

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 843 685**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01)
C07K 14/505	(2006.01)
A61K 38/18	(2006.01)
A61K 47/02	(2006.01)
A61K 47/12	(2006.01)
A61K 47/18	(2007.01)
A61K 47/26	(2006.01)
A61K 47/60	(2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2015 PCT/IB2015/051462**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15150930**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2015 E 15772815 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2020 EP 3125922**

54 Título: **Composición farmacéutica líquida de eritropoyetina conjugada**

30 Prioridad:

29.03.2014 IN 1366MU2014

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2021

73 Titular/es:

**INTAS PHARMACEUTICALS LIMITED (100.0%)
Corporate House, Nr. Sola Bridge, S.G. Highway,
Thaltej
Ahmedabad - 380054, Gujrat, IN**

72 Inventor/es:

**CHHATBAR, CHANDRESH;
PANDEY, VIJAYKANT y
CHAUHAN, NILDIP**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 843 685 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 líquida de eritropoyetina conjugada

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta aplicación está relacionada con la aplicación provisional de la India 1366/MUM/2014 presentada el 29 de marzo de 2014.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida que comprende eritropoyetina conjugada, tampón, azúcar, modificador de tonicidad y un aminoácido como inhibidor de la agregación.

15 **Antecedentes de la invención**

20 La eritropoyetina (EPO) es una hormona glucoproteica que estimula a las células rojas de la sangre mediante un procedimiento conocido como eritropoyesis. La EPO se produce en el riñón y estimula la división y diferenciación de los progenitores eritroides comprometidos en la médula ósea. En pacientes con insuficiencia renal, los niveles séricos de EPO permanecen bajos, también pueden observarse niveles séricos inapropiadamente bajos de EPO en pacientes anémicos con cáncer, infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), colitis ulcerosa y anemia de células falciformes. Para todas estas indicaciones y para disminuir la tasa de transfusión de sangre, la EPO se establece como un tratamiento eficaz.

25 La rHu EPO es una glucoproteína que contiene 165 aminoácidos producida mediante la tecnología de ADN recombinante en líneas de células animales como las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) y riñón de hámster bebé (BHK). La eritropoyetina humana recombinante (rHu EPO) tiene las mismas propiedades biológicas que la eritropoyetina endógena secretada en humanos. Tiene un peso molecular de aproximadamente 36.000 dalton con una fracción de carbohidrato que compone aproximadamente el 30 % del peso molecular.

30 La tecnología de pegilación ha surgido como un medio para mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los productos biofarmacéuticos. Algunos de los beneficios de la pegilación incluyen propiedades clínicas mejoradas, solubilidad mejorada, absorción y liberación sostenidas, inmunogenicidad y proteólisis reducidas, aclaramiento reducido de la circulación por los riñones, intervalos de dosificación aumentados debido a vidas medias in vivo más altas debido a un mayor tiempo de circulación y similares. La circulación más prolongada de la eritropoyetina da como resultado efectos terapéuticos beneficiosos tales como la prolongación de su presencia en el cuerpo humano, el tratamiento terapéutico eficaz de la enfermedad y sus afecciones.

40 La eritropoyetina pegilada (MIRCERA® de Roche) es una forma recombinante pegilada de la EPO humana. La eritropoyetina usada para generar MIRCERA® es el principio activo de Neorecormon® (epoetina beta; la EPO recombinante de Roche aprobada por primera vez para uso médico general en la UE en 1996). La fracción de PEG usada es ácido metoxipolietilenglicol-succinimidilbutanoico (PEG-SBA); un PEG activado químicamente lineal de 30 kDa. El PEG-SBA forma espontáneamente enlaces amida con el grupo amino N-terminal de la EPO o con el grupo ε-amino de un residuo de lisina de superficie accesible (Lys 45 o Lys 52). El producto final generado es un producto monopegilado de 60 kDa.

50 El documento US4992419 divulga una preparación de proteína humana compatible y estable al almacenamiento que contiene una proteína humana, un tampón fisiológicamente compatible y opcionalmente, formadores de complejos, agentes de ajuste de la isotonicidad, cloruro de calcio y otros materiales habituales para inyección que, en forma inyectable, contienen de 5 a 50 g/litro de urea, de 1 a 50 g/litro de aminoácidos y de 0,05 a 5 g/litro de agente humectante no iónico. También es divulgado un procedimiento para la producción de esta preparación.

55 Los documentos US6120761 y US7011825 divulgan una preparación en solución de eritropoyetina que contiene un aminoácido como estabilizador y que tiene una excelente estabilidad de almacenamiento a largo plazo.

60 El documento US7202208 divulga una composición farmacéutica líquida que consiste esencialmente en una proteína eritropoyetina, un anión inorgánico de carga múltiple en un tampón farmacéuticamente aceptable adecuado para mantener el pH de la solución en el rango de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,0 y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Esta composición es especialmente útil para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades relacionadas con la eritropoyesis.

65 El documento US7842661 divulga conjugados entre eritropoyetina y restos de PEG. Los conjugados se unen a través de un grupo de unión de glucosilo intacto interpuesto y unido covalentemente al péptido y al grupo modificador. Los conjugados se forman a partir de péptidos glicosilados por la acción de una glucosiltransferasa. La glucosiltransferasa liga una fracción de azúcar modificado a un residuo de glucosilo en el péptido. También se

proporcionan procedimientos para preparar los conjugados, procedimientos para tratar diversas enfermedades con los conjugados y formulaciones farmacéuticas que incluyen los conjugados.

5 El documento IN220067 divulga una nueva composición farmacéutica estable de eritropoyetina (EPO) que se estabiliza con una combinación de un poliol poloxámero y un alcohol polihídrico.

10 El documento IN234438 divulga una formulación acuosa de eritropoyetina humana, que comprende la eritropoyetina humana tal como la que se describe en la presente memoria en el intervalo de 100 UI/ml a 120.000 1U/ml; un tensioactivo no iónico tal como el que se describe en la presente memoria en el rango de 0,0001 a 0,01 % (p/v), un alcohol polihídrico tal como el que se describe en la presente memoria en el rango de 0,001 a 2 % (p/v), un amino ácido neutro tal como el que describe en la presente memoria en el intervalo de 0,001 a 2 % (p/v) y un alcohol de azúcar tal como el que se describe en la presente memoria en el intervalo de 0,1 a 1,0 % (p/v) como estabilizadores; un reactivo isotónico tal como el que describe en la presente memoria en el intervalo de 0,001 a 0,7 % (p/v); y un reactivo tamponador tal como el que describe en la presente memoria en el intervalo de 1 mM a 50 mM y en el intervalo de pH 6,0 a 7,5.

15 Sin embargo, la biodisponibilidad de las terapias proteicas disponibles comercialmente, como la EPO, está limitada por su corta vida media en plasma y su susceptibilidad a la degradación de la proteasa. Estas deficiencias les impiden alcanzar la máxima potencia clínica.

20 A pesar del progreso revolucionario en la fabricación a gran escala de proteínas para uso terapéutico, la entrega efectiva y conveniente de estos agentes en el cuerpo sigue siendo un desafío importante debido a sus propiedades fisicoquímicas intrínsecas, tales como el gran tamaño molecular, la autoasociación, la inestabilidad física y química, la agregación y la adsorción. Por tanto, se requiere una nueva formulación que pueda superar toda esta inestabilidad de la formulación disponible en la técnica anterior.

Objeto de la invención

30 La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del ámbito de las reivindicaciones se proporciona solo con propósitos informativos.

35 La presente invención está dirigida a una formulación farmacéutica líquida que comprende eritropoyetina pegilada (PEG-EPO), un tampón que se selecciona del grupo que consiste en acetato, arginina, histidina, succinato o una combinación de estos, arginina como inhibidor de la agregación, cloruro de sodio como modificador de la tonicidad y sacarosa como estabilizador, en el que el pH de la formulación está entre 4,9 y 5,3.

