



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 166**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02807598 .4**

86 Fecha de presentación : **08.11.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1536822**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Composición farmacéutica estable que comprende eritropoyetina.**

30 Prioridad: **17.07.2002 SI 200200176 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **LEK Pharmaceuticals d.d.**
Verovskova 57
1526 Ljubljana, SI

72 Inventor/es: **Vukmirovic, Andreja;**
Rozman, Tanja;
Svetek, Jelka y
Paris, Alenka

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 268 166 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 estable que comprende eritropoyetina.

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con una nueva composición farmacéutica estable que comprende eritropoyetina (EPO).

10 La EPO es una hormona glicoproteínica que regula la formación de eritrocitos en mamíferos. Actúa como un factor de crecimiento y/o diferencial para las células eritroides progenitoras en médula ósea y causa su proliferación y diferenciación como eritrocitos.

Antecedentes de la invención

15 EPO humana de origen natural producida por el riñón es el factor humoral de plasma que estimula la producción de glóbulos rojos de la sangre. Estimula la división y diferenciación de los progenitores eritroides comprometidos en la médula ósea. (Goldwasser *et al.*, J. Biol. Chem., 249, 4202-4211, 1974, Sherwood *et al.*, Endocrinology, 103, 866-870, 1978). Es producida en los riñones de adultos (Sherwood *et al.*, Endocrinology, 103, 866-870, 1978) y en hígado fetal (Zanjani *et al.*, J. Lab. Clin. Med., 89, 640-644, 1977).

20 La administración de una composición farmacéutica de EPO al organismo estimula y/o acelera la producción de eritrocitos. La composición farmacéutica de EPO se usa en el tratamiento de fallo renal crónico, anemia secundaria al tratamiento quimioterapéutico del cáncer y anemia asociada con el tratamiento con zidovudina de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana, y en el tratamiento de otras clases de anemias (Danna *et al.*, Eritropoyetine in Clinical Applications - An International Perspective. New York, NY: Marcel Dekker; 301-324, 1990; Eschbach *et al.*, N. England J. de Med., 316, 2, 73-78, 1987; Krane, Henry Ford Hosp. Med. J., 31, 3, 177-181, 1983).

30 La EPO recombinante, que es el producto de expresión del gen humano de la EPO en células de mamíferos, se usa en composiciones farmacéuticas de EPO (EP 148605, EP 205564, EP 255231). También algunos análogos y derivados de EPO están descritos en la técnica: EP 640619, EP 668351, WO 9412650, EP 1064951, WO 0232957, WO 9533057, US 5916773, WO 09902710, US 5580853, US 5747446, US 5919758 y US 6107272.

35 Composiciones farmacéuticas de EPO, que comprenden la albúmina de suero humano, se describen en: EP 178665, EP 178576, US 5661125, WO 0061169. La albúmina de suero humano puede causar reacciones alérgicas (Stafford *et al.*, Ann Allergy, 61(2), 85-88, 1988). Además, existe un riesgo de infección con virus cuando una composición farmacéutica comprende productos de sangre humana. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas de EPO que son estables y que están libres de productos de sangre humana, tales como la albúmina, son una necesidad.

40 EP 306824, EP 607156, EP 528313 y EP 528314 describen que se usa urea como un agente estabilizante de EPO.

EP 306824, EP 178665, GB 2171304, EP 528314, EP 528313 y EP 1002547 describen formulaciones liofilizadas de EPO.

45 US 5376632 describe una formulación farmacéutica, en la cual se usan las ciclodextrinas alfa y beta.

EP 607156, EP 528313 en EP 178665 describen composiciones farmacéuticas acuosas de EPO, las cuales comprenden preservativos tales como benzil alcohol, parabenos, fenoles, y mezclas de los mismos.

50 EP 909564, EP 528314, EP 430200 y WO 0061169 describen el uso de aminoácidos y/o la combinación de aminoácidos y detergentes no iónicos como agentes estabilizantes.

WO 0187329 describe diferentes composiciones farmacéuticas de análogos de EPO pegilados. Las composiciones farmacéuticas descritas se basan esencialmente en el uso de regulador sulfato.

55 Composiciones farmacéuticas de EPO descritas en: RU 2128517, WO 0061169, EP 528313, EP 607156, EP 528314, EP 178665, se preparan en regulador de citrato.

Resumen de la invención

60 El objeto de la invención es proveer una composición farmacéutica que comprende EPO el cual es capaz de estabilizar beneficiosamente la EPO.

65 La presente invención provee una nueva composición farmacéutica estable que comprende EPO de acuerdo con la reivindicación 1. Se definen modalidades preferidas en las sub-reivindicaciones. La presente invención también provee un uso de acuerdo con la reivindicación 16, un proceso de acuerdo con la reivindicación 17, y un uso de acuerdo con la reivindicación 18.

La composición farmacéutica es formulada con un sistema regulador de pH farmacéuticamente aceptable y con povidona (polivinilpirrolidona; PVP) que actúa como agente estabilizante. La estabilización de la EPO se alcanza cuando la composición de la invención está preferiblemente libre de aditivos que se derivan de origen humano o animal diferentes a la EPO (e.g., proteínas de suero). La composición farmacéutica opcionalmente comprende un agente isotonificante y/o uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica de la presente invención es adecuada para su uso en medicina humana y veterinaria y es farmacéuticamente aceptable en una forma de administración adecuada, especialmente para aplicación parenteral, e.g. intramuscular, subcutánea y/o aplicación intravenosa. En una modalidad particularmente preferida, la composición farmacéutica de la presente invención está en una forma líquida, más preferiblemente en una forma acuosa.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el análisis SDS-PAGE de muestras de la invención y de referencia que comprende EPO después de haber estado almacenada a 40°C (2°C) por 1 mes.

La Figura 2 muestra el análisis SDS-PAGE de muestras de referencia que comprenden EPO cuando se almacenan en el refrigerador por 1 mes en comparación habiendo estado en almacenamiento a 40°C (2°C) por 1 mes.

La Figura 3 muestra el análisis SDS-PAGE de las muestras de la invención y de referencia que comprenden EPO cuando se almacena en el refrigerador por 1 mes en comparación habiendo estado en almacenamiento a 40°C (2°C) por 1 mes.

La Figura 4 muestra el análisis SDS-PAGE de muestras de la invención y de referencia que comprenden EPO cuando se almacena en el refrigerador por 10 semanas.

La Figura 5 muestra el análisis SDS-PAGE de muestras de la invención y de referencia que comprenden EPO almacenadas a 25°C (2°C) por 10 semanas.

La Figura 6 muestra la respuesta relativa EPO-ELISA (en %) de muestras de la invención y de referencia cuando han estado en almacenamiento a 40°C (2°C) por 1 mes (40) frente a las respectivas muestras cuando se almacenan en el refrigerador por 1 mes (HL).

La Figura 7 muestra la respuesta relativa EPO-ELISA (en %) de muestras de la invención y de referencia que comprenden EPO cuando han estado en almacenamiento a 25°C (2°C) por 10 semanas (25) frente a las respectivas muestras cuando se almacenan en el refrigerador por 10 semanas (HL).

Descripción de la invención y de modalidades preferidas

Se encontró sorprendentemente que una composición farmacéutica que comprende PVP, y que está preferiblemente libre de aditivos diferentes a EPO derivada de origen humano y/o animal, estabiliza beneficiosamente la EPO.

