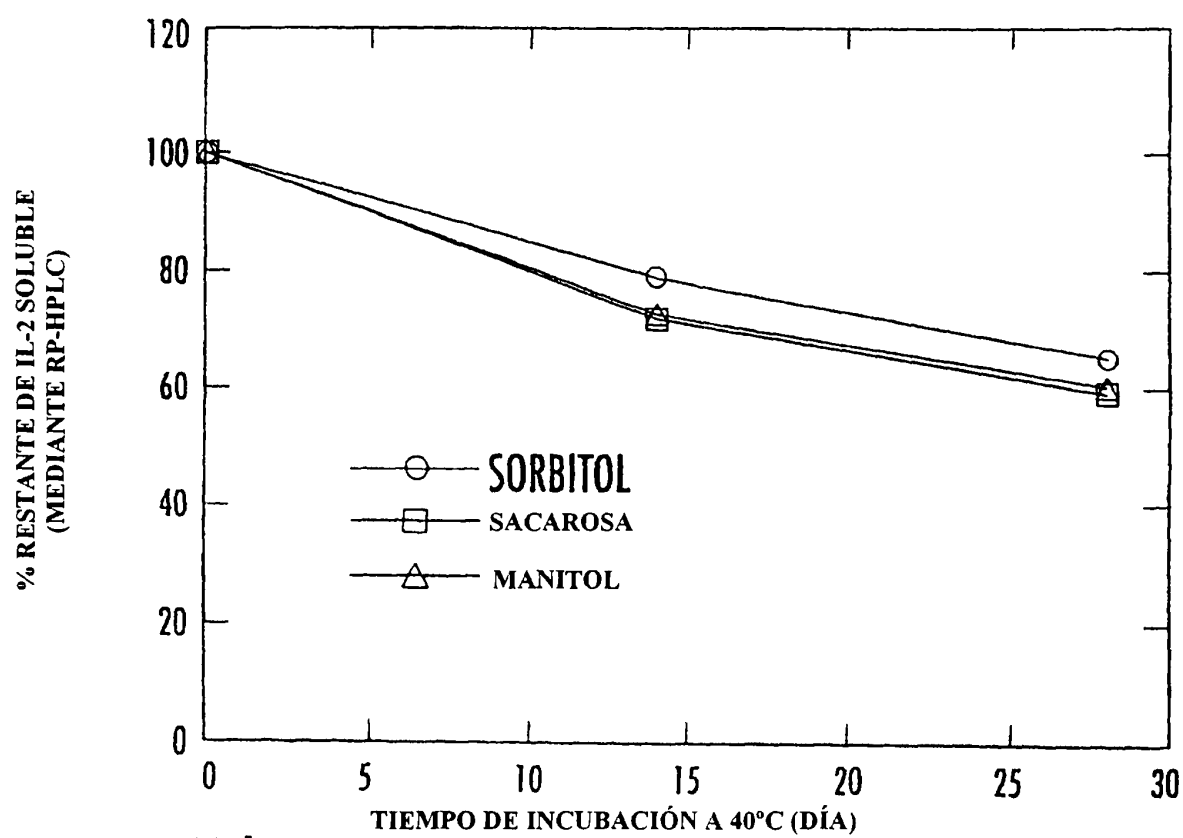


FIG. 1.

