



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 292**

51 Int. Cl.:
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 47/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04809251 .4**
96 Fecha de presentación : **22.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1729794**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

54 Título: **Una composición farmacéutica que comprende una sulfobetaina no detergente.**

30 Prioridad: **23.12.2003 SI 200300318**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

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

72 Inventor/es: **Menart, Viktor;**
Gaberc Porekar, Vladka y
Podobnik, Barbara

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

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

Una composición farmacéutica que comprende una sulfobetaina no detergente.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una sulfobetaina no detergente (NDSB).

10 **Estado de la técnica**

Son bien conocidas las composiciones farmacéuticas que comprenden ingredientes farmacéuticos activos. Las composiciones farmacéuticas descritas más comunes comprenden varios excipientes farmacéuticamente aceptables que con sus diferentes propiedades (por ejemplo, estabilización del ingrediente farmacéutico activo, ajuste y/o mantenimiento del pH, efecto sobre la solubilidad del ingrediente farmacéutico activo, mantenimiento de la isotonicidad de la composición farmacéutica, etc), permiten el uso de ingredientes farmacéuticos activos en las composiciones farmacéuticas. Los excipientes farmacéuticamente aceptables han sido descritos de forma amplia; véase, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Excipients, Ainley Wade y Paul J. Sélser, American Pharmaceutical Association, 1994. También se han descrito proteínas terapéuticamente activas como ingredientes farmacéuticos activos en las composiciones farmacéuticas. Estas composiciones farmacéuticas comprenden también varios excipientes farmacéuticos que, con sus propiedades, permiten la preparación de composiciones farmacéuticas estables que comprenden proteínas terapéuticamente activas. Dichas composiciones farmacéuticas han sido descritas de forma amplia; véase, por ejemplo, Yu-Chang John Wang y Musetta A. Hanson (1988), J of Parenteral Science & Technology, 42: S4-S26; Wong D. y Parasrampur J. (1997), Biopharm: November 52-61. Composiciones farmacéuticas estables que comprenden proteína terapéutica, factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) se exponen en EP 373679 y también la estabilización principalmente del G-CSF en solución con baja conductividad y pH ácido entre 2,75 y 4,0. Para mejorar la estabilidad, se añadieron varios azúcares, aminoácidos, polímeros y detergentes. Se ha recalcado particularmente que el pH de la composición que comprende G-CSF deberá ser menor de 4 con el fin de reducir la formación de agregados y aumentar la estabilidad de esta manera. La formación de agregados y la menor estabilidad con un pH que supera 4,0 están de acuerdo con los datos de la bibliografía del estado de la técnica (Kuzniar *et al.* (2001), Pharm Dev Technol 6 (3): 441-7; Bartkowski *et al.* (2002), J Protein Chem 21(3): 137-43; Narhi *et al.* (1991), J Protein Chem 10(4): 359-367; Wang W (1999), Int J Pharmaceut 185: 129-188). La estabilidad del G-CSF, descrita en otras composiciones farmacéuticas de la bibliografía tanto de patentes como científica, se logró por la adición de varios estabilizantes, tales como, por ejemplo, iones sulfato (EP 1129720), mezcla de varios conservantes, aminoácidos y surfactantes (EP 607156), varios sistemas tampón (fosfato, citrato, arginina, acetato) en presencia de un surfactante (EP 674525), compuestos de alto peso molecular, tales como hidroxipropilcelulosa, polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y otros (GB 2193621), un surfactante (EP 1060746), varios sistemas tampón (TRIS, HEPES, TRICINE) (EP 0988861), azúcares, tales como celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, rafinosa, trehalosa y otros (EP 0674524) y uno o más aminoácidos (EP 1197221, WO 51629, EP 1260230 y EP 1329224, EP 0975335). Aunque se prefiere una baja concentración iónica en las composiciones farmacéuticas que comprenden G-CSF, se utilizan varios surfactantes y otros estabilizantes para la estabilización de G-CSF, como ha sido descrito, en la mayoría de los casos, para la estabilización de G-CSF. Además, se han empleado varios sistemas tampón además, en la mayoría de los casos, para el mantenimiento del pH. En la bibliografía al respecto, se ha descrito en uso de sulfobetainas no detergentes (NDSBs) como solubilizantes (empleadas en altas concentraciones de alrededor de 1 M de la solución) mediante renaturalizaciones de la proteína (Chong Y y Chen H. (2000), Biotechniques 29(6): 1166-7; Vuillard L *et al.* (1995), Biochem J 305: 337-43; Vuillard L *et al.* (1995), Electrophoresis 16 (3): 295-7; Vuillard L *et al.* (1998), Eur J Biochem 256: 128-135; Goldberg M E *et al.* (1995), Folding & Design 1: 21-27).

La US5500416 describe un preparado dermatológico que contiene una base dermatológica, un fármaco (moléculas orgánicas) y un agente promotor de la absorción percutánea que por sí mismo comprende a) al menos un surfactante aniónico y b) al menos un surfactante que tiene un átomo de nitrógeno en la molécula distinto de los surfactantes aniónicos y catiónicos en donde se propone la sulfobetaina. La sulfobetaina se emplea de manera explícita como un agente promotor de la absorción percutánea. En WO9725404 se describe una composición desinfectante que comprende peróxido de hidrógeno, un aceite esencial antimicrobiano, un surfactante, tal como betaína o sulfobetaina, tampones y estabilizantes. En WO9952550 se describe un sistema de suministro de vacunas para administración SC, que está basado en un antígeno de proteína, matriz de partículas poliméricas/polímero, tampones y sulfobetaina. Las sulfobetainas de US5500416, WO9725404, WO9952550 presentan un carácter detergente. Cada vez es mayor la necesidad de poder proporcionar composiciones farmacéuticas estabilizadas. Ni en la bibliografía científica ni en la bibliografía de patentes se han encontrado una descripción de NDSBs en composiciones farmacéuticas.