40 La presente invención también está dirigida a una composición en forma de jeringa precargada, que comprende la formulación farmacéutica líquida de la reivindicación 1, que comprende PEG-EPO, acetato como tampón, arginina como inhibidor de la agregación, cloruro de sodio y sacarosa, en la que,

- a) la PEG-EPO está en una concentración de 0,05 a 1,6 mg/mL
- b) el tampón de acetato está en una concentración de 3,8 mg/mL
- c) la arginina está en una concentración de 8,5 mg/mL
- d) el cloruro de sodio está en una concentración de 2,9 mg/mL
- 45 e) la sacarosa está en una concentración de 30,0 mg/mL
- f) el pH es de 4,9 a 5,3.

50 El objeto principal de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de proteína conjugada junto con vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable que comprende una eritropoyetina conjugada, un tampón seleccionado del grupo que consiste en acetato, arginina, histidina, succinato o una combinación de estos, arginina como inhibidor de la agregación, cloruro de sodio como modificador de la tonicidad, sacarosa como estabilizador y el pH de la composición está entre 4,9 y 5,3.

55 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de eritropoyetina conjugada que comprende un sistema tampón seleccionado del grupo que consiste en acetato, succinato, histidina, arginina, ya sea solo o una combinación de estos.

60 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de eritropoyetina conjugada que comprende sacarosa como estabilizador.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de eritropoyetina conjugada que comprende arginina como inhibidor de la agregación.

65

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de eritropoyetina conjugada que comprende cloruro de sodio como modificador de la tonicidad.

5 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de eritropoyetina conjugada que no comprende el uso de un tensioactivo para estabilizar la composición proteica.

10 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de eritropoyetina conjugada en la que la formulación se mantiene a un pH de aproximadamente 4,9 a 5,3, en un sistema tampón seleccionado del grupo que consiste en acetato, succinato, histidina, arginina ya sea sola o una combinación de estos.

15 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable que incluya eritropoyetina conjugada que comprenda tampón acetato, sacarosa, arginina, cloruro de sodio y se mantenga a un pH de aproximadamente 4,9 a 5,3.

Sumario de la invención

20 La presente invención está dirigida a una formulación farmacéutica líquida que comprende eritropoyetina pegilada (PEG-EPO), un tampón que se selecciona del grupo que consiste en acetato, arginina, histidina, succinato o una combinación de estos, arginina como inhibidor de la agregación, cloruro de sodio como modificador de la tonicidad y sacarosa como estabilizador, en el que el pH de la formulación está entre 4,9 y 5,3.

25 La presente invención también está dirigida a una composición en forma de jeringa precargada, que comprende la formulación farmacéutica líquida de la reivindicación 1, que comprende PEG-EPO, acetato como tampón, arginina como inhibidor de la agregación, cloruro de sodio y sacarosa, en la que,

- 30 a) la PEG-EPO está en una concentración de 0,05 a 1,6 mg/mL
b) el tampón de acetato está en una concentración de 3,8 mg/mL
c) la arginina está en una concentración de 8,5 mg/mL
d) el cloruro de sodio está en una concentración de 2,9 mg/mL
e) la sacarosa está en una concentración de 30,0 mg/mL
f) el pH es de 4,9 a 5,3.

35 El aspecto principal de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de proteína conjugada junto con vehículos farmacéuticamente aceptables.

40 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable que comprende una eritropoyetina conjugada, un tampón que se selecciona del grupo que consiste en acetato, arginina, histidina, succinato o una combinación de estos, arginina como inhibidor de la agregación, cloruro de sodio como modificador de la tonicidad, sacarosa como estabilizador y el pH de la composición está entre 4,9 y 5,3.

45 Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de eritropoyetina conjugada que comprende un sistema tampón seleccionado del grupo que consiste en acetato, succinato, histidina, arginina, ya sea solo o una combinación de estos.

Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de eritropoyetina conjugada que comprende sacarosa como estabilizador.

50 Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de eritropoyetina conjugada que comprende arginina como inhibidor de la agregación.

Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de eritropoyetina conjugada que comprende cloruro de sodio como modificador de la tonicidad.

55 Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de eritropoyetina conjugada que no comprende el uso de un tensioactivo para estabilizar la composición proteica.

60 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable de eritropoyetina conjugada en la que la formulación se mantiene a un pH de aproximadamente 4,9 a 5,3, en un sistema tampón seleccionado del grupo que consiste en acetato, succinato, histidina, arginina ya sea sola o una combinación de estos.

65 Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica estable que comprende eritropoyetina conjugada que comprende tampón acetato, sacarosa, arginina y cloruro de sodio y se mantiene a un pH de aproximadamente 4,9 a 5,3.

Breve descripción de las figuras

- 5 La Figura 1 muestra el perfil SE-HPLC comparativo de las Formulaciones 1, 2 de Peg-EPO (Tabla 1), RMP e INN-F en 0D, 5D, 10D y 15D.
- Las Figuras 2 y 3 muestran el perfil de gel reductor y no reductor comparativo para las composiciones de Peg-EPO en diferentes tampones incubados a 40 °C durante 2 días.
- 10 La Figura 4 muestra el perfil SE-HPLC comparativo de las Formulaciones 1, 2, 3 y 4 de Peg-EPO (Tabla-3) de 0D a 7D.
- La Figura 5 muestra el cromatograma SE-HPLC del estudio de pH 15D.
- 15 La Figura 6 muestra el porcentaje de potencia relativa de eritropoyetina pegilada (1,6 mg/mL en botella de PETG) cargada a -20 °C
- La Figura 7 muestra el porcentaje de pureza por SE-HPLC de eritropoyetina pegilada (1,6 mg/mL en botella de PETG) cargada a -20 °C
- 20 La Figura 8 muestra el porcentaje de potencia relativa de eritropoyetina pegilada (1,33 mg/mL en 1 mL de cilindro de jeringa de vidrio de tipo I USP) cargada a 5 °C
- La Figura 9 muestra el porcentaje de pureza por SE-HPLC de eritropoyetina pegilada (1,33 mg/mL en 1 mL de cilindro de jeringa de vidrio de tipo I USP) cargada a 5 °C
- 25 La Figura 10 muestra el porcentaje de potencia relativa de eritropoyetina pegilada (0,17 mg/mL en 1 mL de cilindro de jeringa de vidrio de tipo I USP) cargada a 5 °C
- La Figura 11 muestra el porcentaje de pureza por SE-HPLC de eritropoyetina pegilada (0,17 mg/mL en 1 mL de cilindro de jeringa de vidrio de tipo I USP) cargada a 5 °C
- 30 La Figura 12 muestra el porcentaje de potencia relativa de eritropoyetina pegilada (1,33 mg/mL en 1 mL cilindro de jeringa de vidrio de tipo I USP) cargada a 25 °C
- 35 La Figura 13 muestra el porcentaje de pureza por SE-HPLC de eritropoyetina pegilada (1,33 mg/mL en 1 mL de cilindro de jeringa de vidrio de tipo I USP) cargada a 25 °C
- La Figura 14 muestra el porcentaje de potencia relativa de eritropoyetina pegilada (0,17 mg/mL en 1 mL de cilindro de jeringa de vidrio de tipo I USP) cargada a 25 °C
- 40 La Figura 15 muestra el porcentaje de pureza por SE-HPLC de eritropoyetina pegilada (0,17 mg/mL en 1 mL de cilindro de jeringa de vidrio de tipo I USP) cargada a 25 °C
- 45 La Figura 16 muestra la superposición del cromatograma SE-HPLC de la composición de eritropoyetina conjugada
- La Figura 17 muestra un análisis de inmunotransferencia a 0D.
- 50 La Figura 18 muestra el análisis de inmunotransferencia en 1D, 3D, 7D y 15D.
- La Figura 19 muestra el análisis de pureza de eritropoyetina conjugada por SE-HPLC a 50 °C a 0D, 3D, 7D y 13D.