La presente invención provee una composición farmacéutica de EPO que consiste de:

- a. una cantidad terapéuticamente efectiva de EPO,
- b. un sistema regulador de pH farmacéuticamente aceptable, y
- c. PVP.

La presente invención también provee la composición farmacéutica de EPO que de manera opcional comprende adicionalmente, además de los componentes a-c: - a poloxámero de un agente isotonificante y/o

e. uno o más de otros excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados entre polioles, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, macrogol ésteres y éteres, glicol y glicerol ésteres, aminoácidos.

La composición de la invención está preferiblemente libre de aditivos derivados de origen humano o animal. El término “eritropoyetina (EPO)” se refiere a una proteína con la actividad biológica in vivo de hacer que las células de médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos sanguíneos y se selecciona del grupo que consiste de EPO humana y derivados y análogos que se definen más adelante.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva de EPO” se refiere a la cantidad de EPO que posibilita un efecto terapéutico de la EPO.

El término “estabilizador” se refiere a un excipiente farmacéuticamente aceptable, que tiene un agente estabilizador que tiene un efecto estabilizante sobre la EPO.

El término “estabilidad de la EPO” se refiere al mantenimiento del contenido de la actividad biológica de la EPO. La estabilidad de la EPO puede ser influida, inter alia, por los siguientes procesos: adsorción de EPO sobre las paredes

del contenedor, desnaturalización o degradación de la EPO y formación de agregados de, e. g. dímeros de EPO y/o multímeros de EPO y/o moléculas similares con peso molecular más alto. Los procesos ocurren debido a la exposición de las muestras frente a diferentes condiciones, por ejemplo, temperatura más alta, recipientes inapropiados, uso de estabilizantes equivocados de la EPO, rayos solares, formas inapropiadas de almacenamiento y/o procedimientos de aislamiento inapropiados.

El término “libre de aditivos derivados de origen humano y/o animal” se refiere a la condición de que los aditivos que se originan a partir de humanos y/o animales y que son diferentes de la EPO, tales como albúminas de suero como HSA o BSA, no se añadan intencionalmente a la composición, o si están presentes originalmente en una preparación de EPO hayan sido separados o reducidos durante la purificación y/o aislamiento de la EPO hasta un nivel inevitable de trazas, preferiblemente hasta un nivel que sea típicamente indetectable por los métodos analíticos estándar.

Se ha encontrado sorprendentemente que al formular la EPO en la composición de la invención se mejora su estabilidad a temperaturas por encima de la temperatura de refrigerador (e.g. 2-8°C), especialmente a temperatura ambiente (i.e. por debajo de 25°C) y aun a temperaturas mayores (e.g. 40°C). Esto significa que la composición puede ser almacenada sin enfriamiento durante un periodo de tiempo prolongado (más de 10 semanas a temperatura ambiente) sin perder cantidades de actividad significativas y sin degradación significativa.

En la composición farmacéutica de la presente invención, además del sistema de regulación del pH, puede usarse opcionalmente además un agente isotónico y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable PVP adicional solo como estabilizante efectivo de la EPO y no son necesarios estabilizantes adicionales para estabilizar la EPO. La PVP puede reemplazar entonces las combinaciones de diferente estabilizantes que se sabe que se usan para mantener la estabilidad de la EPO en composiciones farmacéuticas de EPO descritas en la técnica anterior. La preparación de una composición farmacéutica que comprende sólo un estabilizante efectivo en vez de dos o más estabilizantes es mejor desde el punto de vista económico. La preparación se lleva a cabo con mayor facilidad, los gastos son más bajos, la preparación consume menos tiempo y el paciente recibe menos aditivos en el organismo. Aunque no esté restringida de esta manera, la composición farmacéutica de la presente invención puede por lo tanto consistir preferiblemente solo de los constituyentes antes mencionados a.-c., u opcionalmente a.-d., a.-c. más e. o a.-e.

En algunas composiciones farmacéuticas conocidas por la técnica anterior los detergentes no iónicos tales como el Polisorbato 80 se usan como estabilizantes de EPO. El uso de PVP es ventajoso frente al uso de polisorbatos porque la filtración por gel puede ser usada como método analítico para la determinación de dímeros de EPO, multímeros de EPO y sustancias relacionadas con masa molecular mayor que pueden resultar de la agregación de moléculas de EPO. Los polisorbatos son eluidos al mismo tiempo que los dímeros de EPO. Por lo tanto, la filtración por gel no puede ser utilizada como método de detección para dímeros de EPO para las composiciones que comprenden polisorbatos. El uso de PVP por lo tanto contribuye a una manera más fácil de proveer estabilidad a la EPO, hasta una seguridad incrementada y un control más fácil de la calidad de la composición farmacéutica de EPO.

La composición farmacéutica de la presente invención es preferiblemente un líquido y particularmente una composición farmacéutica acuosa. Tal composición líquida puede ser usada directamente para aplicación parenteral tal como aplicación subcutánea, intravenosa o intramuscular sin reconstitución, dilución o etapas adicionales de preparación que puedan llevar a disminución a aun a pérdida de actividad biológica de la EPO, y también puede contribuir a evitar problemas técnicos adicionales que se presentan en el momento de la aplicación. El uso de una composición farmacéutica líquida es por tanto más práctico que el uso de formulaciones liofilizadas. Formulaciones líquidas y particularmente acuosas de EPO son preferidas en general sobre una formulación liofilizada para preparar la formulación clínica de EPO, porque el proceso de reconstitución de las composiciones liofilizadas consume tiempo, plantea riesgos de manejo inapropiado de la formulación proteínica, o puede ser reconstituida inapropiadamente, y ciertos aditivos tales como estabilizantes se requieren usualmente para retener actividad suficiente del fármaco.

La composición farmacéutica de la presente invención es lo más preferiblemente libre de aditivos derivados de origen humano o animal tales como proteínas de suero humano, las cuales, a pesar de la purificación de la sangre, plantean un riesgo de infección con un agente transmisible. Además, aunque la EPO recombinante es en general bien tolerada, se han observado excoiraciones de la piel y urticaria ocasionales que sugieren una hipersensibilidad alérgica a alguno de los componentes de la formulación de EPO, probablemente albúmina de suero humano.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser preparada adecuadamente en solución isotónica y se espera que sea farmacéuticamente aceptable y no cause efectos colaterales tales como hipersensibilidad alérgica.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser usada para todas las formas de EPO, que comprenden EPO alfa, EPO beta, EPO omega y otras preparaciones de EPO que tienen perfiles de isoforma diferentes, así como para isoformas específicas de EPO, EPO muteínas, EPO fragmentos, EPO análogos tales como dímeros de EPO, NESP (análogo hiperglicosilado de EPO humana recombinante), EPO activado por genes, EPO pegilado, moléculas híbridas don EPO, fragmentos de EPO, proteínas de fusión (oligómeros y multímeros) con EPO, EPO con perfiles modificados de glicosilación con independencia de la actividad biológica de EPO y adicionalmente con independencia del método de síntesis o manufactura del mismo, método que puede incluir pero no está limitado al aislamiento de EPO de presencia natural y EPO recombinante bien producidos a partir de cADN o AND genómico, métodos sintéticos, transgénicos y activados por genes.