60 **Descripción de los dibujos**

Figura 1: SE-HPLC de muestras de la invención y de una muestra de referencia, guardadas a 40°C (2°C) durante 1 mes (40).

Figura 2: SE-HPLC de muestras de la invención, guardadas a 40°C (2°C) durante 1 mes (40).

Descripción de la invención

En el contexto de la presente invención se ha descubierto que se puede emplear una NDSB como excipiente en una composición farmacéutica. Mediante el uso de una NDSB se pueden proporcionar composiciones farmacéuticas estabilizadas.

En consecuencia, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una NDSB. En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un ingrediente farmacéutico activo y una sulfobetaina no detergente (NDSB).

El ingrediente farmacéutico activo de la presente invención se elige del grupo consistente en una molécula orgánica sintética o natural terapéuticamente eficaz (por ejemplo, moléculas orgánicas sintéticas y naturales pobremente solubles en agua), y una proteína terapéuticamente eficaz (por ejemplo, proteínas pobremente solubles en agua y/o hidrófobas) y/u otros ingredientes farmacéuticos activos que presentan un efecto terapéutico. El ingrediente farmacéutico activo se incluye preferentemente en una cantidad terapéuticamente eficaz. El término "cantidad terapéuticamente eficaz de ingredientes farmacéuticos activos" tal como aquí se emplea, se refiere a un ingrediente farmacéutico activo en una cantidad que presenta un efecto terapéutico.

La composición farmacéutica de la presente invención comprende una sulfobetaina no detergente (NDSB). El término "sulfobetaina no detergente" tal como aquí se emplea, se refiere a una sulfobetaina que no forma micelas en solución acuosa. En una modalidad preferida de la composición farmacéutica de la presente invención, la NDSB es una sal de amonio cuaternario en donde los grupos R1, R2, R3 y R4-SO₃⁻ están enlazados al átomo de nitrógeno central, y en donde:

R1 es metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo o sus derivados;

R2 es metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo o sus derivados;

R3 es metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo o sus derivados,

y todas las combinaciones de R1, R2 y R3 y R4 son (CH₂)_n en donde n está comprendido entre 1 y 6; con suma preferencia n es 3.

Preferentemente, en la composición farmacéutica de la presente invención se emplea una NDSB seleccionada del grupo consistente en sal de dimetiletil-(3-sulfopropil)-amonio (SB195, Vuillard *et al* (1994) FEBS Letters, 353, 294-296; Goldberg *et al* (1995/1996) Folding & Design, 1, 21-27), 3-(1-piridino)-1-propanosulfonato (SB201), propanosulfonato de dimetilbencilamonio (SB256), sal de dimetil-t-butil-(3-sulfopropil)amonio (SB222t), 3-(1-metilpiperidina)-1-propanosulfonato (SB221) y sal de dimetil-(2-hidroxiethyl)-(sulfopropil)amonio (SB211; Vuillard *et al* (1895) Anal Biochem, 230, 290-294). También se pueden emplear una o más de las NDSBs indicadas en todas las combinaciones posibles. Preferentemente, se emplean la sal de dimetil-t-butil-(3-sulfopropil)amonio (SB222t), la sal de dimetiletil-(3-sulfopropil)amonio (SB195) y 3-(1-metilpiperidina)-1-propanosulfonato (SB221). Con suma preferencia se emplea la sal de dimetil-t-butil-(3-sulfopropil)amonio (SB222t). La concentración de NDSB usada depende del pH que ha de ser ajustada y/o mantenido. Se elige en el intervalo de 1 a 1.000 mM, con preferencia de 5 a 100 mM. El pH de la composición farmacéutica de la presente invención puede ser del orden de 2 a 9, con preferencia de 3 a 8 y con suma preferencia de 3,5 a 7,5.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína terapéuticamente eficaz y una sulfobetaina no detergente (NDSB).

El término "proteína terapéuticamente eficaz" tal y como aquí se emplea, se refiere a una proteína con efecto terapéutico. Una proteína terapéuticamente eficaz usada en la composición farmacéutica de la presente invención se elige del grupo consistente en factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), interferones (IFNs); tales como IFN-alfa3a, INF-alfa2b, IFNbeta. IFN-gamma1b; interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 a IL-10; factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF); factor de crecimiento epidérmico (EGF); eritropoietina (EPO); hormona estimuladora de folículos (FSH); albúmina de suero humano (HSA), deoxirribonucleasa (DNAsa); factor de crecimiento de fibroblastos (aFGF o bFGF), factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa) y factor beta de necrosis tumoral (TNF-beta); calcitonina; hematoproteína; activadores plasminogénicos y sus precursores (t-PA, uroquinasa, prouroquinasa, estreptoquinasa, proteína C); citoquinas; familia de ligandos de TNF (TRAIL, FasL, osteoprotegerina); receptores solubles (p55, p75); hormona de crecimiento, por ejemplo, hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento bovina y hormona paratifoidea; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina, insulina, proinsulina, subunidad A de insulina, subunidad B de insulina; glucagones; factores de coagulación de la sangre, tales como, por ejemplo, Factor VIII, Factor IX, factor tisular, factor de von Willebrand; bombasina; trombina; encefalinasa; proteína inflamatoria de macrófagos (MIP 1-alfa); subunidad A de relaxina, subunidad B de relaxina, prorelaxina; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormonas o receptores de factores de crecimiento; integrinas; proteína A, proteína B; factores reumatoideos; factor neurotrófico derivado de huesos (BDNF), neurotropina-3,-4,-5 o -6; factor de crecimiento de nervios (NGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos (aFGF y bFGF); factor de crecimiento transformante (TGF-alfa y TGF-beta); factor de crecimiento de tipo insulina (IGF1 e IGF2); trombo-

poietina (TPO); proteína morfogenética ósea (BMP); superóxido dismutasa; fragmentos biológicamente activos de las proteínas antes mencionadas y otras proteínas terapéuticamente eficaces. Las proteínas terapéuticamente eficaces de la presente invención se emplean en cantidades terapéuticamente eficaces. El término “cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína” tal y como aquí se emplea, se refiere a la cantidad de una proteína que presenta un efecto terapéutico.