Descripción de la invención

- 55 La eritropoyetina usada en la presente invención es una eritropoyetina humana recombinante (rHu EPO). Es una glicoproteína que contiene 165 aminoácidos producida mediante la tecnología de ADN recombinante en líneas de células animales como las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) y riñón de hámster bebé (BHK). La eritropoyetina humana recombinante (rHu EPO) tiene las mismas propiedades biológicas que la eritropoyetina endógena secretada en humanos. Tiene un peso molecular de aproximadamente 36.000 dalton con una fracción de carbohidrato que compone aproximadamente el 30 % del peso molecular.
- 60 Las eritropoyetinas conjugadas son moléculas de eritropoyetina recombinantes unidas covalentemente a una molécula de polietilenglicol. En realizaciones preferentes, la eritropoyetina conjugada de la presente invención comprende eritropoyetina recombinante como se define mediante la determinación de una secuencia consenso de eritropoyetinas de origen natural que se unen covalentemente al polietilenglicol con un enlazador de la formulación
- 65

seleccionado del grupo que consiste en $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$, $-\text{OCO}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{OR}$ y monometoxi-PEG-nitrofenil carbamato/carbonato con el carbonilo de cada grupo polietileno formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino.

5 La presente invención proporciona una formulación farmacéutica estabilizada de proteína conjugada junto con vehículos farmacéuticamente aceptables.

10 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica estabilizada que comprende eritropoyetina conjugada, tampón, azúcar, modificador de la tonicidad y un aminoácido como inhibidor de la agregación en un intervalo de pH de 4,9 a 5,3.

15 El tampón se usa en la presente invención para mantener el pH en el intervalo de aproximadamente 4,9 a 5,3, y el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato, arginina, succinato e histidina solos o una combinación de estos.

El azúcar usado en la presente invención es sacarosa. La presencia de azúcares protege a las moléculas durante el almacenamiento a temperatura relativamente alta.

20 Los inhibidores de agregación reducen la tendencia de un polipéptido a formar agregados. Los aminoácidos como arginina, glicina, metionina y lisina tienden a reducir la agregación de la eritropoyetina conjugada en una formulación durante un período de tiempo prolongado.

25 Se entiende por modificador de tonicidad una molécula que contribuye a la osmolalidad de una solución. La osmolalidad de una composición farmacéutica se regula preferentemente con el fin de maximizar la estabilidad del ingrediente activo y también para minimizar la incomodidad del paciente tras la administración. El modificador de tonicidad usado en la presente invención es cloruro de sodio.

30 La nueva composición farmacéutica acuosa termoestable de eritropoyetina conjugada recombinante descrita en la presente invención tiene las siguientes ventajas:

1. Implica el uso de un inhibidor de la agregación, que previene la agregación de la eritropoyetina conjugada.
2. Implica el uso de un sistema tampón seleccionado del grupo que consiste en acetato, arginina, succinato e histidina solos o una combinación de los mismos que mantiene el pH de la formulación entre 4,9 y 5,3 y también mantiene la pureza de la formulación a temperatura elevada durante el almacenamiento.
3. Implica el uso de un azúcar que aporta mayor estabilidad.
4. La composición farmacéutica de la presente invención se mantiene a un pH entre 4,9 y 5,3 que es crítico para mantener la pureza y estabilidad de la composición acuosa a temperaturas elevadas durante el almacenamiento.
5. Implica simplicidad operativa.

45 Los siguientes ejemplos ilustran las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención y los medios para llevar a cabo la invención para obtener una composición farmacéutica estabilizada que comprende eritropoyetina conjugada.

Ejemplo 1

50 a) Cribado y selección de inhibidores de la agregación

Tabla 1: Optimización de la concentración de arginina

S. núm.	Excipientes	Formulación No.	
		Formulación 1	Formulación 2
1	Ácido acético	2,85 mg/mL	3,5 mg/mL
2	Sacarosa	30 mg/mL	30 mg/mL
3	Arginina	8,5 mg/mL	5,3 mg/mL
4	NaCl	2,9 mg/mL	2,9 mg/mL
5	Agua para inyección	c.s. a 1,0 mL	c.s. a 1,0 mL

55 Detalles experimentales:

Se prepara una formulación con una cantidad variable de arginina y se carga a 50 °C. La muestra se extrajo en diferentes momentos y se comprobó su pureza mediante SE HPLC (impureza de alto peso molecular)

Resultados:

5 El resultado del experimento anterior (Figura 1) muestra que la formulación 1 que contiene más arginina (8,5 mg/mL) muestra más pureza (menos agregación) que la formulación 2 que contiene menos arginina (5,3 mg/mL). La fórmula innovadora no contiene arginina. La Figura 1 muestra claramente menor pureza en RMP que la formulación 1 y 2 que tienen arginina en la formulación.

10 Conclusión:

La arginina en la formulación de eritropoyetina pegilada previene la agregación.

15 Ejemplo 2

a) Cribado de tampones

20 Con el fin de identificar el componente tampón, se estudiaron combinaciones con varios componentes tampón que incluían Histidina-HCl, Histidina-Acetato, Arginina-Acetato y Succinato. La composición detallada del tampón se da en la Tabla: 2. Se incubó la PEG-EPO en diferentes tampones a 40 °C durante 2 días y luego se comparó el resultado de los geles reductores y no reductores entre sí y con sus respectivos controles, mantenidos a 2-8 °C.

Tabla: 2

Histidina-HCl	Acetato de Histidina	Acetato de Arginina	Succinato
50 mM de Histidina-HCl	50 mM de Histidina-acetato	50 mM de Acetato de Arginina	50 mM de Succinato
30 mg/mL de Manitol	30 mg/mL de Manitol	30 mg/mL de Manitol	30 mg/mL de Manitol
10 mM de Metionina	10 mM de Metionina	10 mM de Metionina	10 mM de Metionina
0,01 % de Pluronic F68	0,01 % de Pluronic F68	0,01 % de Pluronic F68	0,01 % de Pluronic F68

25 Resultados:

30 La despegilación observada de la PEG-EPO a partir de los resultados anteriores está en la secuencia de tampón Acetato de histidina > Histidina HCl > Acetato de arginina > Succinato. (Figura 2 y Figura 3) También está claro que la impureza LMw (menos Mw que EPO) también es menor en tampón succinato en comparación con otros. Entonces, puede decirse que la PEG-EPO es más estable en tampón succinato en comparación con otros tampones. Además, la combinación arginina-acetato también mostró menos impurezas y casi la misma formación de impurezas que el tampón succinato.

35 b) Asimismo, se compararon los tampones Succinato y Acetato. La composición detallada del tampón se da en la Tabla: 3. Se incubaron tampones de PEG-EPO en acetato y succinato a 50 °C durante 6 días y luego se comparó la pureza por SEC HPLC:

40 Detalles Experimentales:

Tabla: 3. PEG-EPO en tampones de acetato y succinato

Sr. No.	Componentes	F1	F2	F3	F4
1	Ácido acético	15 mM	30 mM	0,5 µL/mL	0,27 µL/mL
2	Ácido succínico	15 mM	-	---	---
3	Sacarosa	30 mg/mL	30 mg/mL	---	---
4	Arginina	25 mM	25 mM	---	---
5	Metionina	---	---	0,5 mg/mL	---
6	Glicina	---	---	7,5 mg/mL	7,5 mg/mL
7	Trehalosa	---	---	30 mg/mL	30 mg/mL

Resultados:

45 A partir del resultado del experimento anterior (Figura 4) puede observarse que la formulación 2 (F2) que tiene tampón acetato muestra más pureza en comparación con la otra formulación.