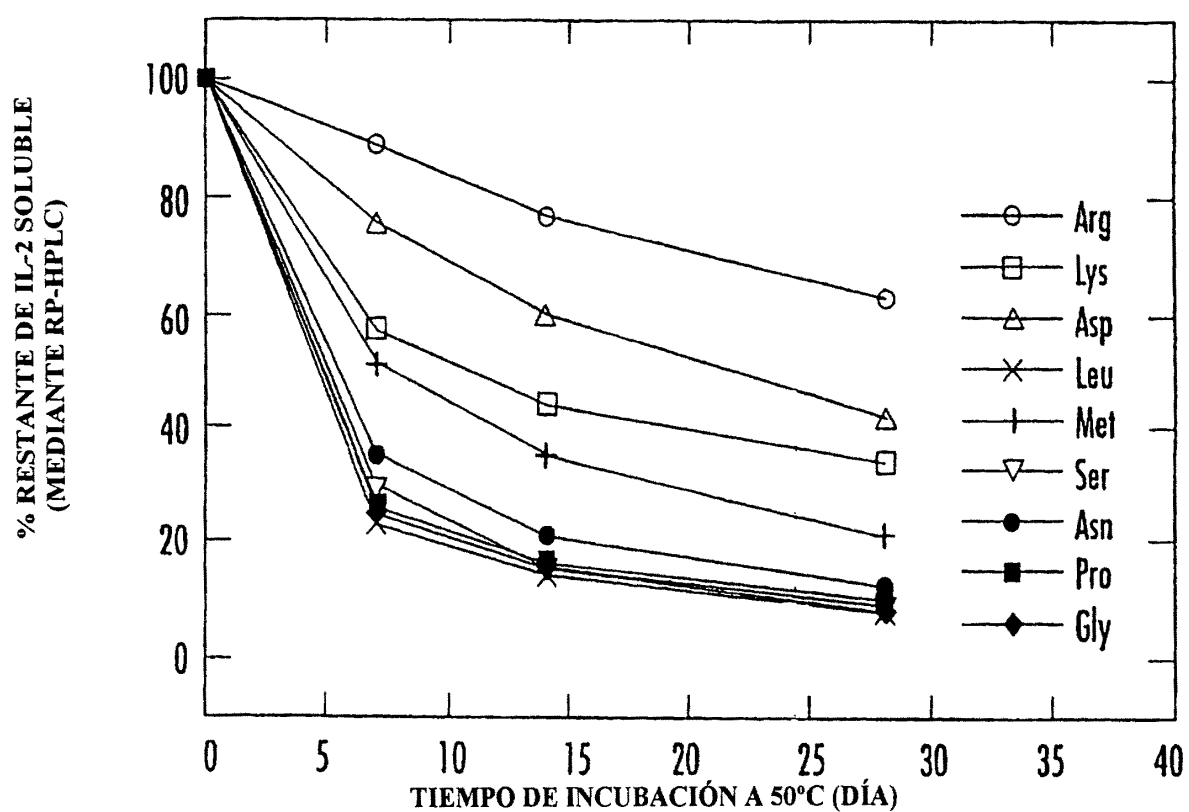
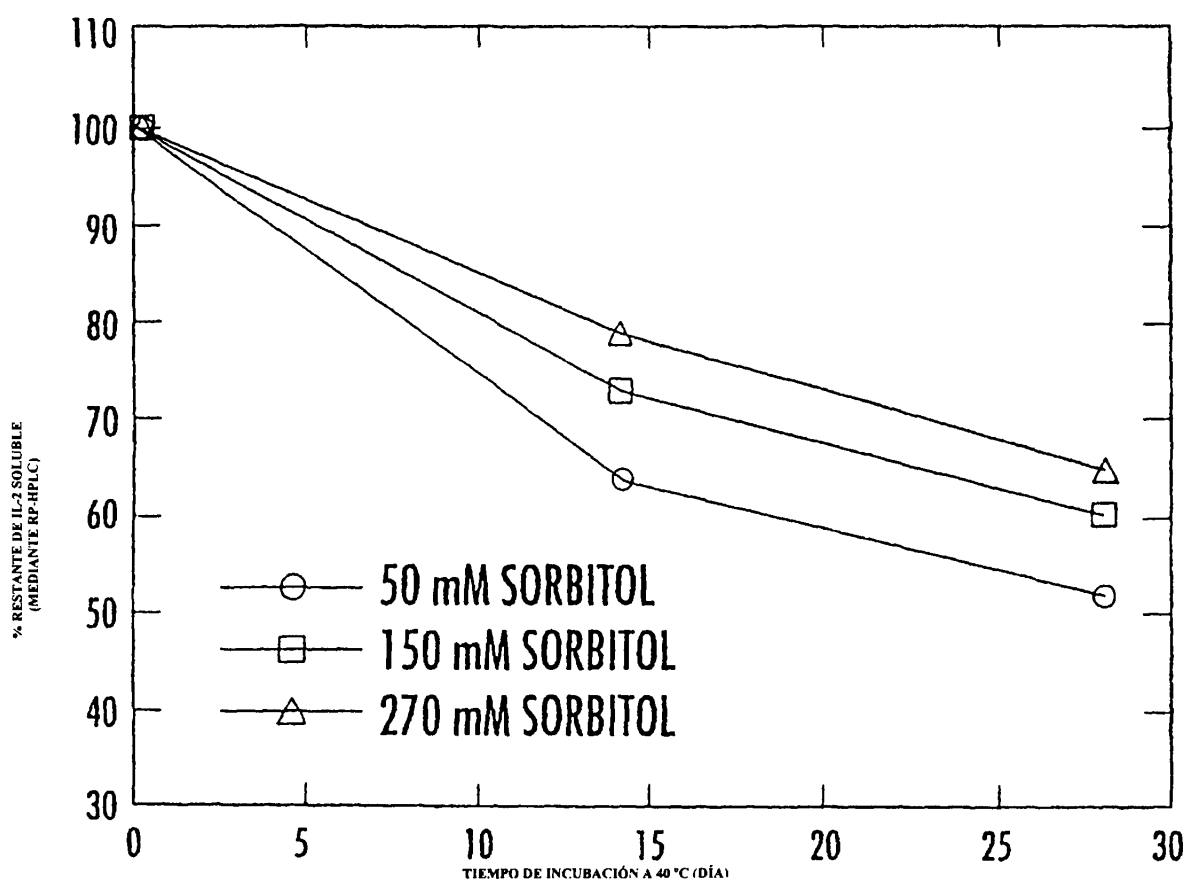