El ingrediente farmacéutico activo sumamente preferido es G-CSF usado preferentemente en cantidades terapéuticamente eficaces. En el contexto de la presente invención, la composición farmacéutica comprende G-CSF y una sulfobetaina no detergente (NDSB).

El término “G-CSF” tal y como aquí se emplea, se refiere a la proteína que regula la diferenciación y proliferación de células hematopoiéticas en mamíferos y la activación de células maduras del sistema hematopoiético. Se elige del grupo consistente en: G-CSF humano y sus derivados y análogos definidos a continuación. Preferentemente, el G-CSF se refiere al G-CSF humano recombinante, producido por la expresión en la bacteria *E. coli*. La composición farmacéutica de la presente invención, se puede emplear para todos los tipos de G-CSFs; se puede emplear entre otros también en el caso de aislamiento de formas derivadas de G-CSF, tal como metionil G-CSF (Met-G-CSF), G-CSF glicolizado y modificado enzimática y químicamente (tal como, por ejemplo pegilado), análogos de G-CSF y proteínas de fusión que comprenden G-CSF.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz de G-CSF” tal y como aquí se emplea, se refiere a la cantidad de G-CSF que activa el efecto terapéutico de G-CSF.

La composición farmacéutica de la presente invención comprende además opcionalmente un poliol.

El término “poliol” se refiere a cualquier alcohol polihídrico, es decir, un compuesto químico que contiene uno o más grupos hidroxilo por molécula.

Preferentemente, el poliol se elige del grupo consistente en sorbitol, glicerol, inositol, trehalosa, y manitol. La concentración preferida de poliol es del orden de 1% a 10% (m/v). La composición farmacéutica de la presente invención comprende además opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

El excipiente farmacéuticamente aceptable se elige del grupo consistente en barredores de cationes metálicos por ejemplo, EDTA y quelantes similares), disolventes y barredores de radicales libres (por ejemplo, DMSO), varios ácidos (por ejemplo, ácido acético, cítrico, metanosulfónico, fosfórico, hidroclorehídrico y otros), diversas bases (por ejemplo, NaOH o bases nitrogenadas orgánicas, por ejemplo, tampones de Good, tales como TRIS, TES, HEPES), varios sistemas tampón (por ejemplo, ácido acético/acetato, ácido glutámico/glutamato), ácido maleico/maleato), ácido cítrico/citrato, ácido fosfórico/fosfato y otros), diversos excipientes farmacéuticamente aceptables para el mantenimiento de la isotonicidad de la solución (por ejemplo, sales inorgánicas, tales como CaCl_2 y NaCl), estabilizantes de proteínas, seleccionados del grupo consistente en sustancias de superficie activa, tales como ésteres de glicol y glicerol, ésteres y éteres de macrogol, derivados de sorbitán o polisorbatos (polisorbato 20, polisorbato 80), aminoácidos, poloxámeros, (Pluronic F68), polivinilpirrolidona (PVP) y otros. Preferentemente, el excipiente farmacéuticamente aceptable se elige del grupo consistente en EDTA y DMSO.

La NDSB en las composiciones farmacéuticas de la presente invención puede estar combinada con uno o más de los referidos excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término “estabilizante” tal y como aquí se emplea, se refiere a un excipientes farmacéuticamente aceptable que puede estabilizar a un ingrediente farmacéutico activo (por ejemplo, una proteína, tal como G-CSF). El término “estabilizante de proteína” tal y como se emplea aquí, se refiere a un excipiente farmacéuticamente aceptable que puede estabilizar a una proteína (por ejemplo, G-CSF). El término “estabilidad de la proteína” (por ejemplo, G-CSF) tal y como aquí se emplea, se refiere al mantenimiento del contenido en proteína (por ejemplo, G-CSF), así como al mantenimiento de la actividad biológica de la proteína (por ejemplo, G-CSF). El descenso de la estabilidad de la proteína (por ejemplo, G-CSF), puede ser influenciado, entre otros, por los siguientes procedimientos: adsorción de la proteína sobre las paredes del recipiente, desnaturalización o degradación de la proteína, así como la formación de agregados, por ejemplo, dímero de proteína (por ejemplo dímero de G-CSF) y/o multímero de proteína (por ejemplo, multímero de G-CSF) y/o moléculas similares con una mayor masa molecular. Estos procedimientos pueden ser el resultado de diversos factores, por ejemplo, una temperatura incrementada, recipientes inadecuados, uso de estabilizantes inapropiados de proteínas, exposición a la luz, congelación/descongelación, procedimiento de producción inadecuado y/o almacenamiento inadecuado.

La composición farmacéutica de la presente invención puede estabilizar a la proteína (por ejemplo, G-CSF) a temperaturas por encima de la temperatura del refrigerador (2-8°C) y también a temperatura ambiente (es decir, por debajo de 25°C) e incluso a mayores temperaturas (por ejemplo, 40°C aproximadamente).

