

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 002 132**

51 Int. Cl.:

A61P 7/04 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2015 PCT/IB2015/052137**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15150968**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2015 E 15773831 (1)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024 EP 3125923**

54 Título: **Composición farmacéutica liofilizada de proteína de fusión fc-péptido**

30 Prioridad:

29.03.2014 IN 1367MU2014

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2025

73 Titular/es:

**INTAS PHARMACEUTICALS LIMITED (100.00%)
 Corporate House, Nr. Sola Bridge S.G. Highway,
 Thaltej
 Ahmedabad - 380054, Gujrat, IN**

72 Inventor/es:

**GADGIL, HIMANSHU;
 CHHATBAR, CHANDRESH y
 PANDEY, VIJAYKANT**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 3 002 132 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica liofilizada de proteína de fusión fc-péptido

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica liofilizada que comprende una proteína de fusión Fc-péptido, amortiguador, agente volumétrico, estabilizador y agente tensioactivo.

10 Antecedentes de la invención

La trombopoyetina (TPO) también conocida como factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos (MGDF) es una proteína que en humanos se codifica por el gen TPO. La trombopoyetina es el regulador fisiológicamente relevante de la producción de plaquetas.

15 La trombopoyetina es una hormona de glucoproteína producida principalmente por el hígado y el riñón que regula la producción de plaquetas por la médula ósea. Estimula la producción y diferenciación de megacariocitos, las células de médula ósea que se fragmentan en un gran número de plaquetas. La megacariocitopoyesis es el proceso de desarrollo celular que conduce a la producción de plaquetas. La proteína codificada por este gen es un factor de crecimiento humoral necesario para la proliferación y maduración de megacariocitos, así como para trombopoyesis.

20 La producción de TPO se regula por un mecanismo diferente al de la producción de EPO. No hay ningún "sensor" del conteo de plaquetas y ningún cambio en la transcripción, traducción o liberación de TPO de su sitio hepático de producción. Más bien, TPO se produce constitutivamente (se reduce solo en la enfermedad hepática), no tiene forma de almacenamiento, entra en la circulación y se depura por los receptores de TPO ávidos en las plaquetas, y probablemente en menor grado por aquellos en los megacariocitos. Cuando se reduce la producción de plaquetas, se reduce la depuración de TPO, aumentan los niveles circulantes e incrementa la estimulación de precursores de megacariocitos. Con la producción incrementada de plaquetas, el conteo de plaquetas circulantes aumenta, se depura más TPO y se restablece el equilibrio.

25 Romiplostim, comercializado como NPLATE® por Amgen Inc., es un miembro de la clase mimética de TPO. Es una proteína de fusión Fc-péptido (pepticuerpo) que activa las vías transcripcionales intracelulares que conducen a producción incrementada de plaquetas mediante el receptor de TPO (también conocido como cMpl). Romiplostim se produce por tecnología de ADN recombinante en *Escherichia coli* (E coli). La molécula de pepticuerpo contiene dos subunidades de cadena individual idénticas, cada una que consiste en un dominio Fc de inmunoglobulina IgG1 humana, enlazado covalentemente en el extremo C-terminal a un péptido que contiene dos dominios de unión a receptor de trombopoyetina. Romiplostim no tiene homología de secuencia de aminoácidos con TPO endógena. Romiplostim se indica para el tratamiento de trombocitopenia en pacientes con trombocitopenia inmunitaria crónica (ITP) que han tenido una respuesta insuficiente a corticosteroides, inmunoglobulinas o esplenectomía.

35 El término "proteína de fusión Fc-péptido" (pepticuerpo) se refiere a una molécula que comprende péptidos fusionados directa o indirectamente a otras moléculas tal como un dominio Fc de un anticuerpo, donde la porción peptídica se une específicamente a una diana deseada. El o los péptidos se pueden fusionar a una región Fc o insertar en un bucle Fc, una molécula Fc modificada. Los bucles Fc se describen en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US2006/0140934.

40 En general, las proteínas tienen una semivida muy corta y experimentan desnaturalización (tal como agregación, disociación y adsorción en la superficie de los vasos) tras la exposición a diferentes factores tal como temperaturas desfavorables, interfaz agua-aire, alta presión, estrés mecánico físico, solventes orgánicos y contaminación microbiana. En consecuencia, la proteína desnaturalizada pierde propiedades fisicoquímicas intrínsecas y actividad fisiológica. La desnaturalización de proteínas frecuentemente es irreversible y por lo tanto, las proteínas, una vez desnaturalizadas, pueden no recuperar sus propiedades nativas al estado inicial.

45 Para superar el problema de estabilidad de las proteínas en formulaciones acuosas, los productos proteicos terapéuticos se elaboran más estables mediante liofilización (deshidrocongelación). Los productos liofilizados usualmente se acompañan de medios acuosos estériles para la reconstitución. Después de la reconstitución, las formulaciones habitualmente tienen vidas de almacenamiento útiles cortas, incluso cuando se almacenan a bajas temperaturas (por ejemplo, 5 °C).

50 Las prácticas habituales para mejorar la estabilidad de polipéptido se pueden abordar al variar la concentración de elementos con la formulación, o al adicionar excipientes para modificar la formulación.

55 US55S0856 divulga la estabilización de proteínas secas contra la pérdida de actividad biológica en las formulaciones al adicionar un estabilizador de reconstitución tras la rehidratación de la proteína seca. También se describe un kit para producir una formulación al disolver la composición seca en un solvente que contiene el

estabilizador de reconstitución.

US20090258017 divulga una composición de pepticuerpo terapéutico liofilizada que comprende un amortiguador, agente volumétrico, un agente estabilizador y opcionalmente un agente tensioactivo y un kit para preparar una composición farmacéutica acuosa que comprende un primer recipiente que tiene una composición de pepticuerpo terapéutico liofilizada y un segundo recipiente que tiene un solvente fisiológicamente aceptable para la composición liofilizada.

Carpenter et al., (Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice, Pharmaceutical Biotechno., vol. 13, 1 January 2002) divulga un diseño general de formulaciones de proteínas liofilizadas estables. También divulga que ciertas sales amortiguadoras tienden a precipitar durante la congelación, lo que provoca grandes cambios en el pH.