ES 2 268 166 T3

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender de 500 a 100000 unidades o más de EPO por dosis (1 IU corresponde hasta aproximadamente 10 nanogramos de EPO recombinante), preferiblemente desde 1000 a 40000 IU por dosis. En general, se contempla que una cantidad efectiva será desde 1 a 500 IU/kg de peso corporal y más preferiblemente de 50 a 300 IU/kg de peso corporal, especialmente cuando la EPO se da de forma subcutánea. La cantidad efectiva dependerá adicionalmente de la especie y tamaño del sujeto que está siendo tratado, la condición o enfermedad particular que está siendo tratada y su severidad y la ruta de administración. En modalidades preferidas, la cantidad farmacéutica es formulada para proveer una cantidad por dosis seleccionada entre el grupo que consiste de aproximadamente 1000 IU, aproximadamente 2000IU, aproximadamente 3000 IU, aproximadamente 4000 IU, aproximadamente 10000 IU, aproximadamente 20000 IU, aproximadamente 25000 IU y aproximadamente 40000 IU.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser llenada en ampollas, jeringas de inyección y viales. Esto permite la aplicación en volúmenes en el rango adecuado de 0.2 a 20 ml por dosis.

El rango de pH preferido para las soluciones es de aproximadamente 6 y hasta aproximadamente 8 con un rango de aproximadamente 6.8 hasta aproximadamente 7.5 como más preferido y a pH de aproximadamente 7.0 como el más preferido. Se prefiere el uso de un sistema regulador de fosfato, especialmente fosfato de sodio dibásico y fosfato de sodio monobásico tal como $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Otros sistemas de regulación adecuados para mantener el rango de pH deseado de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8 incluyen, pero no se limitan a, citrato de sodio/ácido cítrico, acetato de sodio/ácido acético y otros agentes reguladores del pH farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica. El regulador de citrato puede causar dolor en el sitio de la inyección. Por lo tanto, el regulador de fosfato es más preferible para la aplicación parenteral.

La concentración de sistema regulador, especialmente el regulador de fosfato, depende del pH deseado de la formulación. La concentración preferida está en el rango de desde 10 a 50 mM, más preferida desde 15 a 35 mM, lo más preferida desde 15 a 25 mM. Puede añadirse un agente de ajuste del pH tal como, pero no limitándose a, HCl, NaOH, ácido cítrico o citrato de sodio.

La composición farmacéutica de la presente invención comprende PVP como un estabilizante de EPO. En el sentido de la presente invención, la PVP se representa por la forma normal de poli[1-(2-oxo-1-pirrolidinil)etileno] también conocido como povidona o polivinilpirrolidona. El uso de PVP de bajo peso molecular, en particular PVP K12 a K18, es preferido, y el uso de PVP K12 es lo más preferido. El contenido de PVP en la composición de la invención debería proveer un efecto estabilizante sobre la EPO, adecuadamente en una cantidad de al menos 0.001% (p/v). La concentración de PVP está preferiblemente en el rango de aproximadamente 0.01% hasta aproximadamente 5.0%, más preferiblemente de 0.1 a 1.0%, lo más preferido a aproximadamente 0.5% (p/v).

La composición farmacéutica de la presente invención opcionalmente comprende además un agente capaz de hacer que las formulaciones de la presente invención sean isoosmóticas con la sangre humana. Agentes isotonicantes adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, agentes seleccionados entre el grupo que consiste de sales inorgánicas tales como NaCl, CaCl_2 , manitol, glicina, glucosa y sorbitol. El uso de NaCl como un agente isotonicante preferido en las formulaciones de la presente invención.

Aunque la formulación con PVP como único agente estabilizante es preferida como se mencionó antes, la composición farmacéutica de la presente invención puede opcionalmente comprender más de un tipo de estabilizante además de los compuestos antes mencionados a., b. y opcionalmente d. y e., si se desea. Este estabilizante adicional se selecciona preferiblemente del grupo de surfactantes que comprende derivados del sorbitan/polisorbatos tales como e.g. polisorbato 20, polisorbato 80, y poloxámeros tales como Pluronic 68. Entre ellos, se prefiere particularmente el Pluronic F68 y se usa adecuadamente en la concentración de aproximadamente 1% o menos de 1%, más preferiblemente en la concentración de 0.05 a 0.2%. La composición farmacéutica de la presente invención puede opcionalmente comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables incluyen polioles seleccionados entre el grupo de manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, macrogol ésteres y éteres, glicol y glicerol ésteres, aminoácidos tales como glicina, L-isoleucina, L-leucina, L-ácido glutámico, L-2-fenilalanina, L-treonina. La composición de la presente invención puede ser usada para la preparación de medicamentos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades que están indicadas para la EPO. Ejemplos de usos médicos incluyen una variedad de terapias donde se desea la estimulación de la proliferación de células de glóbulos rojos sanguíneos (RCB), donde existe una deficiencia hormonal endógena, donde se pierde sangre cuando un paciente tiene indicios de anemia, o tiene hipo-respuesta de la médula ósea a la hormona endógena. Estas indicaciones médicas son, por ejemplo, anemia de enfermedad maligna (por ejemplo, cualquier tipo de cáncer sólido o cáncer hematológico, incluyendo leucemia, linfoma y mieloma múltiple), anemia resultante de un tratamiento por radiación o quimioterapéutico de una enfermedad maligna, anemia de enfermedad crónica, por ejemplo enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide y hepatitis, anemia en pacientes de SIDA, especialmente los tratados con AZT, anemia por prematuria, anemia asociada con fallo renal (crónico), anemia de talasemia, anemia hemolítica autoinmune, anemia aplásica y anemia asociada con cirugías (por ejemplo, para mejorar la donación de sangre preoperatorio para autotransfusión para estimular e incrementar los niveles de hemoglobina para contrarrestar pérdidas sustanciales de sangre o para incrementar la eritropoyesis en sujetos que sufren trasplante de médula ósea), el tratamiento de fatiga, dolor, fallo cardíaco crónico, disritmia o demencia, preoperatoriamente usada para reducir la necesidad de transfusión sanguínea alogénica en cirugía no vascular y no cardíaca y otras indicaciones indicadas para la EPO.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención sin, sin embargo, limitar la misma a ellos.

Ejemplos

5 Métodos analíticos

Se usaron los siguientes métodos analíticos para el análisis de la composición farmacéutica de la presente invención: SDS-PAGE con inmunodetección, cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), EPO-ELISA y ensayo de la actividad biológica *in vivo* en ratones.

10 SDS-PAGE con inmunodetección: Las muestras de carga fueron preparadas en el regulador de carga de agente reductor. Se usó SDS-PAGE vertical: gel NuPAGE Bis-Tris 12%, 8 x 8 cm, espesor 1.0 mm, 15 carriles (Invitrogen) en regulador de electroforesis MOPS SDS (Invitrogen). La electroforesis corrió por una hora a voltaje constante de 200 V. Después de la electrotransferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa la inmunodetección fue ejecutada en
15 dos etapas. En la primera, se usaron los anticuerpos primarios (anti-huEPO, ratón, monoclonal). En la segunda etapa se usaron los anticuerpos secundarios (IgG anti-ratón, conejo, policlonal) conjugados con peroxidasa de rábano. La adición del sustrato de peroxidasa dispara la reacción enzimática para formar un complejo coloreado de azul.