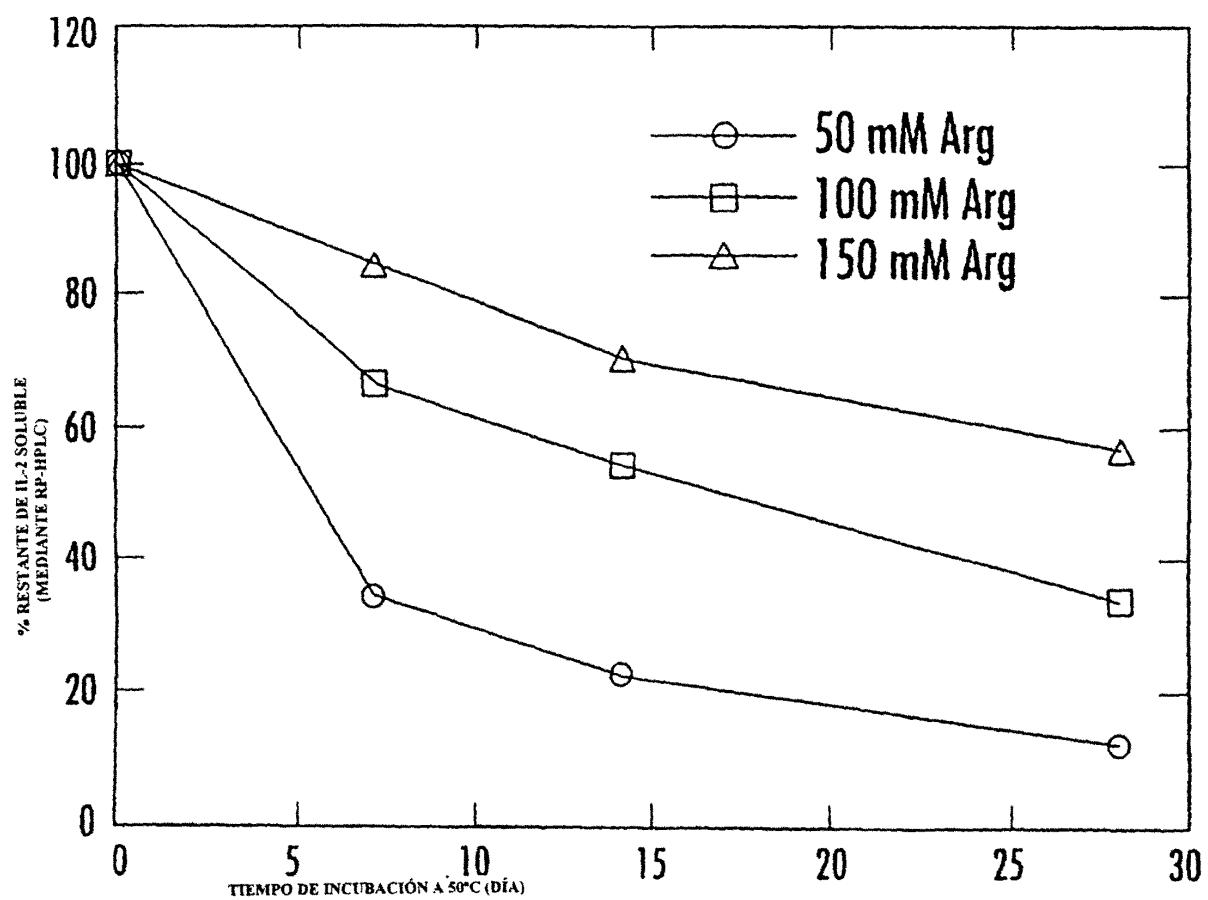