Sin embargo, la biodisponibilidad de agentes terapéuticos de proteínas comercialmente disponibles tal como Romiplostim se limita por su corta semivida en plasma y susceptibilidad a la degradación por proteasa. Estas deficiencias les impiden alcanzar la máxima potencia clínica.

Por lo tanto, existe la necesidad de una formulación farmacéutica liofilizada estable con una vida útil prolongada, que comprenda una proteína de fusión Fc-péptido que sea adecuada para uso terapéutico para inhibir o contrarrestar la producción de plaquetas reducida. También existe la necesidad de una formulación farmacéutica liofilizada estable con una vida útil prolongada, que comprenda una proteína de fusión Fc-péptido adecuada para uso terapéutico que se administre fácilmente y que contenga una alta concentración de proteína.

Objeto de la invención

El objeto principal de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica liofilizada nueva y estable de una proteína de fusión Fc-péptido que abarca Romiplostim como una proteína de fusión Fc-péptido que se puede obtener al liofilizar una formulación que comprende Romiplostim a una concentración de 0,1 mg/mL a 1,0 mg/mL, citro-fosfato como amortiguador, sacarosa, trehalosa sola o en combinación de los mismos como agente volumétrico, polisorbato 20 a pH de aproximadamente 5,0.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica liofilizada nueva y estable de Romiplostim que se puede obtener al liofilizar una formulación que comprende Romiplostim a una concentración de 0,5 mg/mL, amortiguador, agente volumétrico, agente tensioactivo; donde el amortiguador es citro-fosfato a una concentración de 9 mM a 11 mM; donde el pH de la formulación está en un intervalo de aproximadamente 4,0-6,0; donde el agente volumétrico es sacarosa a una concentración de 8,0 % a 10,0 % p/v; donde el agente tensioactivo es polisorbato 20 a una concentración de 0,003 % a 0,005 % p/v.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica liofilizada nueva y estable de Romiplostim que se puede obtener al liofilizar una formulación que comprende Romiplostim a una concentración de 0,5 mg/mL, amortiguador, agente volumétrico, agente tensioactivo; donde el amortiguador es citro-fosfato a una concentración de 9 mM a 11 mM; donde el pH de la formulación es 5,0, donde el agente volumétrico es sacarosa a una concentración de 1,0 % a 3,0 % p/v; donde la composición comprende además trehalosa como agente volumétrico a una concentración de 7,0 % a 9,0 % p/v; donde el agente tensioactivo es polisorbato 20 a una concentración de 0,003 % a 0,005 % p/v.

Sumario de la invención

El aspecto principal de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica liofilizada nueva y estable de una proteína de fusión Fc-péptido que abarca Romiplostim como una proteína de fusión Fc-péptido que se puede obtener al liofilizar una formulación que comprende Romiplostim a una concentración de 0,1 mg/mL a 1,0 mg/mL, citro-fosfato como amortiguador, sacarosa, trehalosa sola o en combinación de los mismos como agente volumétrico, polisorbato 20 como agente tensioactivo a pH de aproximadamente 5,0.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica liofilizada nueva y estable de Romiplostim que se puede obtener al liofilizar una formulación que comprende Romiplostim a una concentración de 0,5 mg/mL, amortiguador, agente volumétrico, agente tensioactivo; donde el amortiguador es citro-fosfato a una concentración de 9 mM a 11 mM; donde el pH de la formulación está en un intervalo de aproximadamente 4,0-6,0; donde el agente volumétrico es sacarosa a una concentración de 8,0 % a 10,0 %; donde el agente tensioactivo es polisorbato 20 a una concentración de 0,003 % a 0,005 % p/v.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica liofilizada nueva y estable de Romiplostim que se puede obtener al liofilizar una formulación que comprende Romiplostim a una concentración de 0,5 mg/mL, amortiguador, agente volumétrico, agente tensioactivo; donde el amortiguador es citro-fosfato a una concentración de 9 mM a 11 mM; donde el pH de la formulación es 5,0, donde el agente volumétrico es sacarosa a una concentración de 1,0 % a 3,0 % p/v; donde la composición comprende además trehalosa como agente

volumétrico a una concentración de 7,0 % a 9,0 % p/v; donde el agente tensioactivo es polisorbato 20 a una concentración de 0,003 % a 0,005 % p/v.

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 muestra el perfil de CEX-HPLC comparativo de las formulaciones de Romiplostim 1, 2, 3 (tabla 4) y DP genérico en 0D, 3D, 7D y 15D.

10 La figura 2 muestra el perfil de SEC-HPLC comparativo de las formulaciones de Romiplostim 1, 2, 3 (tabla 5) y DP genérico en 0D, 3D, 7D y 15D.

La figura 3 muestra el perfil de CEX-HPLC comparativo de las formulaciones de Romiplostim 4, 5, 6, 7 (tabla 8) y DP genérico en 0D, 3D, 7D y 15D.

15 La figura 4 muestra el perfil de SEC-HPLC comparativo de las formulaciones de Romiplostim 4, 5, 6, 7 (tabla 9) y DP genérico en 0D, 3D, 7D y 15D.

20 La figura 5 muestra el perfil de CEX-HPLC comparativo de las formulaciones de Romiplostim 2, 4, 5, 7, 8 (tabla 11) y DS genérico en 0D, 3D, 7D, 15D y 21D.

La figura 6 muestra el perfil de SEC-HPLC comparativo de las formulaciones de Romiplostim 2, 4, 5, 7, 8 (tabla 12) y DS genérico en 0D, 3D, 7D, 15D y 21D.

25 La figura 7 muestra el perfil de CEX-HPLC comparativo de las formulaciones de Romiplostim 4, 8 (tabla 17) cargadas a 40 °C en 0D, 3D, 7D, 15D y 30D.

La figura 8 muestra el perfil de SEC-HPLC comparativo de las formulaciones de Romiplostim 4, 8 (tabla 18) cargadas a 40 °C en 0D, 3D, 7D, 15D y 30D.