EPO-ELISA: Sistema EPO-ELISA Quantikine IVD, R&D Systems, basada en el método de intercalación en doble
20 anticuerpo. Los pozos de la microplaca, precubiertos con anticuerpo monoclonal específico (murina) para la EPO son incubados en espécimen o en estándar. La EPO se enlaza al anticuerpo inmovilizado en la placa. Después de remover el espécimen o el estándar, los pozos son incubados con un anticuerpo anti-EPO policlonal (conejo) conjugado con peroxidasa de rábano. Durante la segunda incubación, el conjugado anticuerpo-enzima se enlaza a la EPO inmovilizada. Se añade un cromógeno a los pozos y se oxida por la reacción enzimática para formar un complejo coloreado
25 de azul. La cantidad de color generada es directamente proporcional a la cantidad de conjugado enlazada al complejo EPO anticuerpo, la cual, a su vez, es directamente proporcional a la cantidad de EPO en el espécimen o estándar.

SEC: SEC se usó para determinar la proporción de dímeros de EPO y sustancias relacionadas de más alto peso molecular en las muestras de FP1 a FP8 con contenido de EPO de 2000 IU/ml a 10000 IU/ml. Se usó el ensayo límite
30 siguiendo los protocolos de la European Pharmacopoeia (European Pharmacopoeia 2002, 4th edition, Eritropoyetina concentrated solution).

Actividad biológica *in vivo*

35 Se usó el protocolo para la determinación en vivo de actividad biológica en ratones hipóxicos descrito en Eur. Ph: La estimación de la actividad biológica se ejecutó también bajo los protocolos de Eur. Ph (Eur. Pharmacopoeia - 1997; Statistical Analysis of Results of Biological Assays and Tests; The parallel-line model). Bajo las demandas de Eur. Ph el valor estimado de actividad biológica debería estar en el rango de entre 80% y 120% de la actividad marcada. El objetivo del método es alcanzar el rango entre 80% y 120% con respecto al contenido (valor) de la EPO inyectada
40 (10000 IU/ml) y los resultados obtenidos representan la estimación de la actividad biológica y no su valor preciso. El límite de confiabilidad debería estar en el rango de entre 64% y 156% de la actividad marcada.

Las condiciones para probar la estabilidad de las composiciones farmacéuticas de EPO

45	HL de referencia	2 a 8°C, refrigerador
	40	40°C 2°C, 75% 5% humedad relativa, cámara climática
	25	25°C 2°C, 60% 5% humedad relativa, cámara climática

50 Ejemplo 1

Pruebas de estabilidad

Se prepararon las siguientes composiciones de las formulaciones FP1 a FP8:

55 FP1: polisorbato 80 (0.03% (peso/_volumen (p/v))), glicina (0.5% (p/v)), fosfato regulador 20 (mmol/l), NaCl (100mmol/l)

FP2: glicina (0.5% (p/v)), glicerol (1.4% (p/v)), fosfato regulador (32 mmol/l)

60 FP3: glicina (0.5% (p/v)), Pluronic F68 (0.1% (p/v)), fosfato regulador (20 mmol/l), NaCl (90.6 mmol/l)

FP4: sorbitol (4.5% (p/v)), Pluronic F68 (0.1% (p/v)), fosfato regulador (20 mmol/l)

65 FP5: dextran 70 (1% (p/v)), NaCl (123 mmol/l), fosfato regulador (20 mmol/l)

FP6: glicerol (2% (p/v)), Pluronic F 68 (0.1% (p/v)), NaCl (17.1 mmol/l) fosfato regulador (20 mmol/l)

ES 2 268 166 T3

FP7: glicerol (2% (p/v)), PVP K12 (0.5% (p/v)), fosfato regulador (20 mmol/l).

FP8: PVP K12 (0.5% (p/v)), NaCl (123 mmol/l), fosfato regulador (20 mmol/l). El contenido EPO en las formulaciones se fija en 2000 IU/ml o 10000 IU/ml, como se describe más abajo.

Muestras de FP1 a FP8, con un contenido respectivo de 10000 IU/ml, estuvieron en almacenamiento a 40°C (2°C) por 1 mes (40). EPO en volumen en regulador de fosfato en almacenamiento a 40°C (2°C) por 1 mes fue tomada como control positivo (PK) para la determinación del contenido de dímeros de EPO. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE; 0.4 Pg fueron cargados en cada carril. La Figura 1 muestra los resultados.

Leyenda de la Figura 1:

Carril	Muestra
1	carril vacío
2	SDS-PAGE MW estándares preteñidos, rango bajo, Bio-Rad, 4 Pl de carga
3	carril vacío
4	EPO-BRP (EPO estándar de European Pharmacopoeia)
5	FP 1 40
6	FP2 40
7	FP3 40
8	FP4 40
9	FP5 40
10	FP6 40
11	FP7 40
12	FP8 40
13	PK
14	carril vacío
15	SDS-PAGE MW estándares preteñidos, rango bajo, Bio-Rad, 4 Pl de carga

La Figura 2 muestra la SDS-PAGE de las muestras de FP1 a FP4, con un contenido respectivo de EPO de 10000 IU/ml, almacenada en el refrigerador (HL) y en almacenamiento a 40°C (2°C) 1 mes (40). EPO en volumen en regulador de fosfato en almacenamiento a 40°C (2°C) 1 mes fue tomada como control positivo (PK) para la determinación del contenido de dímeros de EPO. 0.4 Pg fueron cargados en cada carril.

Leyenda de Figura 2:

Carril	Muestra
1	carril vacío
2	SDS-PAGE MW estándares preteñidos, rango bajo, Bio-Rad, 4 Pl de carga
3	carril vacío
4	EPO-BRP (EPO estándar de European Pharmacopoeia)
5	FP 1 HL
6	FP2 HL
7	FP3 HL

ES 2 268 166 T3

	8	FP4 HL
	9	FP140
5	10	FP2 40
	11	FP3 40
	12	FP4 40
10	13	PK
	14	carril vacío
15	15	SDS-PAGE MW estándares preteñidos, rango bajo, Bio-Rad, 4 Pl de carga

La Figura 3 muestra la SDS-PAGE de las muestras de FP5 a FP8, con un contenido de EPO respectivo de 10000 IU/ml, almacenada en el refrigerador (HL) y en almacenamiento a 40°C (2°C) 1 mes (40). EPO en volumen en regulador de fosfato en almacenamiento a 40°C (2°C) 1 mes fue tomado como un control positivo (PK) para la determinación del contenido de dímeros de EPO. 0.4 Pg fueron cargados en cada carril.

Leyenda de Fig. 3:

	Carril	Muestra
25	1	carril vacío
	2	SDS-PAGE MW estándares preteñidos, rango bajo, Bio-Rad, 4 Pl de carga
30	3	carril vacío
	4	EPO-BRP (EPO estándar de European Pharmacopoeia)
	5	FP 5 HL
35	6	FP6 HL
	7	FP7 HL
40	8	FP8 HL
	9	FP5 40
	10	FP6 40
45	11	FP7 40
	12	FP8 40
50	13	PK
	14	carril vacío
55	15	SDS-PAGE MW estándares preteñidos, rango bajo, Bio-Rad, 4 Pl de carga

La Figura 4 muestra la SDS-PAGE de las muestras de FP1 a FP8, con un contenido de EPO respectivo de 10000 IU/ml, almacenada en el refrigerador (HL) 10 semanas. EPO en volumen en regulador de fosfato en almacenamiento a 40°C (2°C) 1 mes fue tomada como control positivo (PK) para la determinación del contenido de dímeros de EPO. 0.4 Pg fueron cargados en cada carril.