Ejemplo 3

a) Efecto del pH

5 Detalles experimentales:

Las muestras se prepararon en la composición final con tampón de acetato, arginina, sacarosa y cloruro de sodio a diferentes pH y se cargaron a una temperatura elevada (40 °C) para una estabilidad dependiente del pH. Las muestras se analizaron por SE HPLC para determinar el nivel de agregación a diferentes pH;

10

Tabla: 4 estudio de pH

Sr. No	Nombre del ingrediente	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Formulación 4	Formulación 5
1	Peg EPO	1,33 mg	1,33 mg	1,33 mg	1,33 mg	1,33 mg
2	Ácido Acético Glacial	3,8 mg	3,8 mg	3,8 mg	3,8 mg	3,8 mg
3	Arginina	8,5 mg	8,5 mg	8,5 mg	8,5 mg	8,5 mg
4	Cloruro de sodio	2,9 mg	2,9 mg	2,9 mg	2,9 mg	2,9 mg
5	Sacarosa	30,0 mg	30,0 mg	30,0 mg	30,0 mg	30,0 mg
6	Agua para inyección	c.s. a 1,0 mL	c.s. a 1,0 mL	c.s. a 1,0 mL	c.s. a 1,0 mL	c.s. a 1,0 mL
pH		4,6	4,8	5,1	5,3	5,5

Resultados:

15

Tabla: 5 Resultados del estudio de pH

Puntos en el tiempo	Purezas de alto peso molecular (HMW)				
	pH				
	4,6	4,8	5,1	5,3	5,5
	H.M.W	H.M.W	H.M.W	H.M.W	H.M.W
0 D	0,98	0,79	0,78	0,69	
15 D	45,83	28,72	6,168	2,702	0,53

Conclusión:

Los resultados anteriores (Tabla 5 y Figura 5) muestran que al disminuir la agregación por pH aumenta los niveles (HMW). Las muestras que tienen un pH de 5,3 y 5,5 que mostraron un menor nivel de agregación son más estables en comparación con las muestras de menor pH. Las formulaciones 1, 2 y 5 no están de acuerdo con la invención.

20

Ejemplo 4

25 a) Preparación de la composición de eritropoyetina conjugada

Tabla 6: Detalles de formulación

Sr. No	Nombre del ingrediente	Cantidad /mL
1	Peg EPO	50 mcg-1,6 mg
2	Tampón de acetato	3,8 mg
3	Arginina	8,5 mg
4	Cloruro de sodio	2,9 mg
5	Sacarosa	30,0 mg
6	Agua para inyección	c.s. a 1,0 mL
	pH	4,9 a 5,3

Las nuevas formulaciones de eritropoyetina conjugada se preparan mediante el uso de una combinación adecuada de tampón, un inhibidor de agregación, un modificador de la tonicidad y un estabilizador en una combinación adecuada de estos.

30

Procedimiento de preparación:

El procedimiento comienza con la preparación del tampón de formulación disolviendo ácido acético glacial, arginina, cloruro de sodio y sacarosa en agua para inyección de manera secuencial mediante agitación continua a 500 rpm. Se comprueba el pH y, si es necesario, se ajusta con solución de ácido acético glacial (10 %) o solución de hidróxido

35

de sodio (0,1 N) para obtener el pH de $5,1 \pm 0,2$. Hacer el volumen al 100 % con WFI y agitar la solución para homogeneidad. Las muestras se retiran en esta etapa para las pruebas de IPQC.

Se añaden las cantidades necesarias de tampón de formulación y la cantidad calculada de sustancia farmacológica Peg-EPO con agitación continua. Las muestras se retiran en esta etapa para las pruebas de IPQC. Filtrar la solución a través de un filtro de 0,2 μm , mediante el uso de un tubo de silicona curado con platino. Linar la solución en un vial/vial de vidrio tipo I de la USP y selle el recipiente con un tapón de goma estéril.

La nueva formulación preparada por dicha invención comprende una cantidad eficaz de eritropoyetina conjugada biológicamente activa que puede usarse en el tratamiento de la anemia asociada con insuficiencia renal crónica. Se usan preferentemente como soluciones acuosas inyectables.

Ejemplo 5

a) ESTUDIO DE ESTABILIDAD A $-20\text{ }^\circ\text{C}$: durante 24 meses

Procedimiento de preparación:

Se formuló eritropoyetina pegilada en la concentración de proteína de 1,6 mg/mL en tampón acetato, el pH de la formulación se mantuvo entre 4,9 y 5,3. La solución formulada se filtró y se cargó en una botella de PETG. La composición cuantitativa se da en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7: Composición de formulación para Eritropoyetina Pegilada

Sr. No.	Ingredientes	Cantidad (mg/mL)
1	Peg EPO	1,6
2	Ácido Acético Glacial	3,8
3	Arginina	8,5
4	Cloruro de Sodio	2,9
5	Sacarosa	30,0
6	Agua para inyección	c.s. a 1 mL
7	pH	c.s. a pH 4,9- 5,3

Se cargaron tres lotes de Eritropoyetina Pegilada (1,6 mg/mL en una botella de PETG) a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 meses y fueron probados para las pruebas mencionadas en la Tabla 8.

Tabla 8: Pruebas a realizar para Eritropoyetina Pegilada (1,6 mg/mL en botella de PETG) cargada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$

Sr. No.	Pruebas
1	pH
2	Conc. de proteínas (mg/mL)
3	Potencia relativa (<i>bioensayo In vitro</i>)
4	SE-HPLC (% de pureza)

Los datos para los mismos se mencionan en la Tabla 9.

Tabla 9: Datos de estabilidad para eritropoyetina pegilada (1,6 mg/mL en botella de PETG) cargada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$

Pruebas	$-20\text{ }^\circ\text{C}$								
	Lote 1			Lote 2			Lote 3		
	Inicial	12 M	24 M	Inicial	12 M	24 M	Inicial	12 M	24 M
pH	5,1	5,2	5,3	5,1	5,2	5,2	4,9	5	4,9
Conc. de proteínas (mg/mL)	1,64	1,67	1,53	1,52	1,59	1,64	1,53	1,67	1,7
Potencia relativa (<i>bioensayo in vitro</i>)	101	117	93	116	112	116	115	111	113
SE-HPLC (% de pureza)	99,1	99,3	98,9	99,8	99,7	99,7	99,5	99,6	99,6

Conclusión:

• No se observó ningún cambio significativo en el pH de la proteína hasta 24 meses a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

- Se controló la concentración de proteína y no se observaron cambios importantes en la concentración de proteína.

5 • La potencia relativa se controló mediante el uso del procedimiento de bioensayo *in vitro* y se encontró que se mantuvo hasta 24 meses.

10 • Se usó SE-HPLC para controlar las impurezas de alto y bajo peso molecular. Como la eritropoyetina pegilada es una proteína pegilada, es fundamental controlar la despegilación y agregación durante el transcurso del tiempo.

Puede observarse a partir de los datos que la composición de la formulación es capaz de prevenir la agregación y la despegilación hasta 24 meses a -20 ° C. La composición de la formulación de Eritropoyetina Pegilada es capaz de proteger la proteína contra la desnaturalización por congelación.

15 b) ESTUDIO DE ESTABILIDAD A 5 °C: DURANTE 24 MESES

Procedimiento de preparación:

20 Se formuló eritropoyetina pegilada a la concentración de proteína de 1,33 mg/mL y 0,17 mg/mL en tampón acetato a pH 4,9-5,3. La solución formulada se filtró con un filtro de 0,2 micrones y se llenó con 1 ml de vidrio tipo I PFS de la USP. La composición cuantitativa se da en la Tabla 10.

Tabla 10: Composición de formulación para Eritropoyetina Pegilada

Sr.	Ingredientes	Cantidad (mg/mL)
No. 1	Peg EPO	1,33 -0,17
2	Ácido acético glacial	3,8
3	Arginina	8,5
4	Cloruro de sodio	2,9
5	Sacarosa	30,0
6	Agua para inyección	c.s. a 1 mL
7	pH	c.s. a pH 4,9- 5,3

25 1) Se cargaron tres lotes de Eritropoyetina Pegilada (1,33 mg/mL en un cilindro de jeringa de vidrio tipo I USP de 1 mL) a 5 °C durante 24 meses y fueron probados para las pruebas mencionadas en la Tabla 11.

Tabla 11: Pruebas que realizar para Eritropoyetina Pegilada (1,33 mg/mL en 1 ml de vidrio tipo I PFS de USP) cargada a 5 °C

Sr. No.	Pruebas
	pH
2	Potencia relativa (<i>bioensayo In vitro</i>)
3	SE-HPLC (% de pureza)

30

Los datos de los tres lotes se mencionan en la Tabla 12.