30 Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica liofilizada que comprende una proteína de fusión Fc-péptido, amortiguador, agente volumétrico, estabilizador y agente tensioactivo.

35 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica liofilizada estable y novedosa que comprende Romiplostim (proteína de fusión Fc-péptido), amortiguador, agente volumétrico, estabilizador y agente tensioactivo a un intervalo de pH de 4,0-6,0.

40 Como se usa en este documento, "amortiguador" se refiere a una solución amortiguada que resiste los cambios de pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. El amortiguador se usa en la presente invención para mantener el pH en el intervalo de aproximadamente 4,0 a 6,0, más preferentemente en el intervalo de 4,5 - 5,5 y el amortiguador se selecciona del grupo que consiste en citrato, citro-fosfato, alanina, glicina, arginina, acetato, succinato, histidina ya sea solo o una combinación de los mismos. El sistema amortiguador de la presente invención comprende citro-fosfato.

45 En aun otra realización de la presente invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde el agente volumétrico se selecciona del grupo que consiste en trehalosa, manitol, glicina, sacarosa, dextrano, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, lactosa, sorbitol o xilitol. El agente volumétrico de la presente invención comprende sacarosa, trehalosa ya sea sola o en combinación de los mismos.

50 En aun otra realización de la presente invención, el estabilizador usado se selecciona del grupo que consiste en monosacárido tal como glucosa y manosa; disacáridos tal como sacarosa, trehalosa y maltosa; alcoholes de azúcar tal como manitol y xilitol, polioles tal como glicerol, propilenglicol y polietilenglicol y similares ya sea solos o en combinación de los mismos.

55 En aun otra realización de la presente invención, el agente tensioactivo se usa a fin de evitar la adsorción de la proteína de fusión Fc-péptido en la superficie del vial, ampolla, carpoula, cartucho o jeringa. Los agentes tensioactivos disminuyen la tensión superficial de una solución de proteína, evitando de este modo su adsorción o agregación sobre una superficie hidrófoba. Los agentes tensioactivos preferidos de la presente invención incluyen un agente tensioactivo no iónico basado en polisorbato y un agente tensioactivo no iónico basado en poloxámero
60 o una combinación de los mismos. El agente tensioactivo de la presente invención es polisorbato 20.

65 En aun otra realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica liofilizada estable y nueva de una proteína de fusión Fc-péptido donde la formulación se mantiene a un pH de aproximadamente 4,0 a 6,0, más preferiblemente a pH 4,5 a 5,5, en un sistema amortiguador seleccionado del grupo que consiste en citrato, citro-fosfato, alanina, glicina, arginina, acetato, succinato, histidina sola o una combinación de los mismos.

En aun otra realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica liofilizada, estable y nueva de una proteína de fusión Fc-péptido que abarca Romiplostim como una proteína de fusión Fc-péptido que comprende citrato, citro-fosfato, alanina, arginina como amortiguador solo o en combinación de los mismos, trehalosa, manitol solo o en combinación de los mismos como agente volumétrico, opcionalmente el uso de sacarosa, PEG, glicerol como estabilizador solo o en combinación de los mismos, polisorbato 20 como agente tensioactivo y la formulación se mantiene a pH de aproximadamente 5,0.

En aun otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica liofilizada nueva y estable de amortiguador de Romiplostim, agente volumétrico, estabilizador, agente tensioactivo; donde el amortiguador está a una concentración de 5 mM a 25 mM y donde el pH de la composición está en un intervalo de aproximadamente 4,0-6,0; donde el agente volumétrico está a una concentración de 5,0 % a 15,0 %; donde el estabilizador está a una concentración de 0,1 % a 20 % p/v; donde el agente tensioactivo está a una concentración de 0,004 % a 0,4 % p/v.

La composición farmacéutica liofilizada nueva y termoestable de proteína de fusión Fc-péptido descrita en la presente invención tiene las siguientes ventajas:

1. Implica el uso de un sistema amortiguador seleccionado del grupo que consiste en citrato, citro-fosfato, alanina, glicina, arginina, acetato, succinato e histidina, que mantiene el pH de la formulación entre 4,0 a 6,0, más preferentemente entre 4,5 a 5,5 y también mantiene la pureza de la formulación a temperatura elevada.
2. Implica el uso de agente volumétrico para mantener la estabilidad de la composición durante y después de la liofilización.
3. Implica el uso de agente tensioactivo para evitar la adsorción de la proteína de fusión Fc-péptido en el recipiente.
4. Opcionalmente uso de un estabilizador que proporciona mejor estabilidad.
5. La composición farmacéutica de la presente invención se mantiene a pH entre 4,5 a 5,5 que es crítico para mantener la pureza y estabilidad de la composición a temperaturas elevadas durante el almacenamiento.
6. Implica simplicidad operativa.

El siguiente ejemplo ilustra las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención y los medios para llevar a cabo la invención para obtener una composición farmacéutica liofilizada termoestable que comprende Romiplostim.

Ejemplo 1

a) Selección de amortiguador

Tabla 1: Composición de formulación

Componentes	Ingrediente	Formulación No.								Formulación genérica
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	
Proteína activa	Romiplostim DS	0,50 mg/mL	0,50 mg/mL	0,50 mg/mL	0,50 mg/mL	0,50 mg/mL	0,50 mg/mL	0,50 mg/mL	0,50 mg/mL	0,50 mg/mL
Amortiguador	L-Histidina	--	--	--	--	--	--	--	--	10,3 mM
	Citrato de Na dihidratado	10 mM	10 mM	--	2,2 mM	--	--	10 mM	2,2 mM	--
	Glicina	--	--	10 mM	--	--	--	--	--	--
	Fosfato de sodio monobásico dihidratado	--	--	--	2,5 mM	--	--	--	2,5 mM	--
	fosfato de sodio dibásico dihidratado	--	--	--	2,5 mM	--	--	--	2,5 mM	--
	Citrato monohidratado	--	--	--	2,8 mM	--	--	--	2,8 mM	--