Leyenda de Fig. 4:

	Carril	Muestra
65	1	carril vacío
	2	SDS-PAGE MW estándares preteñidos, rango bajo, Bio-Rad, 4 Pl de carga

ES 2 268 166 T3

	3	carril vacío
	4	EPO-BRP (EPO estándar de European Pharmacopoeia)
5	5	FP1 HL
	6	FP2 HL
	7	FP3 HL
10	8	FP4 HL
	9	FP5 HL
15	10	FP6 HL
	11	FP7 HL
	12	FP8 HL
20	13	PK
	14	carril vacío
25	15	SDS-PAGE MW estándares preteñidos, rango bajo, Bio-Rad, 4 Pl de carga

La Figura 5 muestra la SDS-PAGE de las muestras de FP1 a FP8, con un contenido de EPO respectivo de 10000 IU/ml, en almacenamiento a 25°C (2°C) 10 semanas (25). EPO en volumen en regulador de fosfato en almacenamiento a 40°C (2°C) 1 mes fue tomada como un control positivo (PK) para la determinación del contenido de dímeros de EPO. 0.4 Pg fueron cargados en cada carril.

Leyenda de Fig. 5:

Carril	Muestra
35	1 carril vacío
	2 SDS-PAGE MW estándares preteñidos, rango bajo, Bio-Rad, 4 Pl de carga
40	3 carril vacío
	4 EPO-BRP (EPO estándar de European Pharmacopoeia)
	5 FP125
45	6 FP2 25
	7 FP3 25
50	8 FP4 25
	9 FP5 25
	10 FP6 25
55	11 FP7 25
	12 FP8 25
60	13 PK
	14 carril vacío
65	15 SDS-PAGE MW estándares preteñidos, rango bajo, Bio-Rad, 4 Pl de carga

La Figura 6 muestra la respuesta relativa de EPO-ELISA (in %) de las muestras de FP1 a FP8, con a contenido respectivo de EPO de EPO 10000 IU/ml, en almacenamiento a 40°C (2°C) por 1 mes (40), a las muestras de FP1 a FP8, almacenada en el refrigerador por 1 mes (HL).

La Figura 7 muestra la respuesta relativa de EPO-ELISA (in %) de las muestras de FP1 a FP8, con un contenido respectivo de EPO de EPO 10000 IU/ml, en almacenamiento a 25°C (2°C) por 10 semanas (25), a las muestras de FP1 a FP8, almacenadas en el refrigerador por 10 semanas (HL).

5 *Resultados de pruebas de estabilidad*

La SDS-PAGE con muestra de inmunodetección que la EPO agrega, por ejemplo dímeros de EPO y sustancias relacionadas de más alta masa molecular, no se presentan en la composición farmacéutica de la presente invención (FP7 y FP8) a temperatura ambiente (Figuras 1-5). A temperaturas elevadas están presentes en pequeñas cantidades. 10 La comparación de la estabilidad de la EPO a temperatura elevada (1 mes a 40°C) de la composición farmacéutica de la presente invención con la composición farmacéutica FP1, en la cual se usa la combinación de polisorbato y el aminoácido glicina (Figuras 1,2,3), muestra que se forman dímeros de EPO en FP1. La formación de dímeros de EPO es uno de los factores cruciales para la estabilidad de la EPO. También es posible que los agregados de EPO, e. g. dímeros de EPO y sustancia relacionadas de masa molecular más alta, causen efectos colaterales indeseados después 15 de la aplicación y la inconformidad del paciente tratado con la composición farmacéutica. Es también posible que estos agregados causen respuesta inmune del organismo y el tratamiento con EPO tenga que ser suspendido.

La composición farmacéutica de la presente invención que contiene sólo PVP como estabilizante efectivo (FP8) en comparación con otras composiciones farmacéuticas preparadas (FP1-FP7) a temperatura elevada (40°C, 1 mes; Figura 20 6) muestra que la adsorción de EPO en los viales de FP8 es más baja o igual en comparación con otras formulaciones. A temperaturas ambiente, las adsorciones son comparables o mejores (Figura 7). Una adsorción incrementada sobre los viales disminuiría la estabilidad de la EPO y la actividad biológica entera se vería disminuida.

Se han usado aminoácidos como agente estabilizante de la EPO en las formulaciones descritas en la técnica anterior. Pero los aminoácidos no siempre exhiben un efecto estabilizador sobre la EPO. En La Figuras 6 y 7 se ve que la 25 estabilidad a temperaturas elevadas (40°C 1 mes) de composiciones farmacéuticas FP2 y FP3 que comprenden glicina es más baja que la estabilidad de las preparaciones farmacéuticas FP4, FP5, FP6 y FP8, que no contienen glicina, y es también más baja que FP1 que comprende glicina. Una alta estabilidad de la EPO puede obtenerse con el uso de la combinación correcta de diferentes agentes estabilizantes, pero no puede predecirse su composición apropiada. Con 30 la composición farmacéutica de la presente invención se encontró sorprendentemente que PVP estabilizaba la EPO.

La proporción de dímeros de EPO y sustancias relacionadas de masa molecular más alta medida por SEC fue comparada con soluciones diluidas de las muestras (a una concentración de 2%). Los resultados de ensayos de límite se presentan en la Tabla 1 más abajo 35

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 268 166 T3

TABLA 1

Muestra	La estimación de las proporciones de dímeros de EPO	
	40°C 1 mes	25°C 10 semanas
FP1 (2000 IU/ml)	*	*
FP1 (10000 IU/ml)	*	*
FP2 (2000 IU/ml)	<2%	<2%
FP2 (10000 IU/ml)	>2%	<2%
FP3 (2000 IU/ml)	>2%	<2%
FP3 (10000 IU/ml)	>2%	<2%
FP4 (10000 IU/ml)	<2%	<2%
FP5 (2000 IU/ml)	**	**
FP5 (10000 IU/ml)	(>2%) **	**
FP6 (2000 IU/ml)	<2%	<2%
FP6 (10000 IU/ml)	>2%	<2%
FP4 (2000 IU/ml)	<2%	<2%
FP7(2000 IU/ml)	<2%	<2%
FP7 (10000 IU/ml)	<2%	<2%
FP8 (2000 IU/ml)	<2%	<2%
FP8 (10000 IU/ml)	<2%	<2%
<p>*denota que la determinación de la proporción de dímeros no fue posible debido a los polisorbatos de placebo</p> <p>**denota que al determinación de la proporción de dímeros no fue posible debido al dextrano</p>		

La actividad biológica *en vivo* fue medida en la muestra FP8 con un contenido de EPO de 10000 IU/ml, en almacenamiento a 25°C por 10 semanas r almacenada en el refrigerador por 4 meses.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2 más abajo:

TABLA 2

Muestra	Estimación de actividad biológica (80-120%)	Conf. Límite (64-156%)
FP8 (25°C, 10 semanas)	9059 IU/ml (91%)	69-143%
FP8 (HL, 4 meses)	9917 IU/ml (99%)	76-129%

Los resultados muestran que la actividad biológica estimada está en el rango requerido y corresponde a las exigencias de Eur. Ph. Los límites de confiabilidad también están dentro del rango exigido.

ES 2 268 166 T3

Ejemplos 2 y 3

Composiciones de composiciones farmacéuticas de EPO

- 5 Las composiciones de los Ejemplos 2 y 3 (composiciones farmacéuticas presentadas en ellos) se establecen en las Tablas 3 y 4 respectivamente.