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender solo un excipiente farmacéuticamente aceptable, es decir, NDSB para la estabilización de la proteína (por ejemplo, G-CSF) y para el mantenimiento del pH adecuado de la solución. Por tanto, según otro aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un ingrediente farmacéutico activo (como se ha definido anteriormente) y una NDSB como único excipiente adicional. La NDSB de la composición farmacéutica representa una molécula protectora que

estabiliza a la proteína y por tanto es representativa de estabilizantes de proteínas que se utilizan en otras composiciones farmacéuticas (por ejemplo, azúcares, aminoácidos y otros), así como una molécula que ajusta un pH adecuado de la solución y que, de este modo, se emplea en lugar de ácidos (por ejemplo, ácidos acético, cítrico, metanosulfónico, fosfórico, clorhídrico y otros), que se emplean para el ajuste del pH adecuado de la solución en otras composiciones farmacéuticas. Las NDSBs pueden mantener también un pH adecuado y, por tanto, sustituyen a diversos sistemas tampón y/o sus combinaciones empleados en otras composiciones farmacéuticas (por ejemplo, ácido acético/acetato, ácido glutamínico/glutamato, ácido maleico/maleato, ácido cítrico/citrato, ácido fosfórico/fosfato y otros). En comparación con el uso de dos o más moléculas con diferentes funciones, el uso de una molécula con varias funciones diferentes es mejor en lo que se refiere a la economía de la preparación, costes más bajos, así como una preparación más sencilla y rápida de la composición farmacéutica, y también para el propio paciente, en lo que se refiere a la ingesta de menos sustancias adicionales en el cuerpo. Las características de la NDSB presentan una ventaja adicional ya que se trata de una molécula simple que no es sensible a la luz, temperatura, varios agentes oxidantes (por ejemplo, oxígeno del aire), hidrólisis, no es una molécula químicamente reactiva, tiene la naturaleza de un zwitterión en un amplio intervalo de pH, lo cual significa que el mecanismo de interacción en un amplio intervalo de pH no cambia sustancialmente.

Un aspecto de la presente invención reside en el uso de una NDSB como estabilizante en una composición farmacéutica. Un aspecto de la presente invención reside en el uso de una NDSB como un estabilizante de proteína en una composición farmacéutica. Un aspecto de la presente invención reside en el uso de NDSB como un agente para ajustar el pH en una composición farmacéutica. Un aspecto de la presente invención reside en el uso de una NDSB como un agente tampón en una composición farmacéutica.

La composición farmacéutica preferida de la presente invención es una composición farmacéutica líquida; sin embargo, esto no limita el uso de las NDSBs en composiciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden proteína en el contexto de la presente invención.

La composición farmacéutica de la presente invención permite la administración parenteral, subcutánea, intravenosa o intramuscular sin reconstitución, dilución o adición antes de la preparación, lo cual podría conducir a un descenso de la actividad del ingrediente farmacéutico activo, por ejemplo proteína, tal como G-CSF y a otros problemas técnicos en el momento de la administración.

Con preferencia, la composición farmacéutica de la presente invención no contiene proteínas de suero humano con las cuales es posible una contaminación vírica. De este modo, se reduce la probabilidad de aparición de varias reacciones alérgicas, que podrían ser el resultado de la administración de albúmina de suero humano. Se prepara en solución isotónica la cual es farmacéuticamente aceptable y no causa efectos indeseables.

En la composición farmacéutica de la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína corresponde a cantidades terapéuticamente eficaces de proteína que están presentes en el mercado en el caso de utilizar G-CSF, y la cantidad terapéuticamente eficaz de G-CSF se elige en el intervalo de 0,3 mg/ml a 1,2 mg/ml, lo cual, sin embargo, no limita la presente invención.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede emplear para la preparación de medicamentos (para tratamiento) y para tratamiento de enfermedades indicadas para proteínas terapéuticamente eficaces, enumeradas anteriormente. La composición farmacéutica de la presente invención también se puede emplear para el tratamiento de todas las enfermedades y para la preparación de medicamentos para el tratamiento de todas las enfermedades para las cuales está indicado el G-CSF. Las enfermedades indicadas se pueden seleccionar del grupo consistente en: neutropenia y sus secuelas clínicas, hospitalización reducida en neutropenia febril después de quimioterapia, movilización de células germinales hematopoiéticas, infusión alternativa de leucocitos de donantes, neutropenia crónica, infecciones neutropénicas y no neutropénicas, receptores de trasplantes, enfermedades inflamatorias crónicas, sepsis y shock séptico, riesgo reducido, morbilidad reducida, mortalidad reducida y número reducido de días de hospitalización en infecciones neutropénicas y no neutropénicas, prevención de infecciones y complicaciones de infecciones en pacientes neutropénicos y no neutropénicos, prevención de infecciones nosocomiales, y mortalidad y frecuencia reducidas de infecciones nosocomiales, aplicación enteral a niños recién nacidos, refuerzo del sistema inmunológico de neonatos, mejora del resultado clínico en pacientes en unidades de cuidado intensivo y en pacientes con enfermedades críticas, vacunación y control de quemaduras, úlceras y lesiones de la piel, intensificación de la quimioterapia y/o radioterapia, pancitopenia, incremento de citoquinas anti-inflamatorias, reducción de los intervalos de quimioterapia de altas dosis con uso profiláctico de G-CSF, potenciación de efectos antitumorales de la terapia fotodinámica, prevención y control de enfermedades causadas por diversas disfunciones cerebrales, tratamiento de enfermedades trombóticas y sus complicaciones y recuperación de la eritropoiesis después de la radiación.

Un aspecto de la presente invención reside en el uso de una NDSB en la preparación de una composición farmacéutica.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede introducir en envases farmacéuticos seleccionados del grupo consistentes en ampollas, jeringas de inyección y viales. Este envasado farmacéutico permite la aplicación en volúmenes del orden de 0,2 ml a 2 ml (por dosis). Además, el objeto de la invención consiste también en el procedimiento para la preparación de la composición farmacéutica de la presente invención. El procedimiento para la preparación de la composición farmacéutica de la presente invención comprende mezclar una NDSB con una cantidad terapéuticamente eficaz de un ingrediente farmacéutico activo (por ejemplo, proteína, tal como G-CSF).

ES 2 308 292 T3

La presente invención se ilustra con detalle por medio de los siguientes ejemplos, los cuales no significan una restricción de la misma. En particular, los ejemplos se refieren a modalidades preferidas de la presente invención.