Tabla 12: Datos de estabilidad para la Eritropoyetina Pegilada (1,33 mg/mL en un cilindro de jeringa de vidrio tipo I USP de 1 mL) cargada a 5 °C

Pruebas	5 °C								
	Lote 1			Lote 2			Lote 3		
	Inicial	12 M	24 M	Inicial	12 M	24 M	Inicial	12 M	24 M
pH	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2
Potencia relativa (<i>bioensayo in vitro</i>)	91	110	118	101	114	118	103	110	114
SE-HPLC (% de pureza)	99,0	98,2	98,2	99,1	98,3	98,3	99,2	98,7	98,2

35

Conclusión:

- No se observó ningún cambio en el pH de la proteína hasta 24 meses a 5 °C.

- También se encontró que la potencia relativa se mantenía hasta 24 meses.
- Puede observarse a partir de los datos de SE-HPLC que no hubo cambios significativos en la pureza de la proteína hasta 24 meses a 5 °C.
- Los datos muestran que la composición de la formulación es capaz de mantener el pH de la proteína y prevenir la agregación hasta 24 meses a 5 °C.

2) Se cargaron tres lotes de Eritropoyetina Pegilada (0,17 mg/mL en un cilindro de jeringa de vidrio tipo I USP de 1 mL) a 5 °C durante 24 meses y fueron probados para las pruebas mencionadas en la Tabla 13.

Tabla 13: Pruebas que realizar para la Eritropoyetina Pegilada (0,17 mg/mL en un cilindro de jeringa de vidrio de tipo I USP de 1 mL) cargada a 5 °C

Sr. No.	Pruebas
1	pH
2	Potencia relativa (bioensayo <i>in vitro</i>)
3	SE-HPLC (% de pureza)

Los datos de los tres lotes se mencionan en la Tabla 14.

Tabla 14: Datos de estabilidad para la Eritropoyetina Pegilada (0,17 mg/mL en un cilindro de jeringa de vidrio de tipo I USP de 1 mL) cargada a 5 °C

Pruebas	5 °C								
	Lote 1			Lote 2			Lote 3		
	Inicial	12 M	24 M	Inicial	12 M	24 M	Inicial	12 M	24 M
pH	5,0	5,1	5,1	5,0	5,1	5,1	5,0	5,0	5,1
Potencia relativa (bioensayo <i>in vitro</i>)	112	113	108	105	92	97	114	96	104
SE-HPLC (% de pureza)	99,4	99,1	98,9	99,2	99,9	98,6	99,4	99,3	99,1

Conclusión:

- No se observó ningún cambio en el pH de la proteína hasta 24 meses a 5 °C.
- También se encontró que la potencia relativa se mantenía hasta 24 meses.
- Puede observarse a partir de los datos de SE-HPLC que no hubo cambios significativos en la pureza de la proteína hasta 24 meses a 5 °C.
- Los datos muestran que la composición de la formulación es capaz de mantener el pH de la proteína y prevenir la agregación hasta 24 meses a 5 °C.

c) ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACELERADA A 25 °C: DURANTE 6 MESES

1) Se cargaron tres lotes de Eritropoyetina pegilada (1,33 mg/mL en un cilindro de jeringa de vidrio tipo I USP de 1 mL) a 25 °C durante 6 meses.

Los datos de los tres lotes se mencionan en la Tabla 15.

Tabla 15: Datos de estabilidad para la Eritropoyetina Pegilada (1,33 mg/mL en un cilindro de jeringa de vidrio de tipo I USP de 1 mL) cargada a 25 °C

Pruebas	25 °C					
	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Inicial	6M	Inicial	6M	Inicial	6M
pH	5,2	5,1	5,2	5,1	5,2	5,1
Potencia relativa (<i>bioensayo In vitro</i>)	91	114	101	99	103	114
SE-HPLC (% de pureza)	99,0	94,4	99,1	94,4	99,2	93,8

Conclusión:

- No se observó ningún cambio significativo en el pH de la proteína hasta 6 meses a 25 °C.

5 • También se encontró que la potencia relativa se mantenía hasta 6 meses.

- La pureza por SE-HPLC fue de alrededor del 94 % en los tres lotes hasta 6 meses a 25 °C.

10 2) Se cargaron tres lotes de Eritropoyetina Pegilada (0,17 mg/mL en un cilindro de jeringa de vidrio tipo I USP de 1 mL) a 25 °C durante 6 meses y fueron probados para las pruebas mencionadas en

3) Tabla 16.

15 Tabla 16: Pruebas que realizar para la Eritropoyetina Pegilada (0,17 mg/mL en un cilindro de jeringa de vidrio de tipo I USP de 1 mL) cargada a 25 °C

Sr. No.	Pruebas
1	Potencia relativa (<i>bioensayo In vitro</i>)
2	SE-HPLC (% de pureza)

Los datos de los tres lotes se mencionan en la Tabla 17.

20 Tabla 17: Datos de estabilidad para la Eritropoyetina Pegilada (0,17 mg/mL en un cilindro de jeringa de vidrio tipo I USP de 1 mL) cargada a 25 °C

Pruebas	25 °C					
	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Inicial	6M	Inicial	6M	Inicial	6M
Potencia relativa (<i>bioensayo in vitro</i>)	112	107	105	96	114	112
SE-HPLC (% de pureza)	99,4	98,5	99,2	98,9	99,4	98,1

Conclusión:

- Se encontró que la potencia relativa se mantenía hasta 6 meses.

25 • Puede observarse a partir de los datos de SE-HPLC que no hubo cambios significativos en la pureza de la proteína hasta 6 meses a 25 °C.

30 d) Prueba de estabilidad de Eritropoyetina Conjugada a 40 °C

SEC HPLC

Tabla 18: Resultados del estudio de estabilidad a 40 °C

SE-HPLC	Pureza Total
1D	98,77 %
3D	97,85 %
7D	96,45 %
15D	91,89 %

Resultados:

35 Los resultados anteriores (Tabla 18 y Figura 16) muestran que la formulación es estable a 40 °C durante 15 días.

Inmunotransferencia:

40 Análisis de inmunotransferencia: No se observó que una sola banda de impurezas de alto peso molecular fuera más intensa que el 2,0 % de la banda principal del patrón de referencia. (Figura 17 y Figura 18)

e) Prueba de estabilidad de eritropoyetina conjugada a 50 °C

45 Análisis de pureza por SEC HPLC

Tabla 19: Resultados del estudio de estabilidad a 50 °C

Puntos en el tiempo	Pureza por SEC	
0 día	98,3 %	
50 °C, 3 días	98,0 %	
50 °C, 7 días	97,4 %	
50 °C, 13 días	94,4 %	

Resultados:

- 5 El resultado anterior (Figura 19) muestra que la formulación permanece estable a 50 °C durante 13 días. No se encontró un aumento significativo de la agregación ni de impurezas de bajo peso molecular.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación farmacéutica líquida que comprende eritropoyetina pegilada (PEG-EPO), un tampón que se selecciona del grupo que consiste en acetato, arginina, histidina, succinato o una combinación de estos, arginina como inhibidor de la agregación, cloruro de sodio como modificador de la tonicidad y sacarosa como estabilizador, en la que el pH de la formulación está entre 4,9 y 5,3.
- 10 2. La formulación farmacéutica líquida de la reivindicación 1, en la que la concentración de PEG-EPO está entre 0,05 mg/mL y 1,6 mg/mL.
3. La formulación farmacéutica líquida de la reivindicación 1, en la que el tampón está en una concentración de 3,8 mg/mL.
- 15 4. La formulación farmacéutica líquida de la reivindicación 1, en la que la arginina está presente en una concentración de 8,5 mg/mL.
- 20 5. Una composición en forma de jeringa precargada, que comprende la formulación farmacéutica líquida de la reivindicación 1, que comprende PEG-EPO, acetato como tampón, arginina como inhibidor de agregación, cloruro de sodio y sacarosa, en la que,
- 25 a) la PEG-EPO está en una concentración de 0,05 a 1,6 mg/mL
b) el tampón de acetato está en una concentración de 3,8 mg/mL
c) la arginina está en una concentración de 8,5 mg/mL
d) el cloruro de sodio está en una concentración de 2,9 mg/mL
e) la sacarosa está en una concentración de 30,0 mg/mL
f) el pH es de 4,9 a 5,3.