TABLA 3

10	Muestra	Ingrediente activo	Ingrediente inactivo
	FP8 (2000)		
15		2000 IU EPO	
			NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O 1.164 mg
			Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 2.225 mg
20			NaCl 7.200 mg
			PVP K12 5.000 mg
25			NaOH para ajuste de pH (pH 7.0-7.1)
			Agua hasta

TABLA 4

30	Muestra	Ingrediente activo	Ingrediente inactivo
35	FP8 (10000)		
		10000 IU EPO	
40			NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O 1.164 mg
			Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 2.225 mg
			NaCl 7.200 mg
45			PVP K12 5.000 mg
			NaOH para ajuste de pH (pH 7.0-7.1)
50			Agua hasta

También se detectaron pequeñas cantidades de sustancias relacionadas de masa molecular más alta en la mayoría de las muestras, pero no se incluyeron en la presentación.

Calidad de las sustancias

EPO: Calidad según las exigencias de European Pharmacopoeia (calidad Ph Eur.), Povidona K12 (poli[1-(2-oxo-1-pirrolidinil)etilen], polividona o polivinilpirrolidona, PVP) calidad Ph Eur, también corresponde a la US Pharmacopoeia (calidad USP), adquirida de BASF, Ludwigshafen, Alemania, NaCl, Na₂HPO₄x2H₂O, NaH₂PO₄ x2H₂O, NaOH, agua para inyección: calidad Ph. Eur.

Preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden EPO

Preparación de solución de placebo con PVP K12: regulador (Na₂HPO₄ x2H₂O, NaH₂PO₄ x2H₂O), NaCl y estabilizante PVP K12 se disolvieron en agua para inyección a temperatura ambiente mezclando con un agitador magnético. SE ajustó entonces el pH con NaOH 1 M a 7.0 - 7.1. Se obtuvo una solución clara e incolora.

ES 2 268 166 T3

Preparación de solución de EPO: El volumen calculado de la solución de EPO (los cálculos fueron efectuados teniendo en cuenta la actividad de la EPO) fue añadido a la solución de placebo. Justo antes de esta etapa se extrajo el mismo volumen de solución de placebo. La solución fue agitada usando un agitador magnético a bajas revoluciones. Se obtuvo una solución clara incolora.

5

Las soluciones de composiciones farmacéuticas que comprenden EPO a ambas concentraciones fueron entonces filtradas asépticamente (nivel de limpieza de aire de clase 100) en esterilidad través de filtro de membrana con PVDF (Polivinilidenfluoruro), tamaño de poro 0.2 μ m. 0.8 ml de las soluciones filtradas se rellenaron en viales de 2ml (viales de vidrio tubular incoloro hidrolítico tipo I), se lavaron y esterilizaron, se cerraron con cierres elásticos de goma de bromobutilo y se sellaron con tapones de aluminio.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica estable de eritropoyetina (EPO), que consiste en:

a. una cantidad terapéuticamente efectiva de EPO

b. un sistema regulador de pH farmacéuticamente aceptable, y

c. polivinilpirrolidona (PVP)

y opcionalmente

d. un agente isotonicante y/o

e. uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados entre el grupo que consiste de polioles, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, macrogol ésteres y éteres, glicol y glicerol ésteres, y aminoácidos,

opcionalmente

a poloxámero o un polisorbato como un estabilizante adicional.

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que está libre de aditivos derivados de origen humano y/o animal.

3. La composición de la reivindicación 1 o 2, donde la composición es acuosa.

4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la cantidad farmacéutica de EPO es formulada para proveer una cantidad por dosis en el rango de de 500 a 100000 IU EPO.

5. La composición de la reivindicación 4, donde la cantidad farmacéutica es formulada para proveer una cantidad por dosis seleccionada del grupo que consiste de aproximadamente 1000 IU, aproximadamente 2000 IU, aproximadamente 3000 IU, aproximadamente 4000 IU, aproximadamente 10000 IU, aproximadamente 20000 IU, aproximadamente 25000 IU y aproximadamente 40000 IU.

6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el sistema regulador de pH provee un rango de pH de 6 a 8.

7. La composición de la reivindicación 6, donde el sistema regulador de pH provee un rango de pH de 6.8 a 7.5.

8. La composición de la reivindicación 6, donde el sistema regulador de pH provee un pH de aproximadamente 7.0.

9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el sistema regulador de pH es un regulador de fosfato.

10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde PVP está comprendido en un rango de 0.01% a 1%.

11. La composición de la reivindicación 10, donde PVP está comprendido en un rango de 0.1% a 1%.

12. La composición de la reivindicación 10, donde la concentración de PVP es aproximadamente 0.5%.

13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde dicha PVP tiene un valor de K en un rango de K12 a K18.

14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el dicho agente isotonicante se selecciona del grupo consistente de sales inorgánicas.

15. La composición de la reivindicación 14, donde dicho agente isotonicante es NaCl.

16. El uso de PVP como único estabilizante para la estabilización de la eritropoyetina (EPO) en una solución acuosa.

17. Un proceso para preparar una composición que contiene eritropoyetina (EPO), que comprende mezclar EPO con PVP, donde se prepara la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