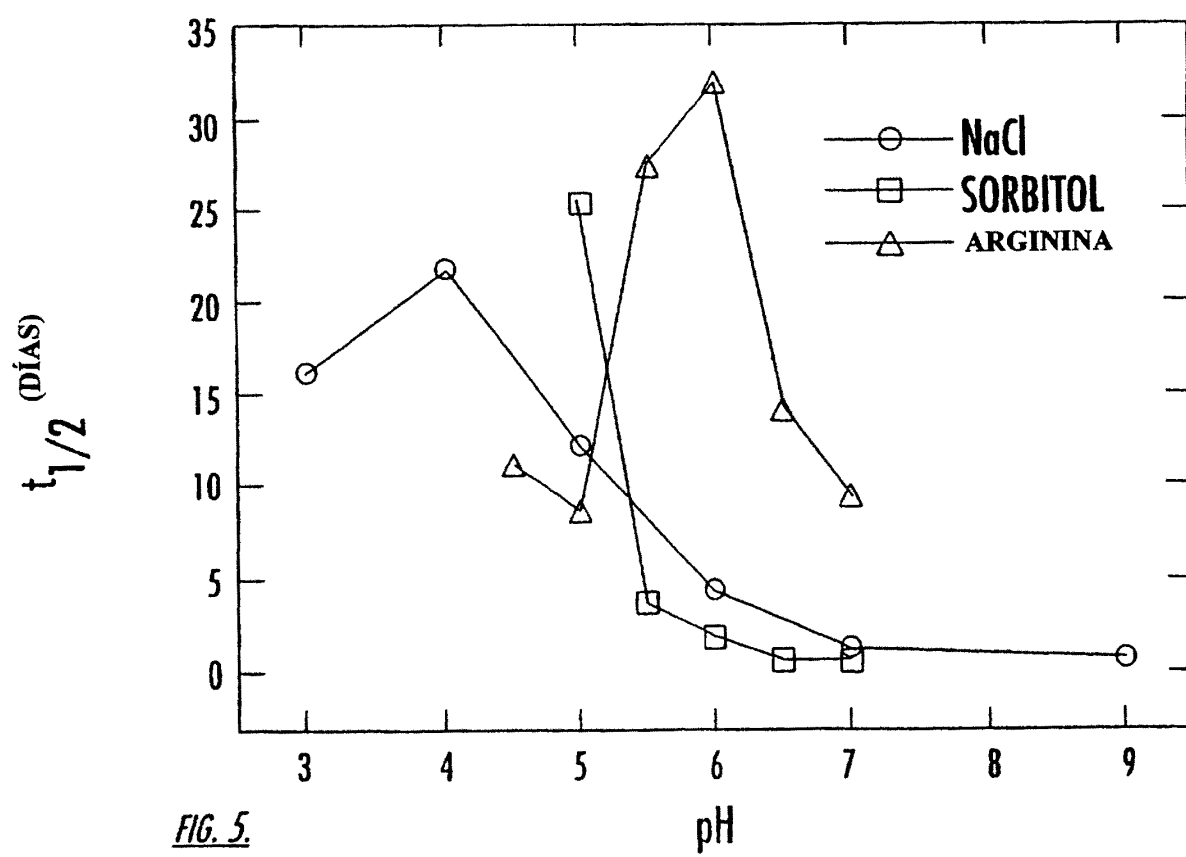
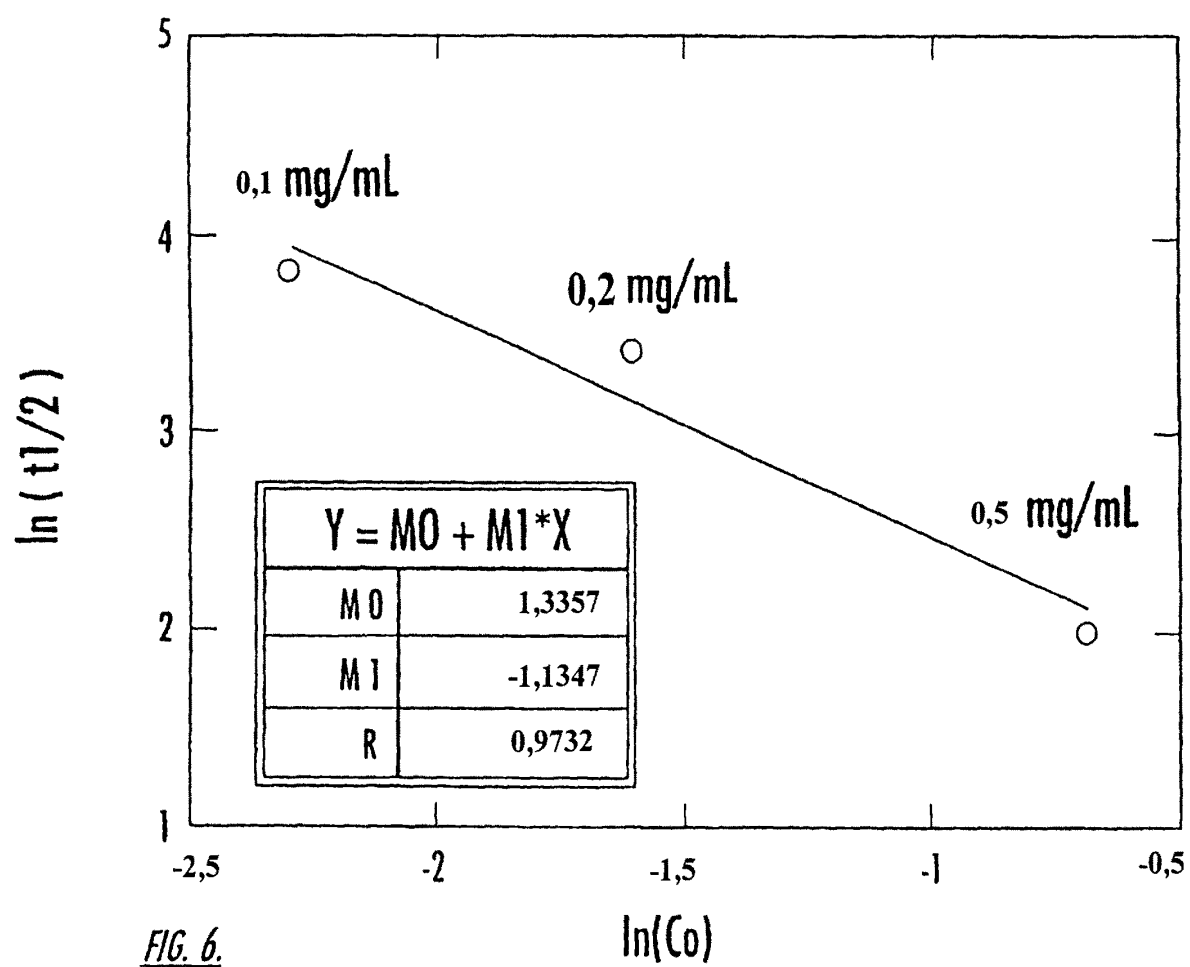