Ejemplos

Métodos analíticos

Se emplean los siguientes métodos para el análisis de la composición farmacéutica de la presente invención: cromatografía líquida de alta resolución con exclusión de tamaños (SE-HPLC), HPLC en fase inversa (RP-HPLC), electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) y medición de la actividad biológica *in vitro*.

SE-HPLC

La SE-HPLC se emplea para determinar concentraciones de agregados de G-CSF, en particular de dímeros y agregados superiores. El límite de detección para la determinación de dímeros y agregados superiores es de 0,01%. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) consiste en: un detector UV, un desgasificador en línea, un módulo de bomba binario y un auto-muestreador termostatado (por ejemplo, Waters Alliance HPLC systems). El análisis se efectúa bajo las siguientes condiciones:

Condiciones cromatográficas

Columna: TSK G3000 SW, 10 μ m, 300 x 7,5 mm DI

Temperatura columna: 30°C

Fase móvil: tampón fosfato pH 7,0 (5 mM fosfato sódico, 50 mM NaCl)

Velocidad de flujo: 0,8 ml/min, manera isocrática

Detección: detector UV, longitud de onda 215 nm

Volumen de inyección: 20 μ l (cantidad de la proteína inyectada: 6-12 μ g)

Temperatura del auto-muestreador: +2 a +8°C

Tiempo de trabajo: 20 minutos.

RP-HPLC

La RP-HPLC se emplea para determinar el contenido en G-CSF y para la determinación cuantitativa de impurezas que varían de acuerdo con el grado de hidrofobicidad. El sistema HPLC consiste en: un detector UV, un desgasificador en línea, un módulo de bomba binario y auto-muestreador termostatado, así como un departamento de columna termostatado (por ejemplo, Waters Alliance HPLC systems). El análisis se efectúa bajo las siguientes condiciones:

Condiciones cromatográficas

Columna: YMC-Pack ODS-AQ, 200 A, esférica, 3 μ m, 150 x 4,6 mm d.i..

Temperatura columna: 65°C

Fase móvil: fase A: 0,1% ácido trifluoracético (TFA) y 50% acetonitrilo (ACN) en agua

Fase B: 0,1% TFA y 95% ACN en agua para HPLC

Velocidad flujo: 1,0 ml/min, gradiente:		
	Tiempo [min]	Fase móvil B [%]
	0,0	8
	4,0	8
	19,0	28
	19,1	100
	21,0	100
	21,1	8
	25,0	8

ES 2 308 292 T3

Detección: detector UV, longitud de onda 215 nm

Volumen de inyección: 10 µl (cantidad inyectada de proteína: 3-6 µg)

5 Temperatura auto-muestreador: +2 a +8°C

Tiempo de trabajo: 25 minutos.

SDS-PAGE

10

La SDS-PAGE se emplea para la detección visual de dímeros de proteína presentes y de otras formas agregadas (trímeros y formas con alta masa molecular). Las muestras de carga se preparan en el tampón de carga libre de agente reductor. La SDS-PAGE vertical, NuPAGE Bis-Tris 12% gel 8 x 8 cm, espesor 1,0 mm, 15 carriles (Invitrogen) en tampón de electroforesis MOPS SDS (Invitrogen). La electroforesis se efectúa durante 1 hora a voltaje constante de 15 200 V. Las muestras son teñidas con color azul Commassie (0,1% Phast Gel Blue R 350 en 30% de metanol).

Ensayo de la actividad biológica *in vitro* de G-CSF

La actividad biológica de G-CSF se determina por el método basado en la estimulación de la proliferación celular 20 (células NFS-60) empleando el método conocido (Hammerling, U. *et al.* en J Pharm Biomed Anal 13, 9-20 (1995)) y el uso de G-CSF recombinante humano estándar internacional G-CSF (88/502, células de levadura derivada; NIBSC Potters Bar, Hertfordshire, UK; véase Mire-Sluis, A.R. *et al.* v J Immunol Methods 179, 117-126 (1995)).

Medición del valor pH

25

El pH se mide empleando un medidor de pH MA 5741 (Iskra) y electrodos Biotrode (Hamilton). El medidor del pH es calibrado en el intervalo de pH de 3,0 a 5,0 con tampones de calibración nuevos adecuados. El pH se mide a una temperatura de 25°C. La desviación estándar de la medición del pH es de 0,003 del valor pH (0,3%).

30 *Condiciones para el ensayo de la estabilidad de G-CSF en composiciones farmacéuticas*

4°C : guardado en refrigerador a la temperatura del refrigerador (del orden de +4°C a +6°C)

40°C : guardado a 40°C ± 2°C

35

25°C : guardado a temperatura ambiente entre 25°C y 30°C en jeringas cargadas de 1 ml durante el sacudido a 75 rpm en el sacudidor Vibromix 314EVT

40 Ejemplo 1

Ensayos de estabilidad

Se preparan las siguientes composiciones farmacéuticas líquidas:

45

FP1	0,3 mg/ml G-CSF, 39 mM NDSB, 5 mM Na EDTA, pH 4,4
FP2	0,3 mg/ml G-CSF, 39 mM NDSB, 5 mM Na EDTA, 5% DMSO pH 4,4
FP3	0,3 mg/ml G-CSF, 7 mM NDSB, 5% sorbitol, pH 4,4
50 FP4	0,6 mg/ml G-CSF, 6 mM NDSB, 8% sorbitol, pH 4,6
FP5	0,6 mg/ml G-CSF, 13 mM NDSB, 8% sorbitol, pH 4,3
FP6	0,6 mg/ml G-CSF, 10 mM NDSB, 8% sorbitol, pH 4,5
FP7	0,6 mg/ml G-CSF, 10 mM NDSB, 5% sorbitol, pH 4,4
55 FP8	0,6 mg/ml G-CSF, 10 mM NDSB, 10% sorbitol, pH 4,4
FP9	0,6 mg/ml G-CSF, 10 mM NDSB, 8% inositol, pH 4,4
FP10	0,6 mg/ml G-CSF, 10 mM NDSB, 8% trehalosa, pH 4,4
FP11	0,6 mg/ml G-CSF, 50 mM NDSB, 8% sorbitol, pH 4,9,

· Composición farmacéutica de referencia:

60

A (S16-10ACT): 0.3 mg/ml G-CSF, 10 mM ácido acético, 5% (m/v) sorbitol, 0,004% Tween 80, pH ajustado a 4,0 con NaOH (idéntico a Neupogen).

