

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 97 584

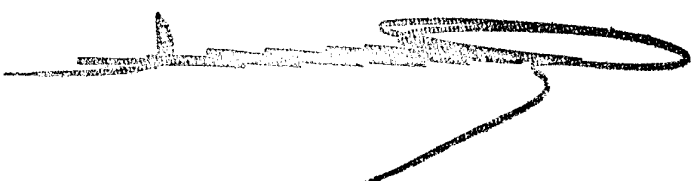
REQUERENTE: BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONTÊM ERITROPOIETINA"

INVENTORES: Dr. Thomas Brune

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

República Federal Alemã, 8 de Maio de 1990, sob o N.º.
P 40 14 654.5.

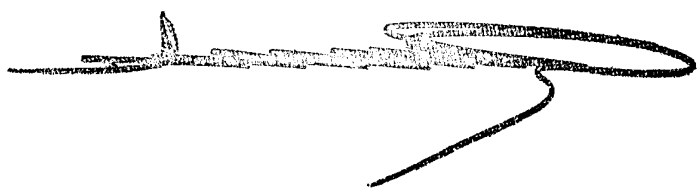


Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Dieter Brazel, Dr. Bernhard Siebold, Dr. Dorothee Krumwisch e Dr. Thomas Brume, residentes na República Federal Alemã), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE CONTEM ERITROPOIETINA"

D E S C R I Ç Ã O

A presente invenção refere-se a composições galênicas aquosas que contêm eritropoietina purificada, especialmente eritropoietina natural humana e eritropoietina recombinante humana (rh EPO). As composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção - sem proteínas estranhas, açúcar, aminoácidos ou outros agentes estabilizadores usuais - quando guardadas a uma temperatura de 4 a 8° C, mantêm pelo menos cerca de 78% da sua actividade original durante um ano.

A eritropoietina (EPO) é uma glicoproteína com cento e sessenta e seis aminoácidos, três posições de glicosilação nas posições de aminoácidos 24, 38 e 83 e uma massa molecular igual a cerca de 34 000. A EPO pode ser preparada a partir de fontes naturais como, por exemplo, urina humana (veja-se, por exemplo, MiyaKe e col., J. Biol. Chem., Vol. 252 (1977), 5558 - 5564) ou ser preparada por processos de tecnologia genética (veja-se, por exemplo, as Patentes Europeias EP-A 0148 605 e 0 267 678). As soluções aquosas de eritropoietina são instáveis às temperaturas compreendidas



entre cerca de 3° C e a temperatura ambiente.

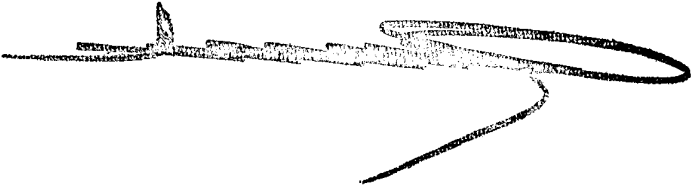
Os pacientes com insuficiência renal não podem produzir EPO e, portanto, sofrem de anemia. Os ensaios para complementar essa falta de EPO por administração de EPO e atenuar os sintomas de anemia obtiveram êxito. Outras utilizações clínicas consistem na administração de hEPO no caso de anemia iatrogénica depois de quimioterapia ou de terapia com raios X de doenças malignas.

Uma dose individual de EPO é de apenas alguns microgramas. Em virtude dos curtos tempos de semi-transformação depois de administração por via intravenosa, não podem detectar-se teores fisiológicos no plasma após as injeções subcutâneas.

As formulações galénicas de eritropoietina até agora reivindicadas e disponíveis têm aditivos constituídos por detergentes e/ou proteínas, açúcares e poli-álcoois, os quais, por um lado, estabilizam a EPO e, por outro lado, evitam a absorção da EPO pela parede interna do recipiente de armazenagem (isto é, nas ampolas) (EP-B-0 178 576; EP-A-0 178 655; G. Krystal e col., Blood, Vol. 67 (1986), 1, 71 - 79).