ES 3 002 132 T3

Componentes	Ingrediente	Formulación No.								Formulación genérica
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	
	L-Arginina	--	--	--	--	15 mM	--	--	--	--
	Alanina	--	--	--	--	--	15 mM	--	--	--
Agente volumétrico	Trehalosa dihidratada	10 %	--	--	8%	8 %	6 %	9 %	--	--
	Manitol	--	4%	4 %	--	--	--	--	--	4%
	Sacarosa	--	2%	2 %	2 %	2 %	2 %	--	9%	2 %
Crioprotector/Estabilizador	PEG	--	--	--	--	--	4%	--	--	--
Agentes tensioactivos no iónicos	Polisorbato 20	0,004 %	0,004 %	0,004 %	0,004 %	0,004 %	0,004 %	0,004 %	0,004 %	0,004 %
Vehículo	Agua para inyección	c.s. para 1 mL	c.s. para 1 mL	c.s. para 1 mL	c.s. para 1 mL	c.s. para 1 mL	c.s. para 1 mL	c.s. para 1 mL	c.s. para 1 mL	c.s. para 1 mL
Modificador de pH	10 % p/v de citrato monohidratado	c.s. a pH 5,0	c.s. a pH 5,0	--	--	--	--	c.s. a pH 5,0	--	--
	10 % v/v de HCl	--	--	c.s. a pH 5,0	--	c.s. a pH 5,0	c.s. a pH 5,0	--	--	c.s. a pH 5,0

Método de preparación:

5 La formulación de Romiplostim se preparó en la composición de formulación dada en la tabla anterior al disolver los excipientes en agua para inyección. La concentración de proteína se estableció en 0,5 mg/ mL y el pH de la formulación se estableció en 5,0 similar a la formulación de referencia. 0,75 ml de solución llenada en un vial de 5 ml USP tipo 1 y medio tapado con tapón de goma de bromobutilo. Después de la finalización del ciclo de liofilización, los viales se sellan con sellos "flip-off" y se almacenan a 2 °C – 8 °C. El vial lleno se cargó a 40 °C durante 15 días de estudio de estabilidad al estrés. Durante el estudio de estabilidad, se realizaron las siguientes pruebas:

Tabla 2: Propósito de las pruebas

Pruebas	Propósito de las pruebas
SE-HPLC	Monitorear agregados (impurezas H.M.W.)
CEX HPLC	Monitorear impurezas relacionadas con carga
Potencia	Monitorear el efecto en el bioensayo <i>in vitro</i>
pH	Monitorear el efecto en el pH
Apariencia física	Monitorear la apariencia física

Ejemplo 2

15 Datos de estabilidad al estrés de formulación 1, 2, 3 (Liofilizada):

a) Apariencia física:

20 Se observó que todas las muestras eran torta liofilizada de color blanco a amarillo pálido.

b) Apariencia física después de reconstitución:

25 Se observó que todas las muestras eran claras e incoloras hasta 15 D ST

c) pH

Tabla 3: pH de formulación 1, 2 y 3

Amortiguadores	pH	
Punto de tiempo	0D	15D
Formulación 1	5,04	5,02
Formulación 2	5,07	5,04
Formulación 3	5,05	5,10
DP genérico	5,11	5,13

d) CEX- HPLC

5

Tabla 4: Datos CEX de la formulación 1, 2 y 3

ID de muestra	% de pureza			
	Día 0	3 días	7 días	15 días
Formulación 1	97,3	96,5	95,8	95,8
Formulación 2	97,3	96,0	94,4	93,0
Formulación 3	96,3	94,4	93,6	92,4
DP GENÉRICO	96,3	ND	94,6	94,2

Observación: Con base en los datos de estrés de 15 días, la pureza de la formulación 1, 2 y 3 fue comparable con la formulación de referencia (DP genérico). (Figura 1)

10

e) SEC- HPLC

Tabla 5: Datos SEC de la formulación 1, 2 y 3

ID de muestra	% de pureza			
	Día 0	3 días	7 días	15 días
Formulación 1	99,0	99,1	99,0	99,0
Formulación 2	99,1	99,0	98,7	98,5
Formulación 3	99,1	99,1	99,0	98,8
DP GENÉRICO	99,7	ND	99,6	99,4

15

Observación: Con base en los datos de estrés de 15 días, la pureza de la formulación 1, 2 y 3 fue comparable con la formulación de referencia (DP genérico). (Figura 2)

f) Potencia

20

La actividad biológica de Romiplostim se determina por bioensayo *in vitro* basado en células. El ensayo se basa en la proliferación de megacariocitos en la línea de células UT -7 (leucemia mieloide aguda) que expresa el receptor de TPO. El Romiplostim prolifera específicamente la actividad de la línea de células UT-7 de una manera dependiente de la dosis.

Tabla 6: Datos de % de potencia de la formulación 1, 2 y 3

ID de muestra	% de pureza			
	Día 0	3 días	7 días	15 días
Formulación 1	80	91	83	97
Formulación 2	88	81	104	127
Formulación 3	95	91	113	165
DP GENÉRICO	82	--	114	135

25

Observación: No hay cambios en la potencia a 40 °C después de 15 días en comparación con la inicial en toda la formulación.

Ejemplo 3

a) Apariencia física

5

Se observó que todas las muestras eran torta liofilizada de color blanco a amarillo pálido.

b) Apariencia física después de reconstitución

10

Se observó que todas las muestras eran claras e incoloras hasta 15 D ST

c) pH

Tabla 7: pH de formulación 4, 5, 6 y 7

Amortiguadores	pH	
	0D	15D
Punto de tiempo		
Formulación 4	4,9	5,0
Formulación 5	5,9	6,0
Formulación 6	6,0	6,0
Formulación 7	5,0	5,0
DP genérico	5,1	5,1

15

d) CEX-HPLC

Tabla 8: Datos CEX de la formulación 4, 5, 6 y 7

ID de muestra	% de pureza			
	Día 0	3 días	7 días	15 días
Formulación 4	93,3	93,4	93,4	93,5
Formulación 5	96,1	95,0	94,5	95,1
Formulación 6	89,9	84,4	79,0	77,2
Formulación 7	96,6	96,0	95,4	95,1
DP GENÉRICO	96,3	ND	94,6	94,2