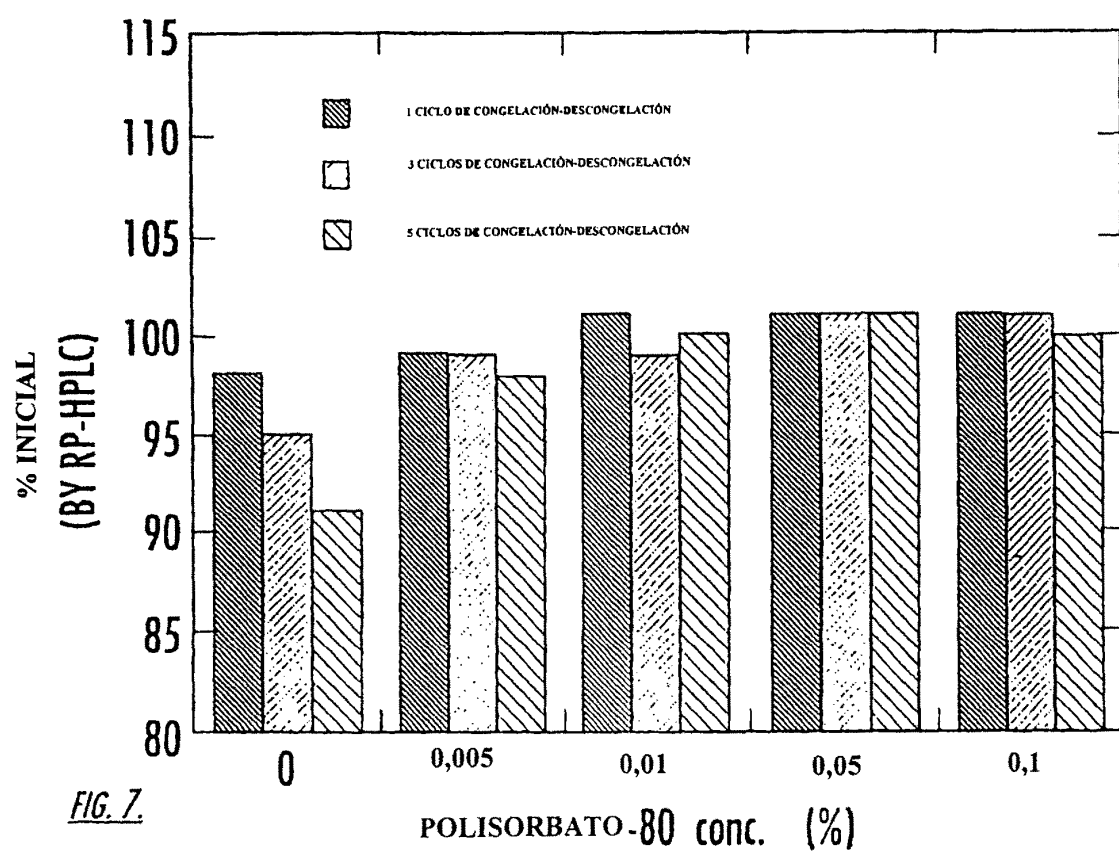
FIG. 2.