A administração subcutânea ou intramuscular da EPO estabilizada dessa forma origina inflamações locais com formação de granulomas. A EPO de elevada pureza preparada de acordo com processos conhecidos patentes de invenção (EP-A-0 236 059; US-A 4 667 159, PCT/US 86/01342 (=WO 86/07594)) perde mais de 25% da sua actividade durante uma semana em armazenagem a 24° C. A partir da Patente Europeia EP-B-0 178 576, conhece-se ainda uma solução de eritropoietina humana que foi metilada por redução com ¹⁴C-formaldeído em PBS; vejam-se ensaios 1 e 2.

A invenção tem como objectivo proporcionar composições farmacêuticas galénicas de eritropoietina purificada que são isentas dos aditivos de estabilização usuais e, não obstante, possuem uma estabilidade suficiente às temperaturas compreendidas entre cerca de 3° C e a temperatura ambiente e são especialmente apropriadas para a administração por vias subcutânea ou intramuscular.




Supreendentemente, a Requerente descobriu que a eritropoietina purificada (com cerca de 99% de grau de pureza), e, especialmente, a eritropoietina humana natural ou recombinante purificada, no seio de uma solução-tampão de fosfato aquosa fisiologicamente aceitável de pH compreendido entre 6 e 8, que contém um halogeneto de metal alcalino fisiologicamente aceitável, mas não contém aditivos estabilizantes, é estável em recipientes de vidro ou ampolas de vidro fechados, durante longos intervalos de tempo, a temperaturas compreendidas entre 4 e 8°C.

A invenção refere-se, portanto, a composições farmacêuticas galênicas aquosas de eritropoietina purificada num tampão aquoso de fosfato fisiologicamente aceitável com um valor de pH compreendido entre 6 e 8, que contém um halogeneto de metal alcalino fisiologicamente aceitável mas que não contém outros aditivos estabilizantes. É especialmente preferido um tampão constituído por fosfato de sódio 50 mM e por NaCl 100 mM de pH 7,8. A concentração de eritropoietina na solução de tampão aquoso é igual a 50 a 1000 microgramas por mililitro de solução de tampão.

São exemplos de soluções de tampão aquosas de fosfato fisiologicamente aceitáveis o tampão de fosfato de sódio e o tampão de fosfato de potássio, de preferência o tampão de fosfato de sódio. Os exemplos de halogenetos de metais alcalinos fisiologicamente aceitáveis são o cloreto de sódio e o cloreto de potássio, de preferência, o cloreto de sódio. Um tampão de fosfato preferido é um tampão de fosfato de sódio 50 mM e NaCl 100 mM, de pH 7,8. Este tampão é abreviadamente designado como PBS. As soluções aquosas de eritropoietina em PBS são muito apropriadas para a administração por via subcutânea e intramuscular.

A invenção refere-se ainda à utilização das formulações aquosas galênicas para a preparação de composições para injeções para administração subcutânea ou intramuscular. É especialmente preferida a administração subcutânea porque, em relação às formulações conhecidas, que são estabili-



zadas com proteínas, não origina irritação nem dores provocadas por inflamação; os ensaios clínicos demonstraram este efeito.

Os Exemplos seguintes esclarecem a presente invenção.

EXEMPLO

Exemplo 1

Purificação de rh EPO

A purificação de rh EPO realizou-se a partir de meio que contém soro ou isento de soro, que foi condicionado por células animais que produzem rh EPO, de acordo com o processo descrito na Patente de Invenção EP-A 0 267 678, página 6, linha 45 até página 9, linha 5. O processo compreende:

- 1) a clarificação, a concentração e a diálise do meio de cultura,
- 2) a cromatografia com permuta de iões,
- 3) a "cromatografia em fase líquida de alto rendimento em fase inversa" preparativa e
- 4) a cromatografia por filtração através de gel.