65 Las muestras con una concentración de G-CSF de 0,6 mg/ml se guardan a 40°C durante 1 mes. Las mismas se analizan empleando SE-HPLC; en la columna se cargan 6 µg de G-CSF. La figura 1 muestra los respectivos resultados (AU = unidad de absorción).

ES 2 308 292 T3

Leyenda de la figura 1

- 1 FP1
2 FP2
R S16-10ACT

Las muestras con una concentración de G-CSF de 0,6 mg/ml se guardan a 40°C durante 1 mes. Las muestras se analizan empleando SE-HPLC; la carga de G-CSF en la columna es de 6 µg. Los resultados se muestran en la figura 2 (AU = unidad de absorción).

Leyenda de la figura 2

- 4 FP4
5 FP5
9 FP9

Resultados de los ensayos de estabilidad

El análisis SE-HPLC de las muestras FP1 y FP2, guardadas durante 1 mes a 40°C, demuestra que las muestras son estables ya que no existe un incremento visible del contenido en agregados y productos de degradación hidrófobos (tabla 1, figura 1). La estabilidad es comparable a la de la muestra de referencia (AS16-10ACT) que es idéntica a la composición farmacéutica que comprende G-CSF y disponible en el mercado (Neupogen, G-CSF = 0,3 mg/ml). La estabilidad se confirma también mediante análisis RP-HPLC el cual no muestra cambios esenciales en impurezas o en el contenido en proteína después del periodo de almacenamiento. Estos resultados están de acuerdo con los resultados del análisis SDS-PAGE (los resultados no se indican) y con la medición *in vitro* de la actividad biológica. La actividad biológica *in vitro* de G-CSF, que se emplea en los estudios, es al nivel de la referencia internacional (Cat. No. 88/502; NIBSC, UK). La actividad biológica *in vitro* de las muestras FP1 y FP2 no cambia después del almacenamiento bajo las condiciones del ensayo (los resultados no se muestran).

TABLA 1

	NDSB	pH	Excipiente	Periodo almacenamiento	Temperatura	Dímeros (SE-HPLC)	Agregados superiores (SE-HPLC)
AS16-10ACT c = 0,3 mg/ml	-	4,0	Tween 80 sorbitol	1 m	40° C	0,00%	0,13%
FP1	39 mM	4,4	EDTA	1 m	40° C	0,00%	0,18%
FP2	39 mM	4,4	EDTA DMSO	1 m	40° C	0,00%	0,23%
FP3	7 mM	4,4	sorbitol	1 m	40° C	0,00%	1,02%
m: mes; %: cantidad dímero/agregados superiores con referencia a la cantidad total de G-CSF; c = concentración de G-CSF							

Los resultados demuestran que la estabilidad de las composiciones farmacéuticas que comprenden NDSBs es comparable a la de la muestra de referencia (AS16-10ACT). Las mayores concentraciones de NDSB revelan un efecto más favorable sobre la estabilidad. El análisis SE-HPLC de las muestras de FP4 a FP11, guardadas a 25°C durante 1 semana y 1 mes, demuestra que las muestras son estables ya que no existe incremento observable en el contenido en agregados y en productos de degradación hidrófobos (tabla 2, figura 2). La estabilidad es comparable a la de la muestra de referencia (AS16-10ACT) que es idéntica a la composición farmacéutica que comprende G-CSF y disponible en el mercado (Neupogen, G-CSF = 0,3 mg/ml). La estabilidad se confirma también mediante análisis RP-HPLC el cual no muestra cambios esenciales en impurezas o en el contenido en proteína después del periodo de almacenamiento. Estos resultados están de acuerdo con los resultados del análisis SDS-PAGE (los resultados no se indican) y con la medición *in vitro* de la actividad biológica. La actividad biológica *in vitro* de G-CSF, que se emplea en los estudios, es al nivel de la referencia internacional (Cat. No. 88/502; NIBSC, UK). Después del almacenamiento bajo las condiciones del estudio, cambia la actividad biológica *in vitro* de las muestras de FP4 a FP11 (los resultados no se muestran).

TABLA 2

Muestra	pH	Excipiente	Periodo almacenamiento	Temperatura	Dímeros (SE-HPLC)	Agregados superiores (SE-HPLC)	Contenido proteína (RP-HPLC)
FP4 6 mM NDSBs	4,6	sorbitol 8%	1 w	40° C	0,07%	0,21%	99,4%
			1 m	40° C	0,00%	1,8%	95,3%
			1 w sacudido	25° C	0,03%	0,07%	99,6%
FP5 13 mM NDSBs	4,3	sorbitol 8%	1 w	40° C	0,10%	0,18%	96,5%
			1 m	40° C	0,00%	1,63%	93,9%
			1 w sacudido	25° C	0,00%	0,07%	97,4%
FP6 6 mM NDSBs	4,5	sorbitol 8%	1 w	40° C	0,13%	0,18%	98,8%
			1 m	40° C	0,00%	1,82%	96,0%
			1 w sacudido	25° C	0,05%	0,07%	99,2%
FP7 10 mM NDSBs	4,4	sorbitol 5%	1 w	40° C	0,18%	0,17%	98,6%
			1 m	40° C	0,00%	1,18%	95,1%
			1 w sacudido	25° C	0,02%	0,04%	99,4%
FP8 10 mM NDSBs	4,4	sorbitol 10%	1 w	40° C	0,11 %	0,18%	98,4%
			1 m	40° C	0,00%	1,9%	95,8%
			1 w sacudido	25° C	0,03%	0,08%	99,6%
FP9 10 mM NDSBs	4,4	inositol 8%	1 w	40° C	0,10%	0,09%	98,4%
			1 m	40° C	0,00%	0,97%	95,6%
			1 w sacudido	25° C	0,16%	0,08%	99,4%
FP10 10 mM NDSBs	4,4	tetrahalosa 8%	1 w	40° C	0,35%	0,25%	98,4%
			1 m	40° C	0,00%	2,08%	95,2%
			1 w sacudido	25° C	0,50%	0,11 %	99,0%
FP11 50 mM NDSBs	4,9, pH con NaOH	sorbitol 8%	1 w	40° C	0,16%	0,05%	97,0%
			1 m	40° C	0,14%	0,85%	89,1%
			1 w sacudido	25° C	0,05%	0,05%	99,1 %