FIG. 4







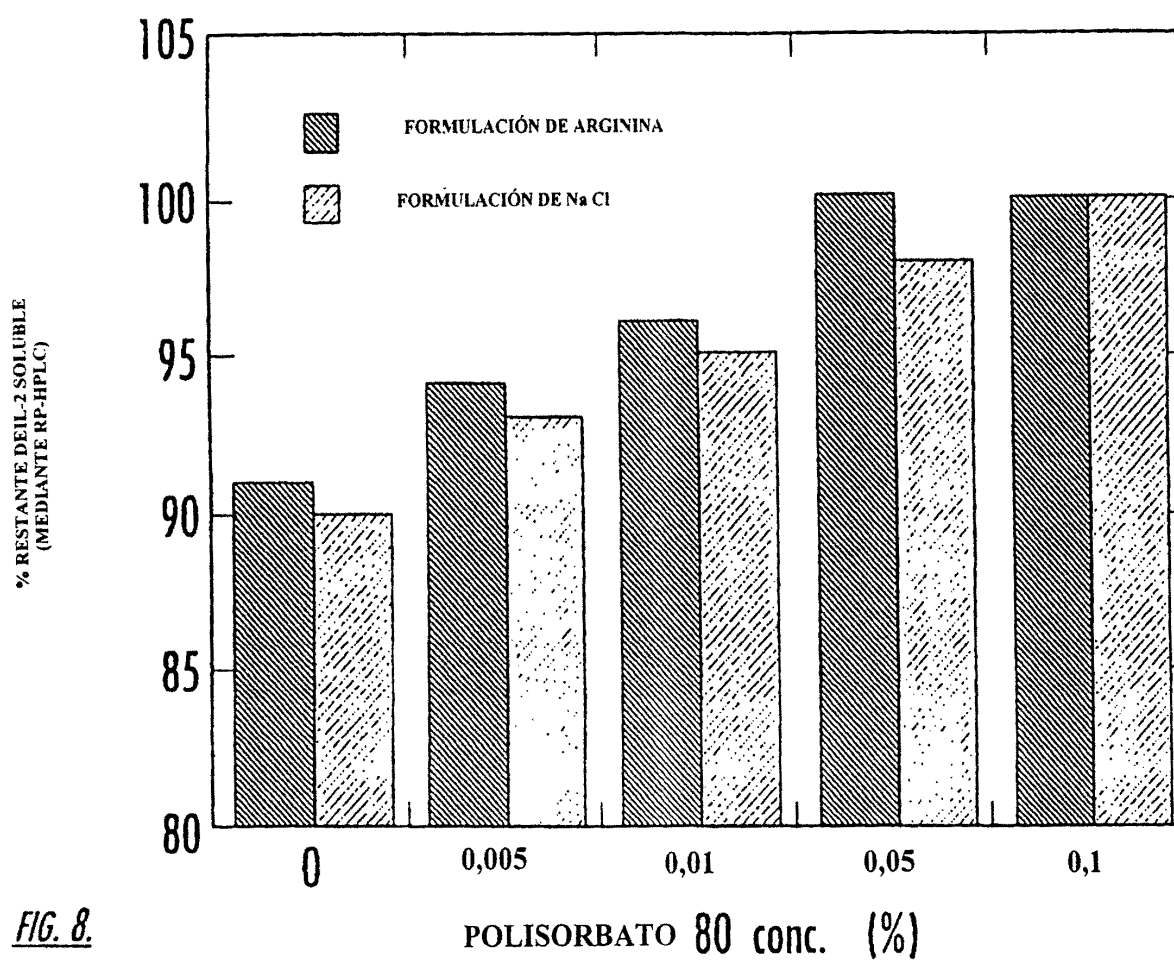