18. Uso de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades indicadas para la eritropoyetina (EPO).

Figura 1

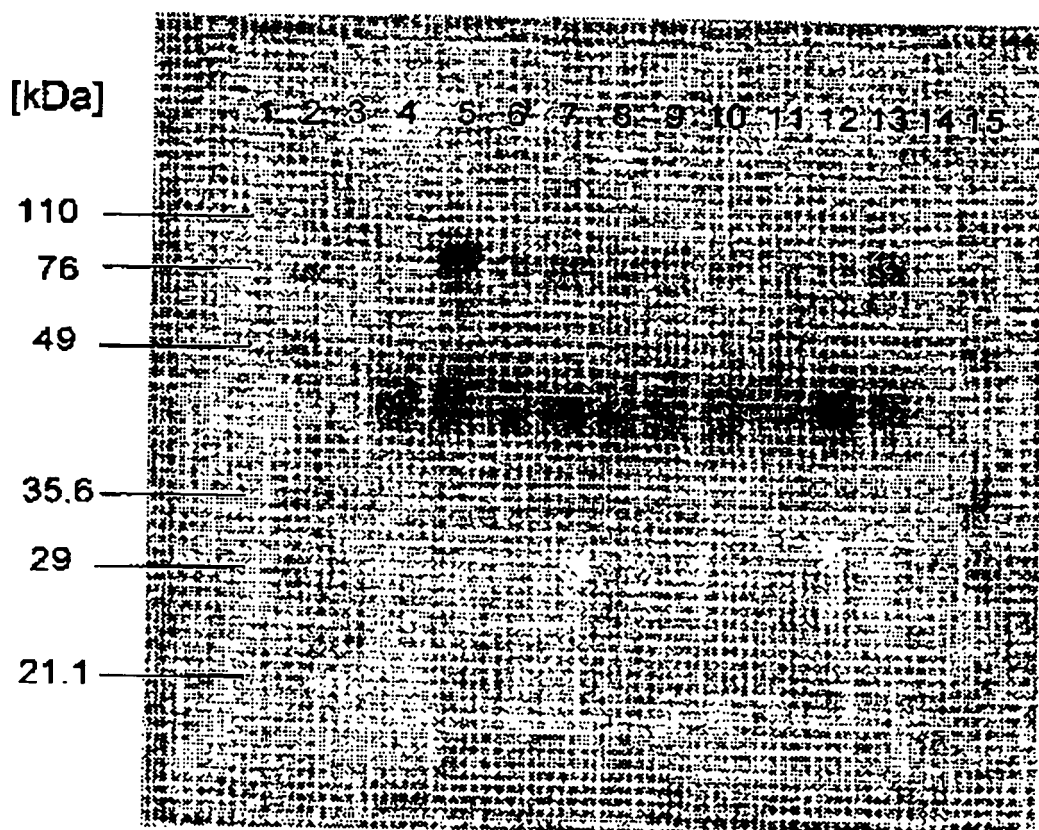


Figura 2

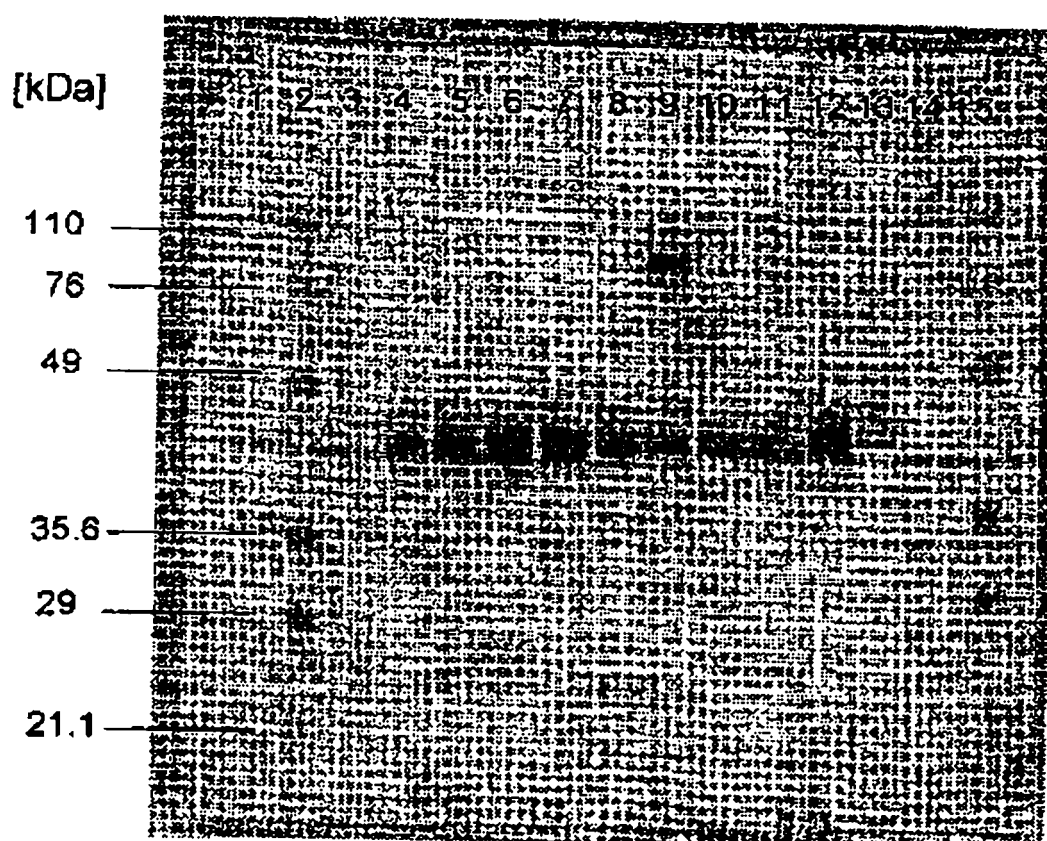