w: semana, m: mes; %: cantidad dímero/agregados superiores con referencia a la cantidad total de G-CSF; % poliol: m/v

Los resultados de la tabla 2 demuestran que las composiciones farmacéuticas con la adición de NDSBs son estables. Se observa una ligera reducción de la estabilidad con respecto a la muestra de referencia (tabla 1) en muestras que son expuestas a condiciones más extremas (1 mes, 40°C). También es posible que resulte una ligera reducción de la estabilidad debido a que un pH por encima de 4,0 no es favorable para G-CSF, lo cual es también evidente a partir del estado de la técnica. La muestra de referencia se prepara empleando un pH de 4,0.

Ejemplo 2

Composición de las composiciones farmacéuticas de G-CSF de la invención

En la tabla 3 se ofrecen las composiciones de las composiciones farmacéuticas de la invención.

TABLA 3

Muestra	Contenido G-CSF (mg/ml)	Ingredientes inactivos	pH
FP1	0,3	39 mM NDSB, 5 mM Na EDTA, 5% DMSO	4,4
FP2	0,3	39 mM NDSB, 5 mM Na EDTA	4,4
FP3	0,3	7 mM NDSB, 8% sorbitol	4,4
FP4	0,6	6 mM NDSB, 8% sorbitol	4,6
FP5	0,6	13 mM NDSB, 8% sorbitol	4,3
FP6	0,6	10 mM NDSB, 8% sorbitol	4,5
FP7	0,6	10 mM NDSB, 5% sorbitol	4,4
FP8	0,6	10 mM NDSB, 10% sorbitol	4,4
FP9	0,6	10 mM NDSB, 8% inositol	4,4
FP10	0,6	10 mM NDSB, 8% trehalosa	4,4

ES 2 308 292 T3

Preparación del concentrado en bruto

El material de partida de G-CSF para la preparación de un concentrado en bruto se produce mediante la expresión en *E. coli*. El concentrado en bruto se prepara en solución con ácido puro (ácido acético o HCl) a pH 4,4 empleando una concentración de G-CSF de 1,5 mg/ml. El análisis SE-HPLC del concentrado en bruto demuestra que el contenido en dímeros y agregados superiores está por debajo del límite de detección. El análisis de impurezas, determinado por el análisis RP-HPLC, es del orden de 2-4%. (El análisis RP-HPLC de una muestra reciente de Neupogen revela una cantidad comparable de impurezas).

Calidad de las sustancias

NDSB: NDSB-195 (Calbiochem) para análisis, sorbitol: calidad Ph. Eur.; glicerol: Merck; para análisis; inositol: mio-inositol (Fluka: > 99,5% HPLC), trehalosa (Fluka: > 99,5% HPLC), EDTA (Sigma: 99%), DMSO (Merck: > 99,5%), Tween 80 (Sigma, bajo nivel de peróxido, contiene BHT como antioxidante); agua para inyección: calidad Ph. Eur.; agua para análisis: Milli-Q (Millipore).

Preparación de una composición farmacéutica de referencia

Las fracciones de la filtración en gel que comprenden el monómero de G-CSF son reunidas y sustituidas por tampón que contiene 10 mM de ácido acético y 5% de sorbitol en agua para inyección. El pH del tampón se ajusta a 3,96 con solución de NaOH. La sustitución se efectúa en el Labscale™ TFF System/Millipore, empleando tres membranas Ultracel-5 PLCCC. Se añade Tween 80 hasta obtener una concentración de 0,004%. El pH de la solución final después de la sustitución es de 4,0, con una concentración de 0,304 mg/ml.

Preparación de las composiciones farmacéuticas de la invención

General

Las composiciones farmacéuticas de la invención se preparan por dilución del concentrado en bruto con una solución tampón estéril adecuada, previamente filtrada a través de un filtro 0,2 PES/Nalgene. La concentración final de G-CSF es de 0,3 mg/ml o 0,6 mg/ml, respectivamente. Las composiciones farmacéuticas FP1 y FP2 se introducen en viales de 2 ml de vidrio incoloro, tipo hidrolítico I, se lavan, se esterilizan y se cierran con cierres de caucho de bromobutilo, equipados con cápsulas de aluminio. Otras composiciones farmacéuticas (FP3 a FP11) se introducen (manualmente) en jeringas de inyección (volumen 1,3-1,4 ml), de manera que exista una cantidad mínima de aire alrededor del cierre.

FP1, FP2, FP3: A una porción del concentrado en bruto se añaden 4 porciones de la solución tampón adecuada. Se obtienen las concentraciones finales indicadas en la tabla 3. El pH deja ya de ser ajustado.

FP4-PF11: A 4 porciones del concentrado se añaden 6 porciones de la solución con un tampón adecuado. Se obtienen las concentraciones finales indicadas en la tabla 3. El pH deja ya de ser ajustado.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un ingrediente farmacéutico activo y una sulfobetaína no detergente (NDSB).