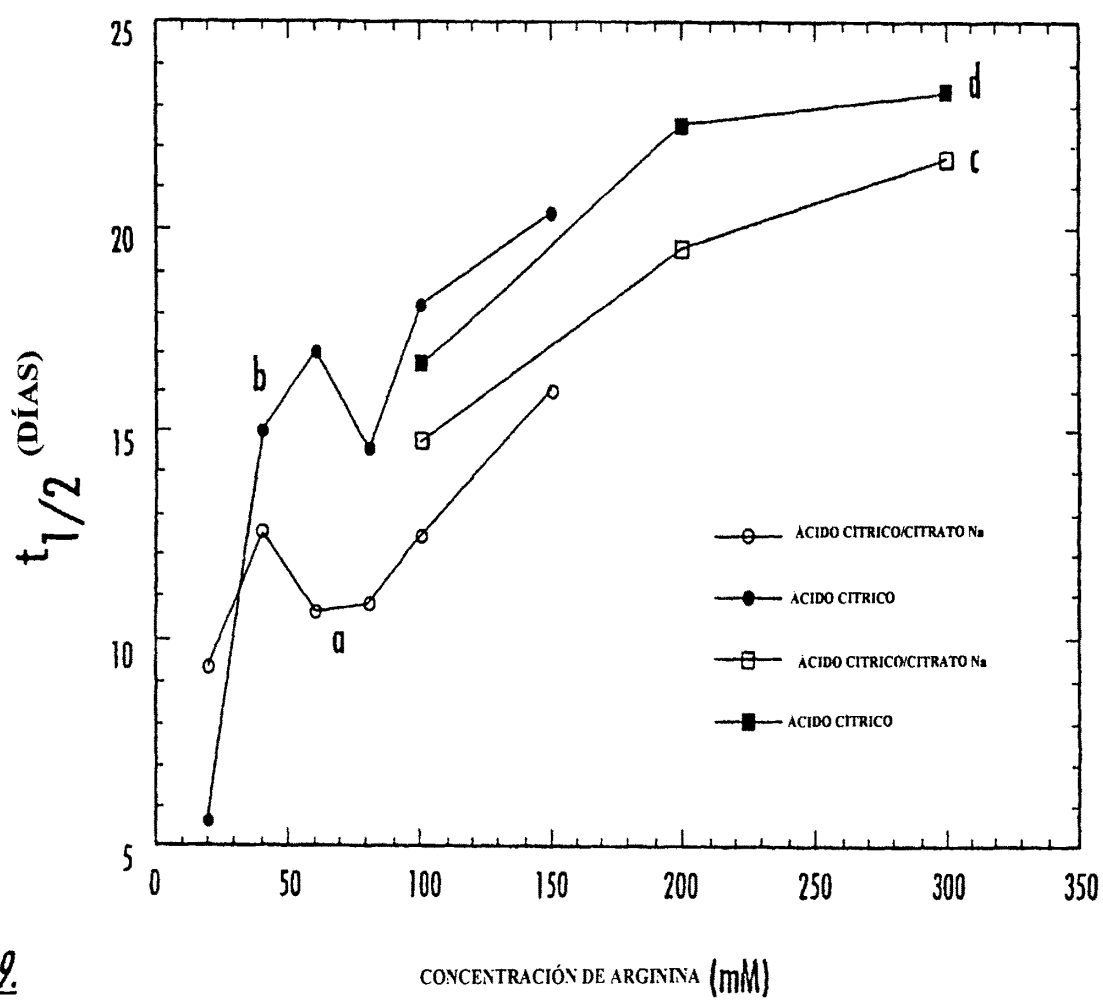


FIG. 8.

FIG. 9.

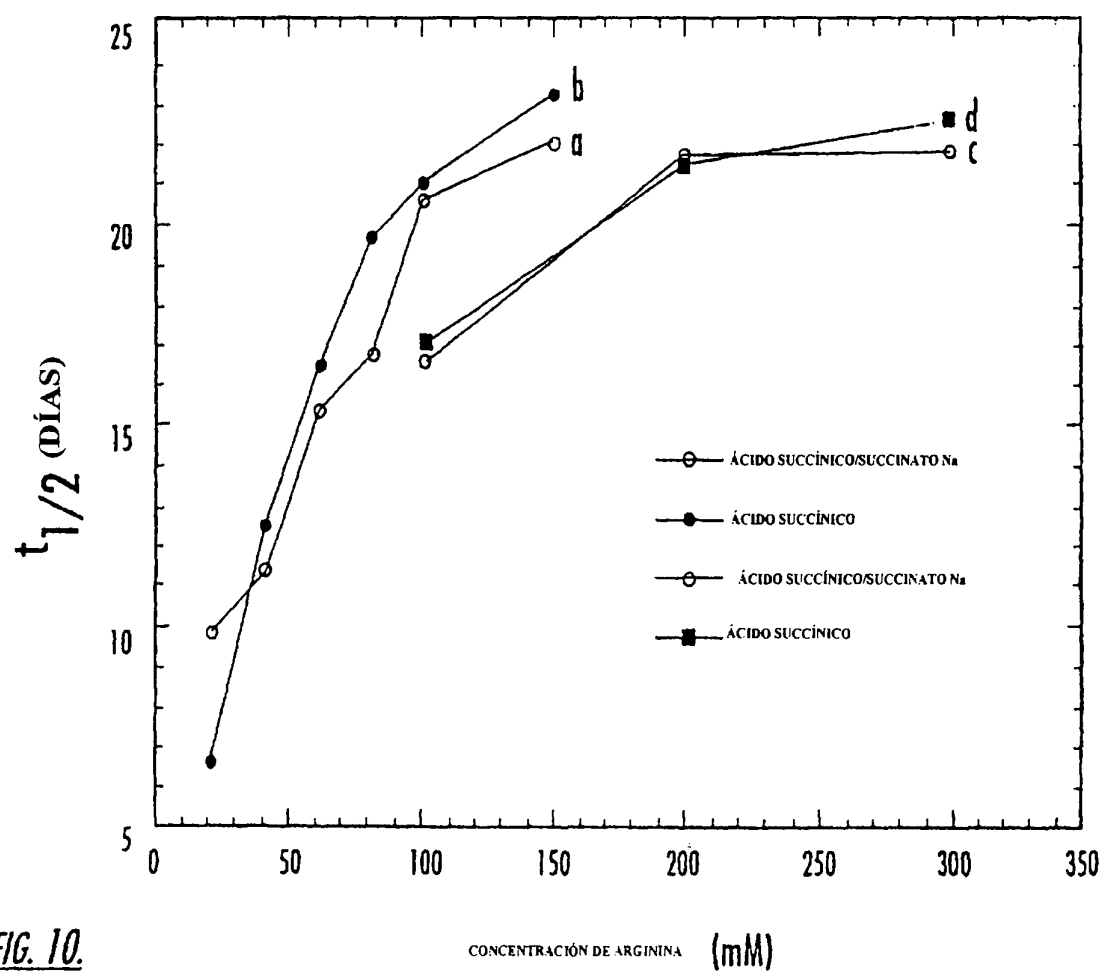