Figura 3

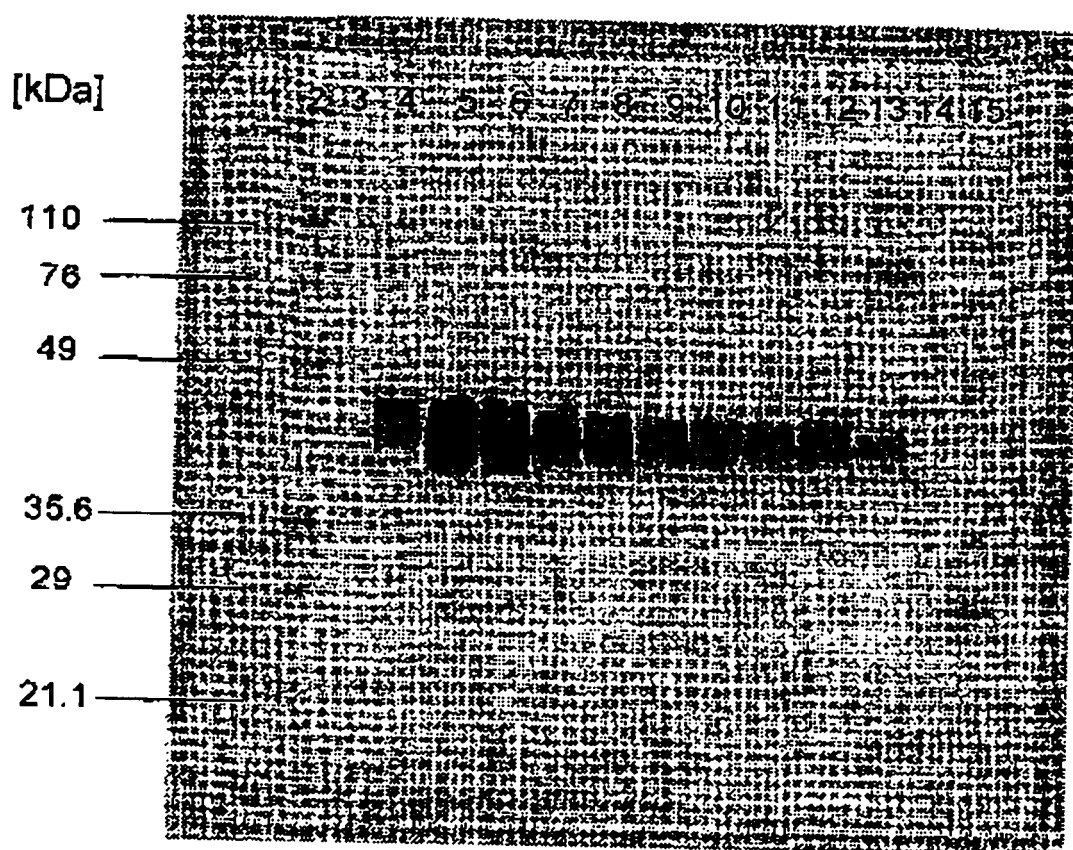


Figura 4

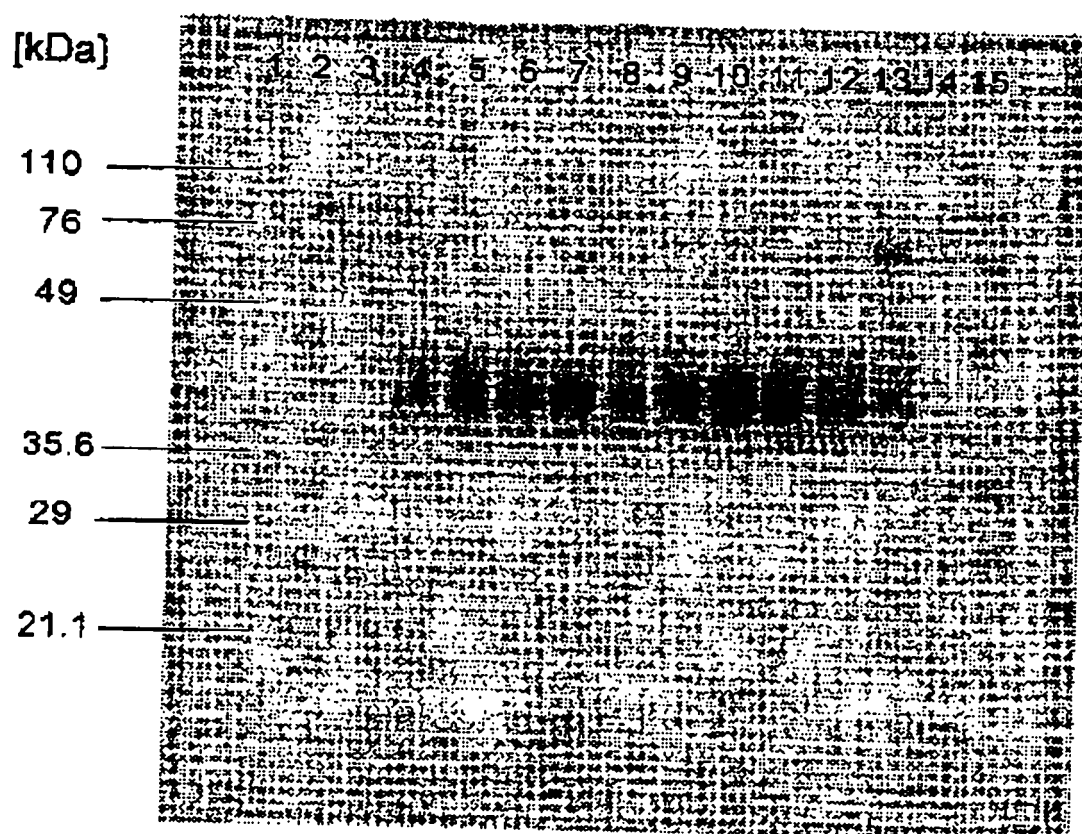


Figura 5

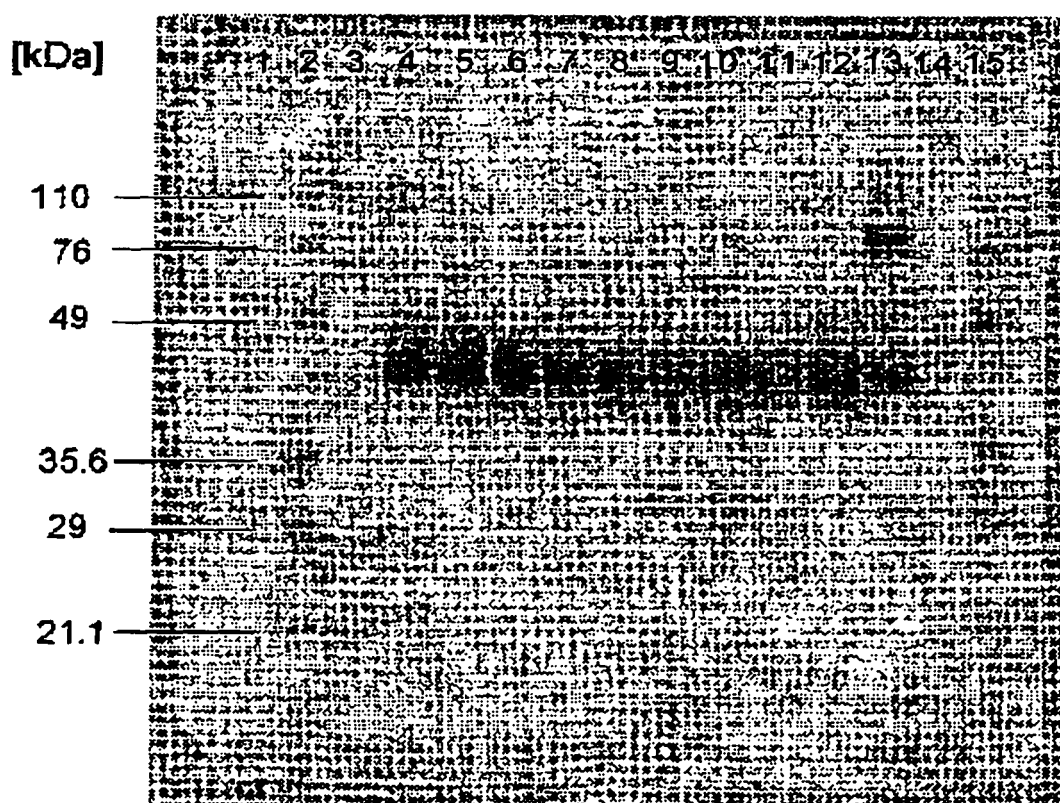


Figura 6

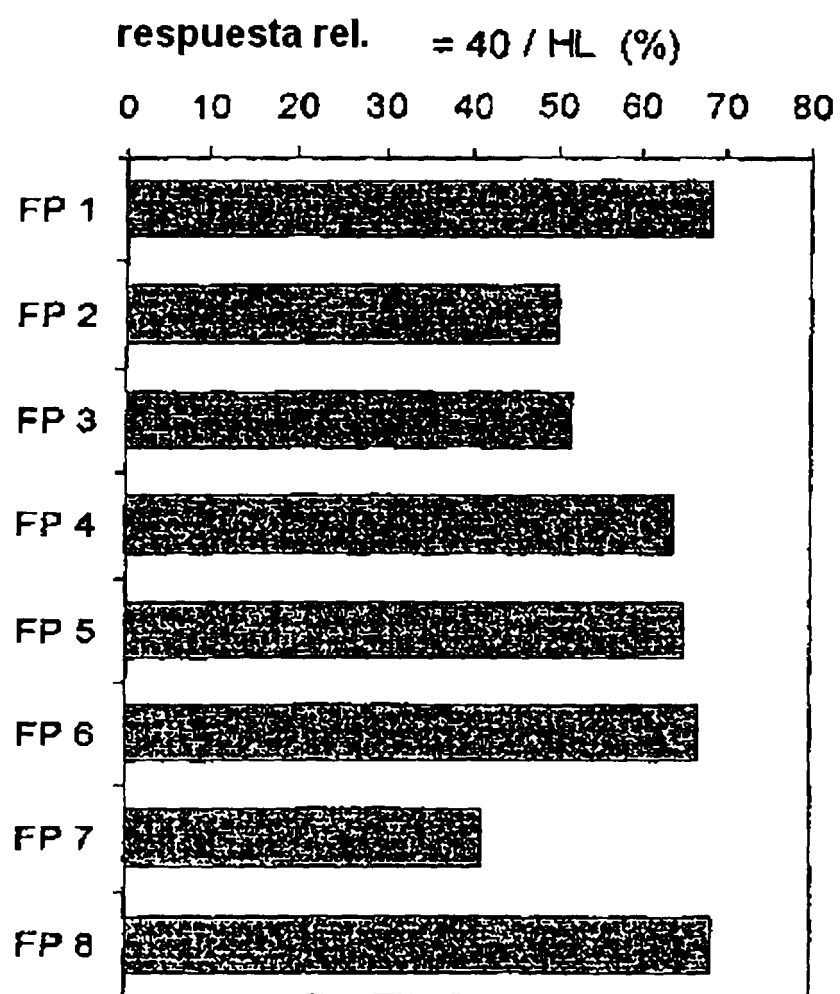


Figura 7