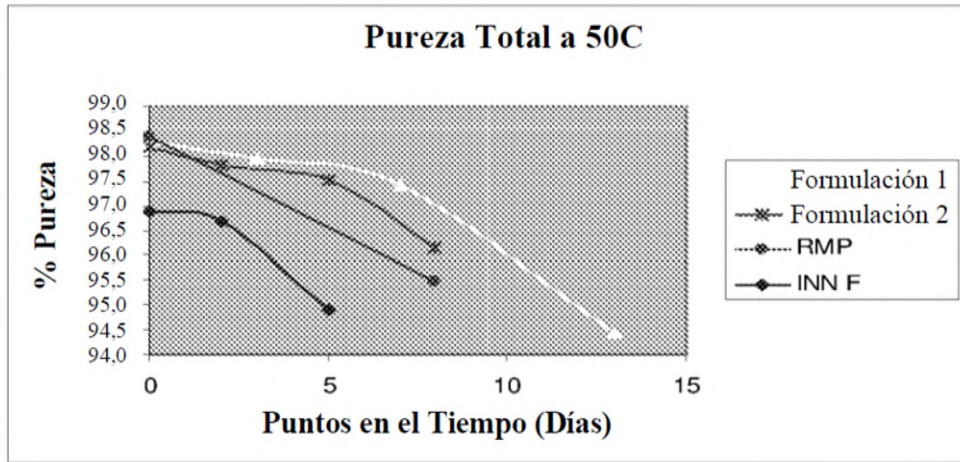


Figura 1: Gráfico de Pureza por SE HPLC

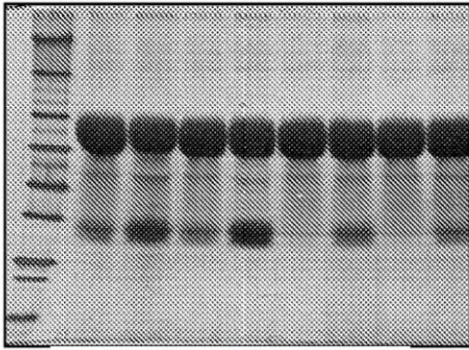


Figura 2: Gel no reductor

1	Marcador
2	Tampón Histidina-HCl, 2-8 °C
3	Tampón Histidina-HCl, 40 °C
4	Tampón Histidina-acetato, 2-8 °C
5	Tampón Histidina-acetato, 40 °C
6	Tampón Arginina-acetato, 2-8 °C
7	Tampón Arginina-acetato, 40 °C
8	Tampón Succinato, 2-8 °C
9	Tampón Succinato, 40 °C

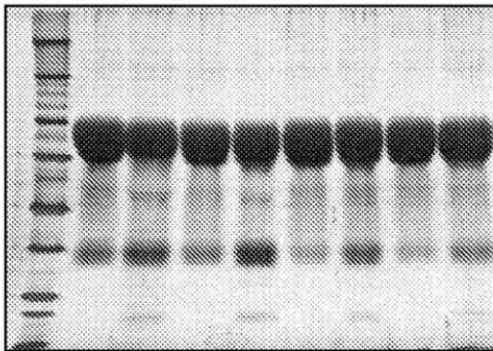


Figura 3: Gel reductor

1	Marcador
2	Tampón Histidina-HCl, 2-8 °C
3	Tampón Histidina-HCl, 40 °C
4	Tampón Histidina-acetato, 2-8 °C
5	Tampón Histidina-acetato, 40 °C
6	Tampón Arginina-acetato, 2-8 °C
7	Tampón Arginina-acetato, 40 °C
8	Tampón Succinato, 2-8 °C
9	Tampón Succinato, 40 °C

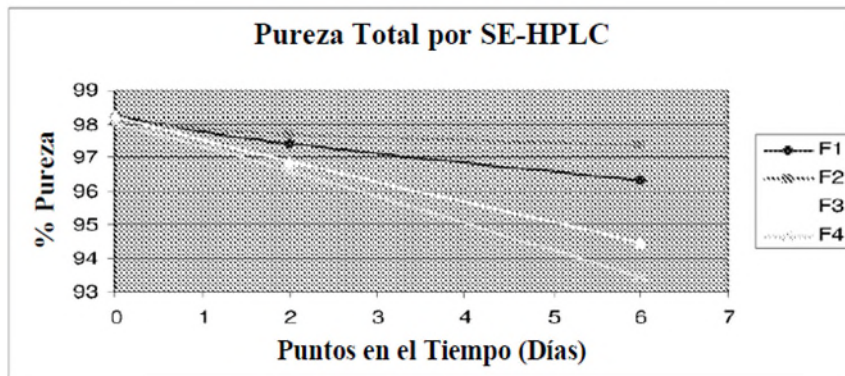


Figura 4: Gráfico de Pureza por SE HPLC

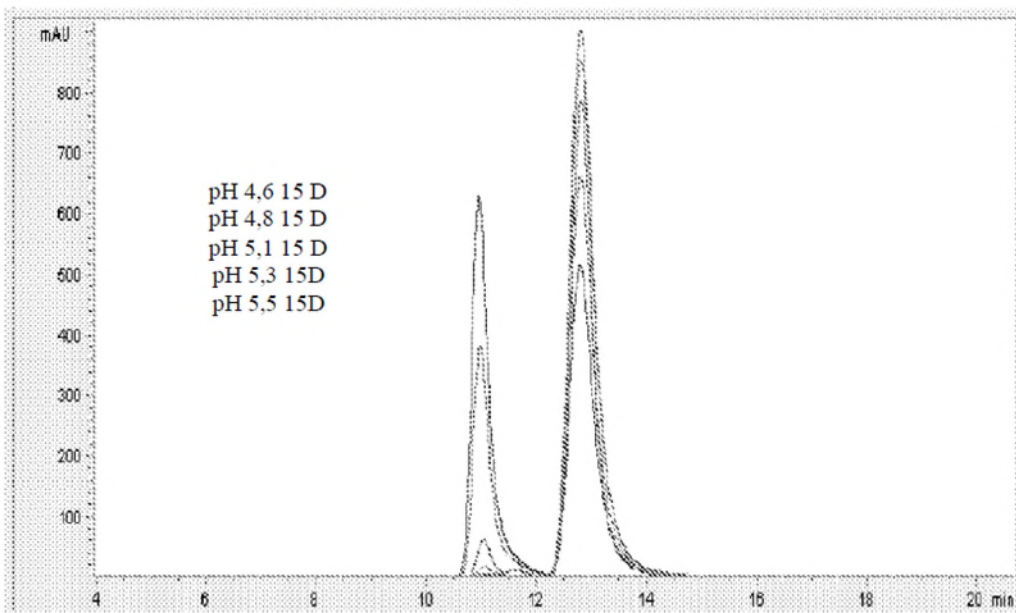


Figura 5: Cromatograma SEC HPLC del estudio de pH 15 D

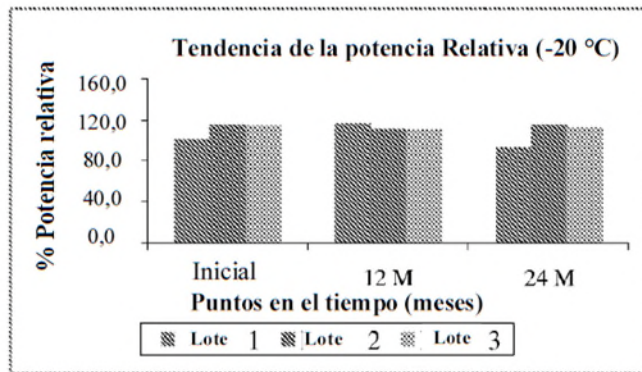


Figura 6: Tendencia del % de la potencia relativa de la Eritropoyetina Pegilada (1,6 mg/mL en botella de PETG) cargada a -20 °C