20

Observación: Con base en los datos de estrés de 15 días, la pureza de la formulación 4, 5 y 7 fue comparable con la formulación de referencia (DP genérico). (Figura 3)

e) SEC- HPLC

25

Tabla 9: Datos SEC de la formulación 4, 5, 6 y 7

ID de muestra	% de pureza			
	Día 0	3 días	7 días	15 días
Formulación 4	99,3	99,3	99,2	99,1
Formulación 5	99,3	99,3	99,2	98,8
Formulación 6	98,3	96,1	94,2	92,4
Formulación 7	99,6	99,6	99,5	99,0
DP GENÉRICO	99,7	ND	99,6	99,4

Observación: Con base en los datos de estrés de 15 días, la pureza de la formulación 4, 5 y 7 fue comparable con la formulación de referencia (DP genérico). (Figura 4)

30

f) Potencia

La actividad biológica de Romiplostim se determina por bioensayo *in vitro* basado en células. El ensayo se basa

en la proliferación de megacariocitos en la línea de células UT-7 (leucemia mieloide aguda) que expresa el receptor de TPO. El Romiplostim prolifera específicamente la actividad de la línea de células UT-7 de una manera dependiente de la dosis.

5 Tabla 10: Datos de % de potencia de la formulación 4, 5, 6 y 7

DP % de potencia relativa 15D ST				
ID de muestra	Día 0	3 días	7 días	15 días
Formulación 4	80,0	83,0	91,0	77,0
Formulación 5	106,0	111,0	118,0	--
Formulación 6	91,0	85,0	93,0	86,0
Formulación 7	67,0	93,0	72,0	78,0
DP GENÉRICO	82	ND	114	135

Observación: No hay cambios en la potencia a 40 °C después de 15 días en comparación con la inicial en toda la formulación.

10 **Ejemplo 4**

Formulación de datos de estabilidad acelerada 2, 4, 5, 7 y 8 (estado líquido):

15 a) Apariencia física

Se observó que todas las muestras eran claras e incoloras hasta 21 D AT

b) CEX-HPLC

20 Tabla 11: Datos CEX de la formulación 2, 4, 5, 7 y 8

% de pureza					
ID de muestra	Día 0	3 días	7 días	15 días	21 días
Formulación 2	95,6	96,8	96,4	96,4	96,4
Formulación 4	96,0	96,3	96,0	95,1	94,8
Formulación 5	92,4	89,1	82,9	72,4	58,8
Formulación 7	93,3	88,4	84,5	75,5	68,5
Formulación 8	96,4	96,1	94,2	90,9	90,7
DS genérico	96,1	95,2	93,1	87,8	85,4

Observación: Con base en los datos de estrés de 21 días, la pureza de la formulación 4 y 8 fue comparable con la formulación de referencia (DS genérico). (Figura 5)

25 c) SEC-HPLC

Tabla 12: Datos SEC de la formulación 2, 4, 5, 7 y 8

% de pureza					
ID de muestra	Día 0	3 días	7 días	15 días	21 días
Formulación 2	98,3	99,6	99,6	99,6	99,7
Formulación 4	98,7	99,5	99,5	99,5	99,7
Formulación 5	99,6	99,1	99,2	99,5	99,5
Formulación 7	99,5	99,5	99,6	99,3	99,5
Formulación 8	98,1	99,6	99,5	99,5	99,8
DS genérico	99,2	99,4	99,4	99,3	99,4

Observación: Con base en los datos de estrés de 21 días, la pureza de la formulación 4 y 8 fue comparable con la

formulación de referencia (DS genérico). (Figura 6)

d) Potencia

5 La actividad biológica de Romiplostim se determina por bioensayo *in vitro* basado en células. El ensayo se basa en la proliferación de megacarocitos en la línea de células UT-7 (leucemia mieloide aguda) que expresa el receptor de TPO. El Romiplostim prolifera específicamente la actividad de la línea de células UT-7 de una manera dependiente de la dosis.

10 Tabla 13: Datos de % de potencia de la formulación 2, 4, 5, 7 y 8

ID de muestra	% de potencia relativa				
	Día 0	3 días	7 días	15 días	21 días
Formulación 2	100	98	119	111	88
Formulación 4	103	114	100	103	86
Formulación 5	89	72	81	70	71
Formulación 7	87	103	87	78	81
Formulación 8	118	97	100	109	89
DP genérico	115	115	118	125	117

Observación: No hay cambios en la potencia a 40 °C después de 21 días en comparación con la inicial en todas las formulaciones.

15 **Ejemplo 5**

Justificación: Con base en los datos anteriores, los tres amortiguadores muestran una buena capacidad de amortiguación y un perfil de termoestabilidad. Para confirmar los resultados obtenidos durante el examen inicial, se llevó a cabo otro conjunto de estudios de estabilidad con las formulaciones 4 y 8.

20 Tabla 14: Condición de estudio y puntos de tiempo para formulación 4 y 8

No. de serie	Condición	Temperatura	Puntos de tiempo
1	Estrés	40°C ± 2°C	0D, 3D, 7D, 15D y 30D

Método de preparación:

25 La formulación de Romiplostim se preparó en la composición de formulación dada en la tabla 1 al disolver los excipientes en agua para inyección. La concentración de proteína se estableció en 0,5 mg/ mL y el pH de la formulación se establece en 5,0 similar a la formulación de referencia. 0,75 ml de solución llenada en un vial de 5 ml USP tipo 1 y medio tapado con tapón de goma de bromobutilo. Después de la finalización del ciclo de liofilización, los viales se sellan con sellos "flip-off" y se almacenan a 2 °C – 8 °C. El vial lleno se cargó a 40 °C durante 30 días de estudio de estabilidad al estrés. Durante el estudio de estabilidad, se realizaron las siguientes pruebas:

30 Tabla 15: Propósito de las pruebas

Pruebas	Propósito de las pruebas
SE-HPLC	Monitorear agregados (impurezas H.M.W.)
CEX HPLC	Monitorear impurezas relacionadas con carga
Potencia	Monitorear el efecto en el bioensayo <i>in vitro</i>
pH	Monitorear el efecto en el pH
Apariencia física	Monitorear la apariencia física

35 a) Apariencia física

Se observó que todas las muestras eran torta liofilizada de color blanco a amarillo pálido hasta 28 D ST.