Para a cromatografia através de gel, equilibróu-se a coluna com PBS, isto é, tampão de fosfato de sódio 50 mM e NaCl 100 mM, pH 7,8. Com esta solução de tampão, eluíu-se a rh EPO num pico único simétrico (determinação do eluído a 280 nm). A rh EPO assim obtida era pelo menos 99% pura de acordo com o ensaio de SDS-PAGE.

5) Diluição

As fracções de rh EPO pura obtidas na fase de filtração em gel 4) tinham um teor de 0,1 - 0,8 mg de EPO por mililitro e foram embaladas com o tampão de fosfato de sódio-cloreto de sódio (PBS) de pH 7,8, em doses

individuais de 100 microgramas/mililitro.

Exemplo 2

Ensaio da Estabilidade

Ensaiou-se a estabilidade da solução de rh EPO em PBS obtida de acordo com o Exemplo 1 depois da armazenagem das doses individuais em tubos de ensaio esterilizados em comparação com diferentes estabilizadores. A actividade da rh EPO foi medida por inserção de 3T em células de baço de rato com fenil-hidrazina, procedendo de acordo com a maneira de proceder geral.

Os dados reunidos na Tabela seguinte referem-se à actividade de partida da rh EPO inicial igual a 100%.

a) Armazenagem a 4 - 8^o C

Agente estabilizador	Quantidade de agente estabilizador (peso/peso relativo de EPO) em relação a de EPO/ml de PBS	% de actividade depois de 12 meses
----------------------	--	------------------------------------


PBS sozinho	-	78,5
PBS + Sorbite	5000	51
PBS + Glicerina	6150	0
PBS + Haemacel ^R	100	68

b) Armagenagem a 37^oC (Ensaio Acelerado)

Agente estabilizador	Quantidade de agente estabilizador	% de actividade depois de meses			
		1	2	3	6

PBS sozinho	-	86,3	39	11,2	9,9
PBS + Sorbite	5000	33,5	10,7	5,1	0
PBS + Haemacel ^R	100	42	14,8	6,0	5,1

NOTA: Haemacel^R é uma gelatina degradada



A partir dos valores indicados nas Tabelas, verifica-se obviamente a surpreendentemente melhor estabilização de rh EPO em PBS (pH 7,8) sem adição de estabilizador.

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de composições farmacêuticas aquosas estáveis que contêm eritropoietina (EPO), apropriadas para injecções, caracterizado por se dissolver EPO com uma pureza maior do que ou igual a 99% numa solução aquosa de tampão com o valor de pH de 6 a 8, fisiologicamente aceitável a qual contém um fosfato de metal alcalino fisiologicamente aceitável e um halogeneto de metal alcalino mas mais nenhuns outros aditivos estabilizadores.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a solução aquosa de tampão ser uma solução 50 mM fosfato de sódio e 100 mM de NaCl de pH igual a 7,8.

- 3ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de a EPO ser EPO humana natural ou recombinante.

- 4ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto de a concentração de EPO estar compreendida entre 50 a 1000 microgramas por mililitros de solução de tampão.

A requerente reivindica a prioridade do pedido alemão apresentado em 8 de Maio de 1990, sob o Nº. P 40 14 654.5.

Lisboa, 7 de Maio de 1991

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE - DIRETORIA GERAL

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke.



R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS AQUOSAS QUE CONTÊM ERITROPIETINA"

A invenção refere-se ao processo para a preparação de composições farmacêuticas aquosas que contém eritropoietina humana natural ou recombinante, que compreende dissolver eritropoietina com um grau de pureza 99% numa solução aquosa 50 mM de fosfato de sódio e 100 mM de NaCl de pH igual a 7,8, fisiologicamente aceitável de modo a obter-se uma concentração de eritropoietina, compreendida entre 50 e 1000 microgramas por mililitro de solução de tampão.