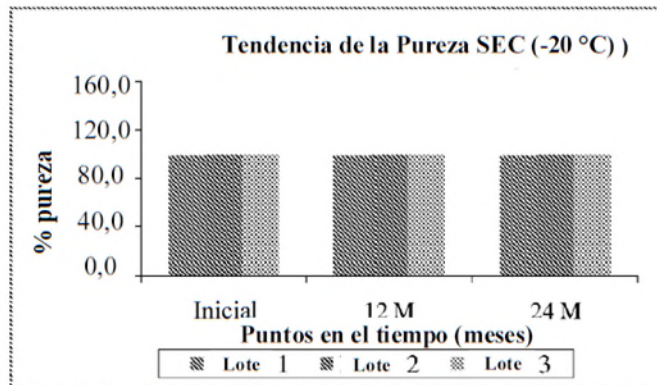


Figura 7: Tendencia del % de la pureza por SE-HPLC de la Eritropoyetina Pegilada (1,6 mg/mL en botella de PETG) cargada a -20 °C

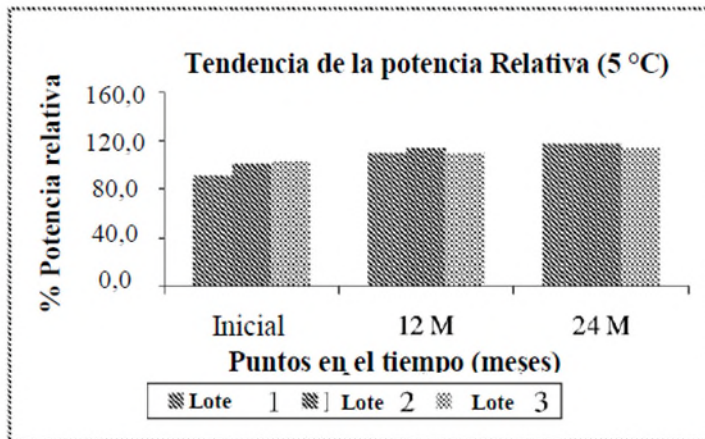


Figura 8: Tendencia del % de la potencia relativa de la Eritropoyetina Pegilada (1,33 mg/mL en cilindro de jeringa de vidrio USP tipo I de 1 mL) cargada a 5 °C

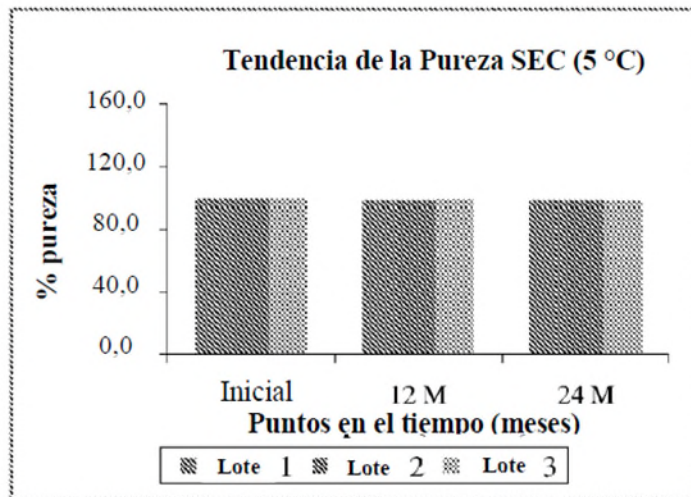


Figura 9: Tendencia del % de la pureza por SE-HPLC de la Eritropoyetina Pegilada (1,33 mg/mL en cilindro de jeringa de vidrio USP tipo I de 1 mL) cargada a 5 °C

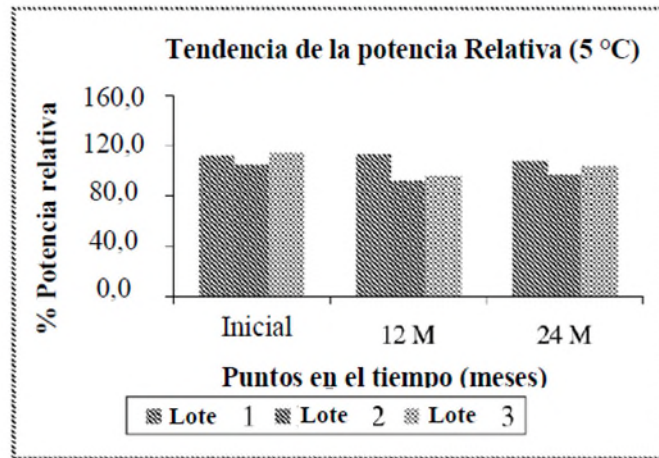


Figura 10: Tendencia del % de la potencia relativa de la Eritropoyetina Pegilada (0,17 mg/mL en cilindro de jeringa de vidrio USP de tipo I de 1 mL) cargada a 5 °C

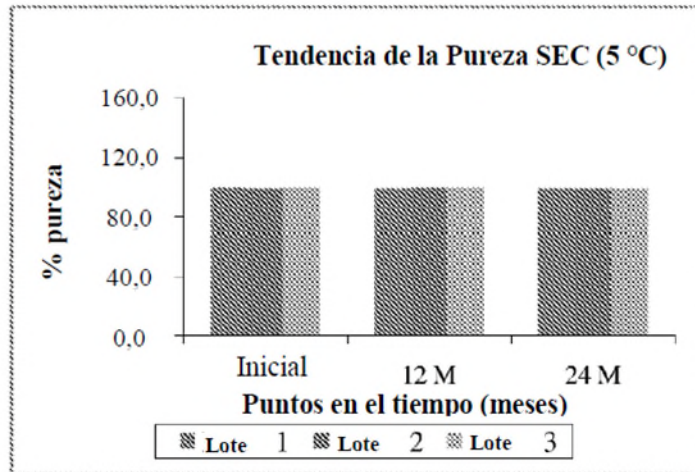


Figura 11: Tendencia del % de la pureza por SE-HPLC de la Eritropoyetina Pegilada (0,17 mg/mL en de cilindro de jeringa de vidrio USP de tipo I de 1 mL) cargada a 5 °C

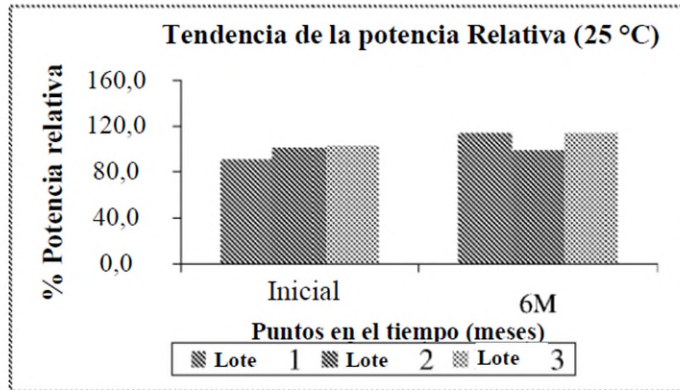


Figura 12: Tendencia del % de la potencia relativa de la Eritropoyetina Pegilada (1,33 mg/mL en cilindro de jeringa de vidrio USP de tipo I de 1 mL) cargada a 25 °C

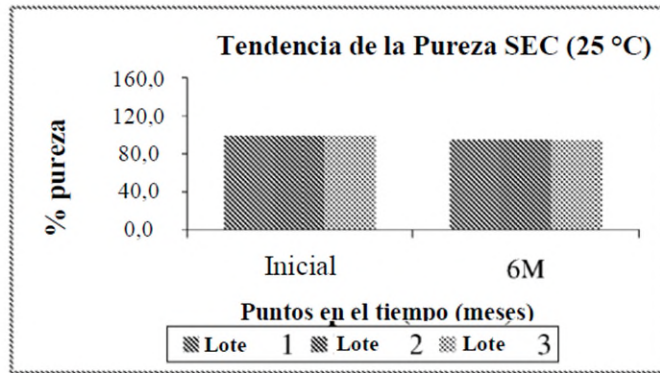


Figura 13: Tendencia del % de la pureza por SE-HPLC de la Eritropoyetina Pegilada (1,33 mg/mL en cilindro de jeringa de vidrio USP de tipo I de 1 mL) cargada a 25 °C