40 b) Apariencia física después de reconstitución

ES 3 002 132 T3

Se observó que todas las muestras eran claras e incoloras hasta 28 D ST.

c) pH

5

Tabla 16: Datos de pH de la formulación 4 y 8

Amortiguadores	pH				
Punto de tiempo	0D	3D	7D	15D	30D
Formulación 4	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Formulación 8	5,1	5,1	5,1	5,0	5,0

d) CEX-HPLC

Tabla 17: Datos CEX de amortiguadores de formulación 4 y 8

ID de muestra	% de pureza				
	Día 0	3 días	7 días	15 días	30 días
Formulación 4	94,5	96,6	96,0	95,9	95,0
Formulación 8	94,3	94,4	94,2	93,9	94,2

10

Observación: Las formulaciones 4 y 8 muestran una buena estabilidad y son comparables (figura 7).

e) SEC-HPLC

15

Tabla 18: Datos SEC de amortiguadores de formulación 4 y 8

ID de muestra	% de pureza				
	0 día	3 días	7 días	15 días	30 días
Formulación 4	99,2	99,5	99,5	99,5	99,4
Formulación 8	99,6	99,6	99,6	99,6	99,5

Observación: La formulación 4 y 8 muestran una buena estabilidad y son comparables en el perfil SEC (figura 8).

f) Potencia

20

Tabla 19: Datos de % de potencia de amortiguadores de formulación 4 y 8

ID de muestra	% de potencia relativa (por ensayo basado en células)				
	Día 0	3 días	7 días	15 días	30 días
Formulación 4	95	82	99	93	103
Formulación 8	99	93	96	109	106

Observación: No hay cambios en la potencia a 40 °C después de 30 días en comparación con la inicial en todas las formulaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica liofilizada de Romiplostim que se puede obtener al liofilizar una formulación que comprende Romiplostim a una concentración de 0,1 mg/mL a 1,0 mg/mL, citro-fosfato como amortiguador, sacarosa como agente volumétrico y polisorbato 20 a pH 5,0.
- 10 2. Una composición farmacéutica liofilizada como se reivindica en la reivindicación 1, donde la formulación comprende
- a) 0,5 mg/mL de Romiplostim
 - b) amortiguador de citrofosfato 9 mM -11 mM
 - c) 8,0 % p/v - 10 % p/v de sacarosa
 - d) 0,003 % p/v - 0,005 % p/v de polisorbato 20.
- 15 3. Una composición farmacéutica liofilizada de Romiplostim como se reivindica en la reivindicación 1, donde la formulación comprende además trehalosa como agente volumétrico.
- 20 4. Una composición farmacéutica liofilizada como se reivindica en la reivindicación 3, donde la formulación comprende
- a) 0,5 mg/mL de Romiplostim
 - b) amortiguador de citrofosfato 9 mM - 11 mM
 - c) 7,0 % p/v - 9,0 % p/v de trehalosa
 - d) 1,0 % p/v - 3,0 % p/v de sacarosa
 - 25 e) 0,003 % - 0,005 % p/v de polisorbato 20.