2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde el ingrediente farmacéutico activo se elige del grupo consistente en una molécula orgánica, sintética o natural, terapéuticamente eficaz, y una proteína terapéuticamente eficaz.

3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2, en donde la proteína terapéuticamente eficaz se elige del grupo consistente en factor de estimulación de colonias de granulocitos, interferones; interleuquinas, factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrofagos; factor de estimulación de colonias de macrofagos; factor de crecimiento epidérmico; eritropoietina; hormona estimuladora de folículos; albúmina de suero humano, deoxirribonucleasa; calcitonina de fibroblastos; hematoproteína; activadores plasminogénicos y sus precursores; citoquinas; familia de ligandos de TNF; receptores solubles; hormona de crecimiento; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina, insulina, proinsulina, subunidad A de insulina, subunidad B de insulina; glucágonos; factores de coagulación de la sangre; bombasina; trombina; encefalinasa; proteína inflamatoria de macrófagos (MIP 1-alfa); subunidad A de relaxina, subunidad B de relaxina, prorrelaxina; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; receptores de hormonas o receptores de factores de crecimiento; integrinas; proteína A, proteína B; factores reumatoides; factor neurotrófico derivado de huesos, neurotropina-3,-4,-5 o -6; factor de crecimiento de nervios; factor de crecimiento derivado de plaquetas; factor de crecimiento de fibroblastos; factor de crecimiento transformado; factor de crecimiento de tipo insulina; trombopoietina; proteína morfogenética ósea y superóxido dismutasa.

4. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3, en donde la proteína terapéuticamente eficaz es G-CSF.

5. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la NDSB es una sal de amonio cuaternario en donde los grupos R1, R2, R2 y R4-SO₃ están enlazados al átomo de nitrógeno central y en donde R1, R2 y R3 pueden ser iguales y/o diferentes y se eligen del grupo consistente en metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo o sus derivados, y R4 es (CH₂)_n en donde n está comprendido entre 1 y 6.

6. Una composición farmacéutica según la reivindicación 5, en donde la NDSB se elige del grupo consistente en sal de dimetiletil-(3-sulfopropil)-amonio, 3-(1-piridino)-1-propanosulfonato, propanosulfonato de dimetilbencilamonio, sal de dimetil-t-butil-(3-sulfopropil)amonio, 3-(1-metilpiperidin)-1-propanosulfonato y sal de dimetil-(2-hidroxietil)-(sulfopropil)amonio.

7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 6, en donde la NDSB es sal de dimetil-t-butil-(3-sulfopropil)amonio.

8. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha composición comprende además un poliol.

9. Una composición farmacéutica según la reivindicación 8, en donde el poliol se elige del grupo consistente en sorbitol, glicerol, inositol, trehalosa y manitol.

10. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha composición comprende además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10, en donde el excipiente farmacéuticamente aceptable se elige del grupo consistente en EDTA y DMSO.

12. Procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica, en donde dicha composición farmacéutica se prepara mezclando una NDSB con una cantidad terapéuticamente eficaz de un ingrediente farmacéutico activo.

13. Uso de una NDSB en la preparación de una composición farmacéutica.

14. Uso de una NDSB como estabilizante en una composición farmacéutica.

15. Uso de una NDSB como un agente tampón en una composición farmacéutica.

16. Uso de una NDSB como agente regulador del pH en una composición farmacéutica.

Figura 1

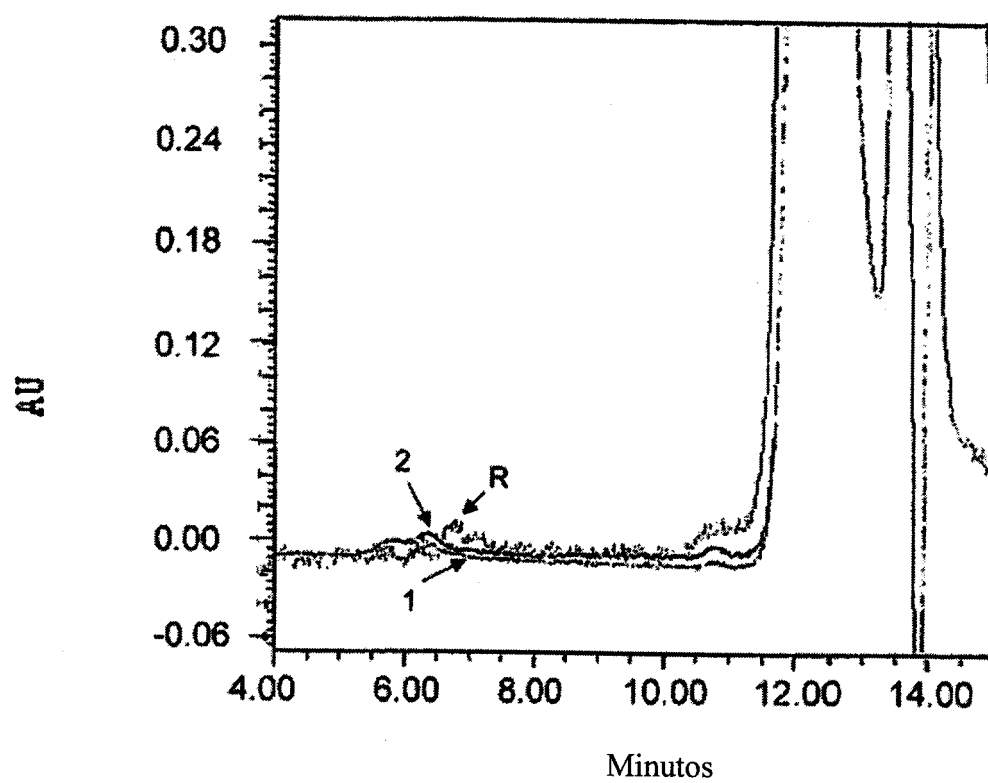


Figura 2