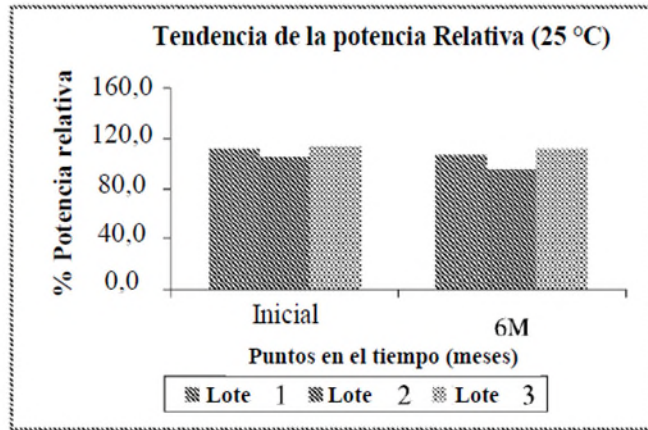


Figura 14: Tendencia del % de la potencia relativa de la Eritropoyetina Pegilada (0,17 mg/mL en cilindro de jeringa de vidrio USP de tipo I de 1 mL) cargada a 25 °C

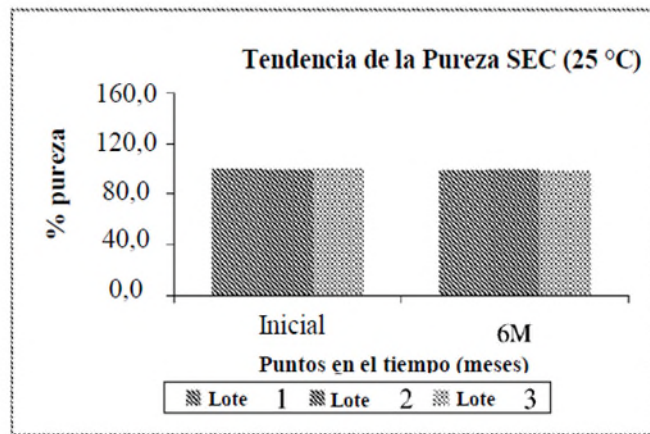


Figura 15: Tendencia del % de la pureza por SE-HPLC de la Eritropoyetina Pegilada (0,17 mg/mL en cilindro de jeringa de vidrio USP de tipo I de 1 mL) cargada a 25 °C

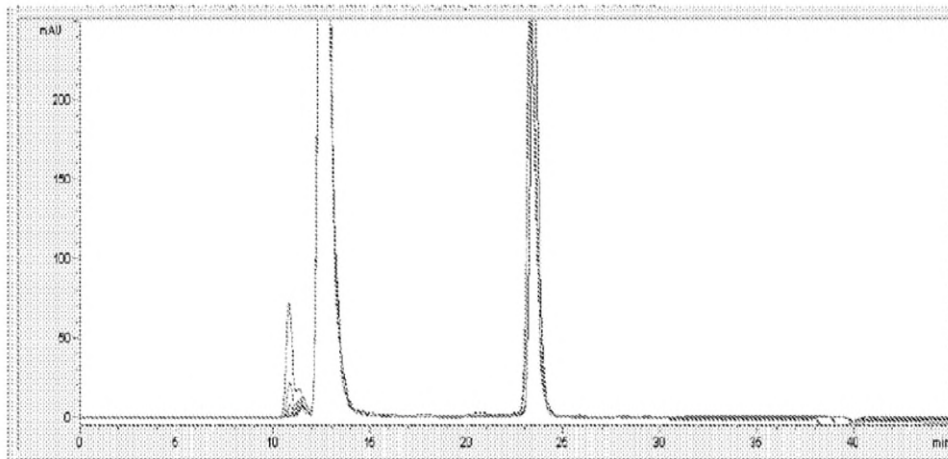
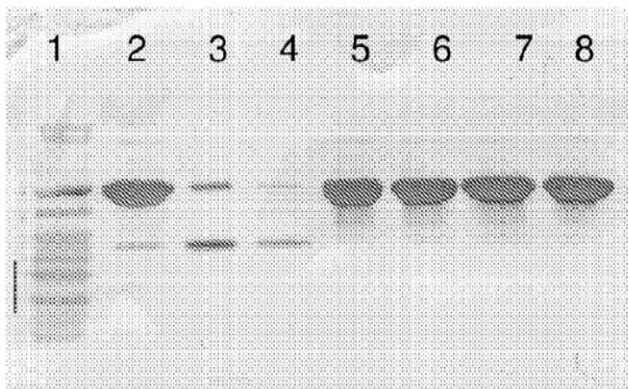


Figura 16: superposición del cromatograma de SEC HPLC



Inmunotransferencia	
Carril	Muestra
1	Marcador de peso
2	RMP
3	2% EPO + RMP
4	1% EPO + RMP
5	IPL Formulación día cero
6	IPL Formulación día cero
7	IPL Formulación día cero
8	IPL Formulación día cero

Figura 17: resultado de la inmunotransferencia al día cero

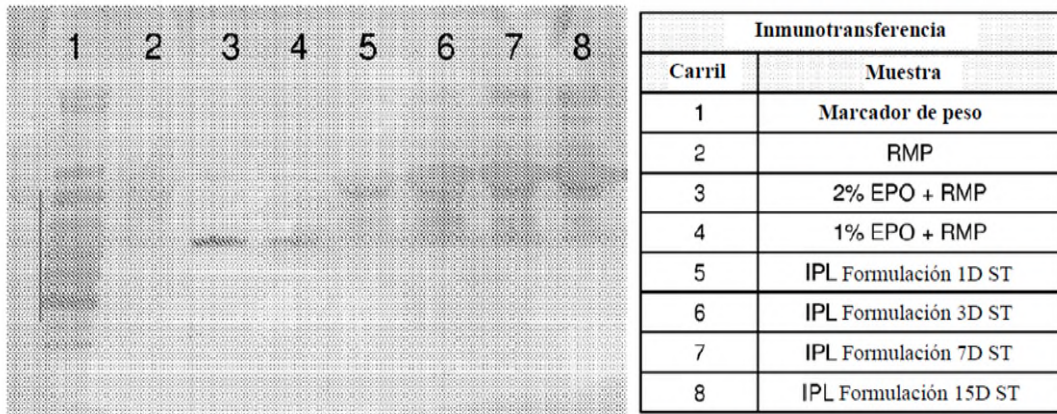


Figura 18: resultado de la inmunotransferencia a 1D, 3D, 7D y 15D

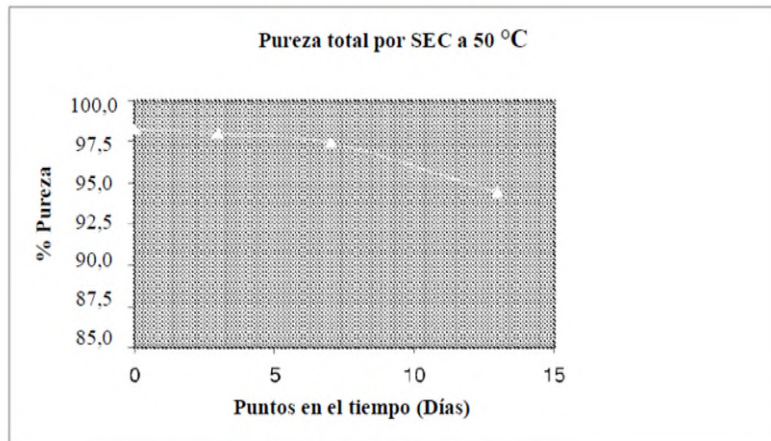


Figura 19: Gráfico de la pureza por SEC HPLC