DIBUJOS

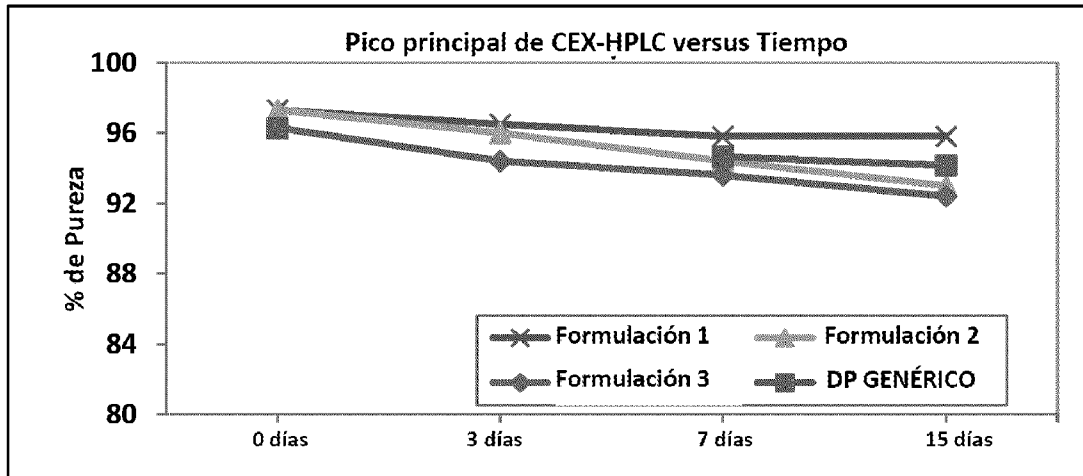


Figura 1: Análisis de tendencia CEX de formulación 1,2 y 3

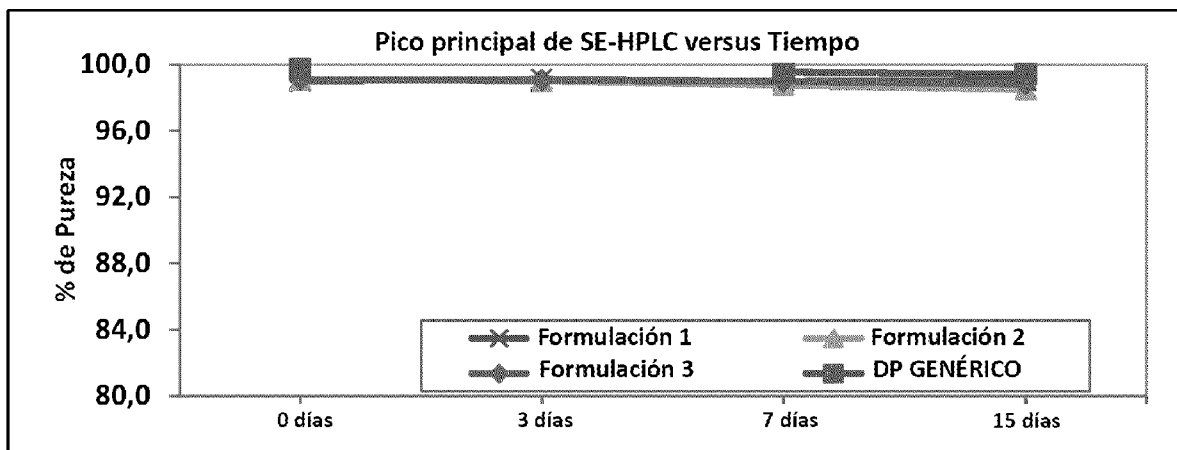


Figura 2: Análisis de tendencia SEC de formulación 1,2 y 3

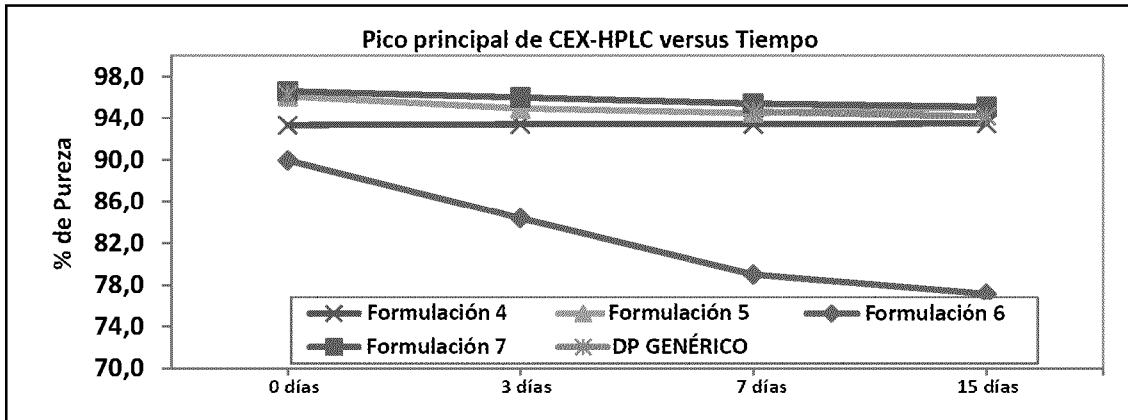


Figura 3: Análisis de tendencia CEX de formulación 4,5,6 y 7

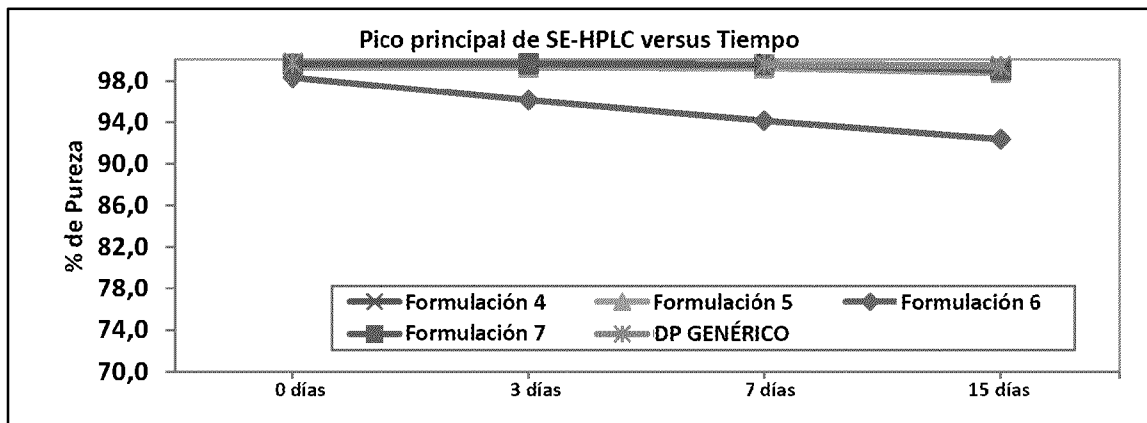


Figura 4: Análisis de tendencia SEC de formulación 4,5,6 y 7