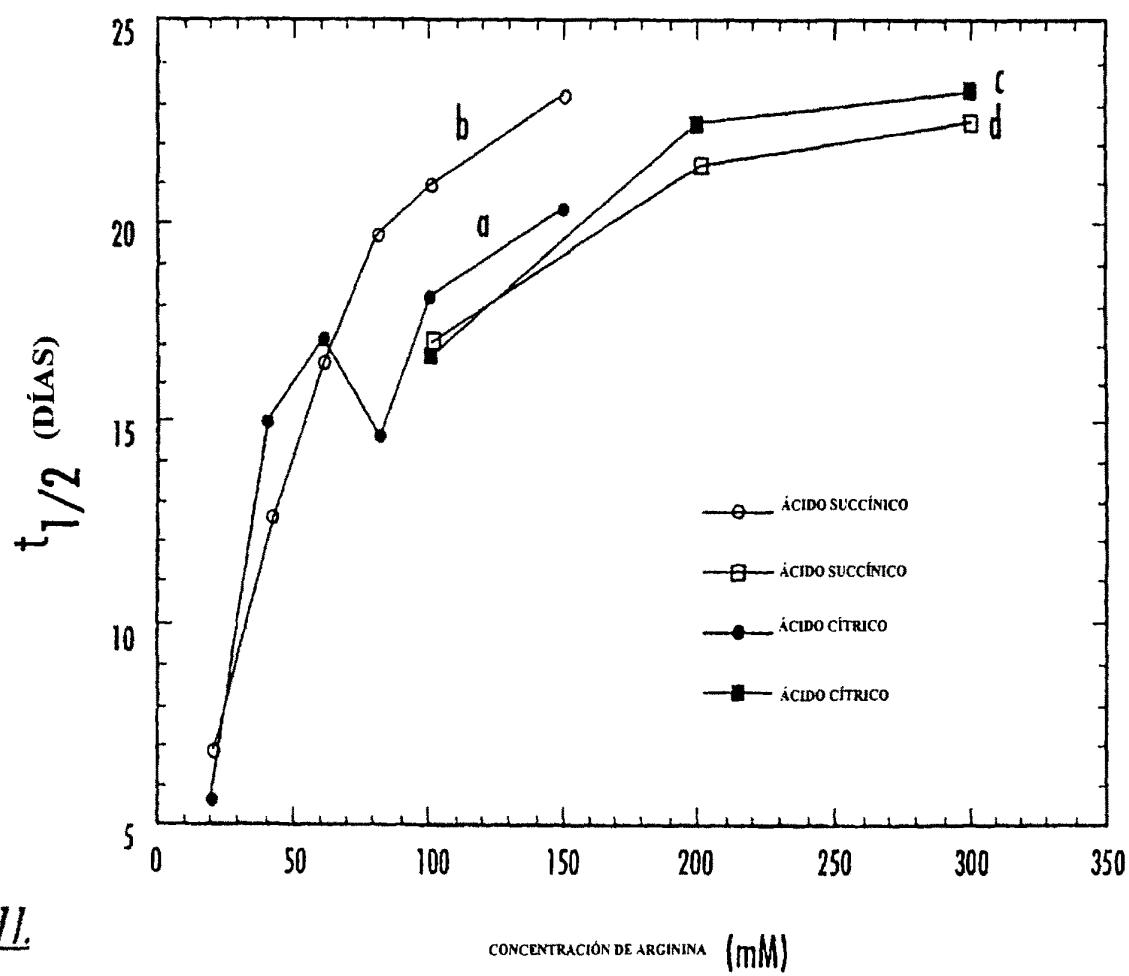


FIG. 10.

FIG. 11.