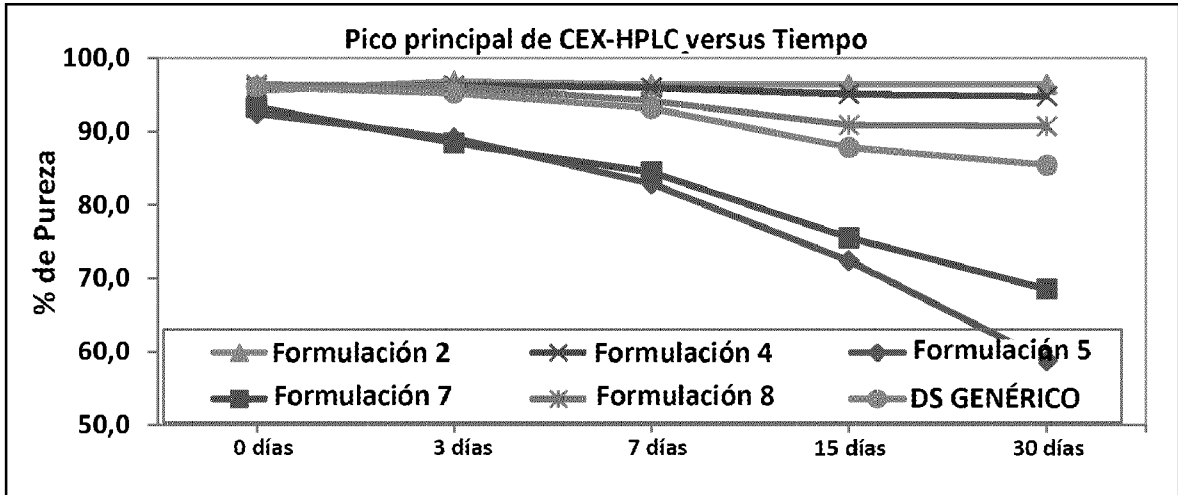


Figura 5: Análisis de tendencia CEX de formulación 2,4,5,7 y 8

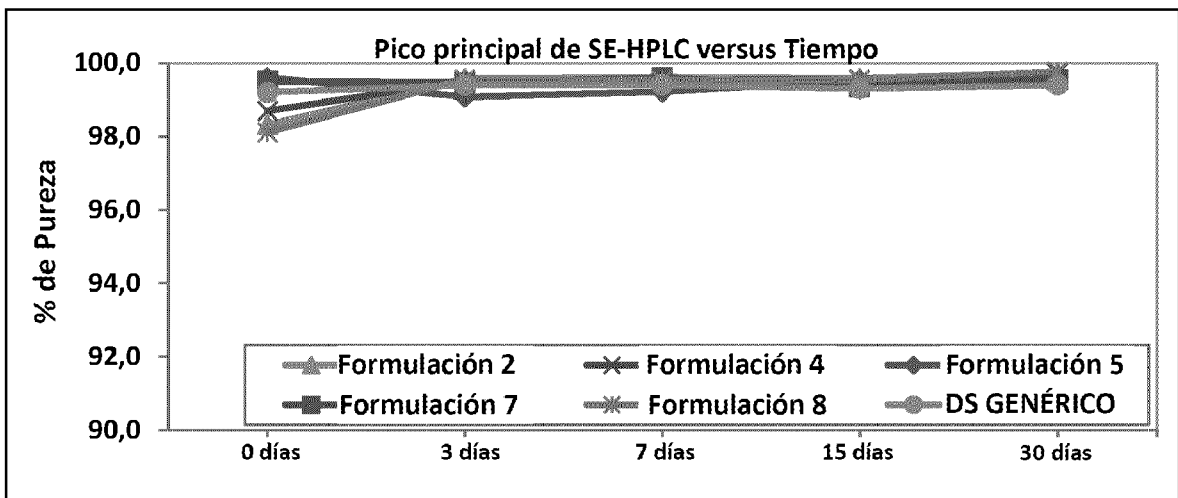


Figura 6: Análisis de tendencia SEC de formulación 2,4,5,7 y 8

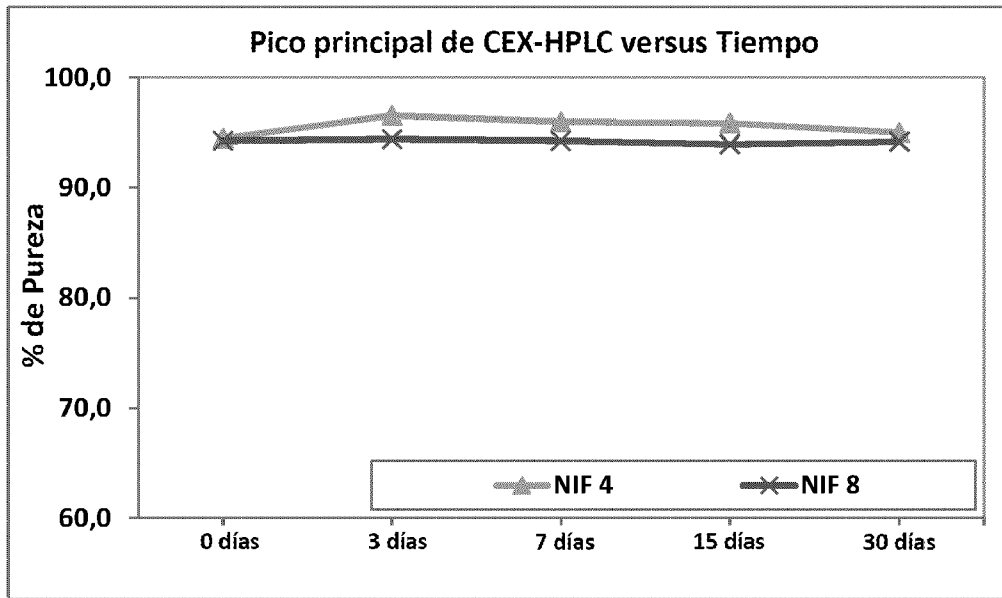


Figura 7: Análisis de tendencia CEX formulación 4 y 8 cargada a 40 °C

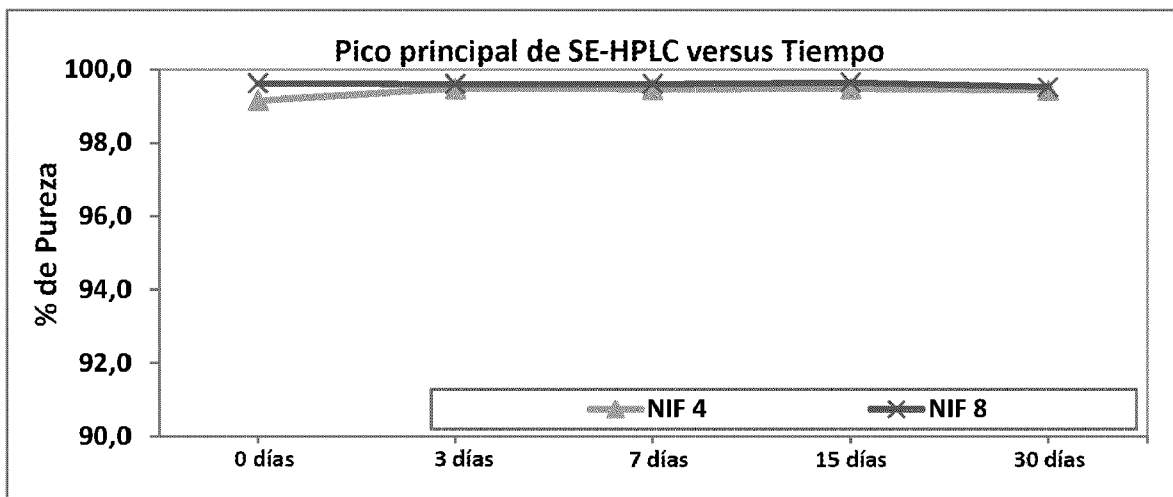


Figura 8: Análisis de tendencia SEC formulación 4 y 8 cargada a 40 °C