



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 237 574**

⑤① Int. Cl.7: **A61K 38/18**

A61K 9/08

A61K 47/02

A61K 47/18

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **01943331 .7**

⑧⑥ Fecha de presentación: **08.05.2001**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1311285**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2003**

⑤④ Título: **Nueva composición farmacéutica.**

③⑩ Prioridad: **15.05.2000 EP 00110355**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.08.2005**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.08.2005**

⑦③ Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

⑦② Inventor/es: **Papadimitriou, Apollon**

⑦④ Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 237 574 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

Nueva composición farmacéutica.

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida que contiene una proteína eritropoyetina pegilada, una anión orgánico multicarga en un tampón farmacéuticamente aceptable para mantener el pH de la solución en un intervalo comprendido entre 5,5 y 7,0 y eventualmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables. Esta composición es especialmente indicada para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades relacionados con la eritropoyesis.

10 La eritropoyesis es la producción de glóbulos rojos que tiene lugar para compensar la destrucción celular. La eritropoyesis es un mecanismo fisiológico controlado que aporta un número suficiente de glóbulos rojos capaces de oxigenar debidamente los tejidos. La eritropoyetina natural humana (hEPO) se produce en los riñones y es el factor de plasma humoral que estimula la producción de glóbulos rojos (Carnot, P. y Deflandre, C. (1906), C.R. Acad. Sci. 143:432; Erslev, A.J. (1953), Blood 8:349; Reissmann, K.R. (1950) Blood 5:372; Jacobson, LO, Goldwasser, E., Freid, W. y Plzak, L.F. (1957) Nature 179:6331-4). La EPO de origen natural estimula la división y la diferenciación de precursores de eritroides en el tuétano y despliega su actividad biológica ligando los receptores a los precursores de eritroide (Krantz, B.S. (1991) Blood 77:419).

20 La eritropoyetina se obtiene por biosíntesis empleando la tecnología de DNA recombinante (Egrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J. y col. (1986) Immunobiol. 72:213-224) y es el producto de los genes de EPO humana clonada, insertados y expresados en tejidos celulares de ovario de hámster chino (células CHO). La estructura primaria de la forma predominante, totalmente procesada, de la hEPO se ilustra en la SEQ ID NO:1. Hay dos puentes sulfuro entre Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>161</sup> y Cys<sup>29</sup>-Cys<sup>33</sup>. El peso molecular de la cadena de polipéptido de la EPO sin las porciones azúcar es de 18.236 Da. En la molécula intacta de EPO, aproximadamente el 40% del peso molecular se debe a los grupos hidrato de carbono que glicosilan la proteína en sus sitios de glicosilación (Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A. y Fukuda, M. (1987), J. Biol. Chem. 262:12059).

30 La eritropoyetina humana es esencial en la formación de glóbulos rojos, por ello esta hormona es útil para el tratamiento de trastornos sanguíneos caracterizados por una producción baja o insuficiente de glóbulos rojos. Clínicamente se utiliza la EPO para tratar la anemia en pacientes con deficiencia renal crónica (CRF) (Eschbach, J.W., Egri, J.C., Downing, M.R. y col. (1987), NEJM 316:73-78; Eschbach, J.W., Abdulhadi, M.H., Browne, J.K. y col. (1989), Ann. Intern. Med. 111:992; Egrie, J.C., Eschbach, J.W., McGuire, T., Adamson, J.W. (1988), Kidney Intl. 33:262; Lim, V.S., Degowin, R.L., Zavala, D. y col. (1989), Ann. Intern. Med. 110:108-114) y en paciente de sida y cáncer que se someten a quimioterapia (Danna, R.P., Rudnick, S.A., Abels, R.I. en: M. B. Garnick, coordinador, Erythropoietin in Clinical Applications - An International Perspective, Nueva York, NY: Marcel Dekker, 1990, pp. 301-324).

Las composiciones farmacéuticas conocidas tienen por lo menos uno de los inconvenientes siguientes:

40 - son liofilizados. Aparte del complicado procedimiento de fabricación, los liofilizados tienen el inconveniente de que tienen que reconstituirse antes de inyectarse a los pacientes. Esto obliga a una manipulación adicional a cargo del personal médico, que resulta molesto y conlleva el riesgo de que se manipule incorrectamente el producto farmacéutico;

45 - llevan como aditivo albúmina de suero humano. La albúmina de suero humano es un producto derivado de un líquido corporal humano, con consiguiente existe el riesgo de una infección vírica debida a los contaminantes de la preparación de albúmina. Son posibles además reacciones alérgicas;

50 - todas las composiciones de eritropoyetina comerciales, actualmente disponibles, son inestables a temperaturas elevadas, es decir, a una temperatura superior a la del frigorífico, que se sitúa normalmente entre 2 y 8°C. Por esta razón tienen que guardarse en un frigorífico (2-8°C) y no pueden almacenarse a temperatura ambiente (en torno a 20°C). Esto implica un incremento de los costes, debido al almacenaje y transporte a baja temperatura y además complica el manejo del producto farmacéutico. En este contexto "inestable" significa que el almacenaje a temperaturas elevadas, p.ej. 25°C durante un período de tiempo prolongado (p.ej. varios meses o más de 6 meses) conduce a la degradación de la proteína. Degradación en este contexto significa cambios físicos (p.ej. agregación o desnaturalización) o cambios químicos (p.ej. oxidación o modificación de los enlaces químicos en general) de la molécula de proteína que es sabido tienen lugar con preferencia a temperaturas elevadas (superiores a 8°C). La incubación de una proteína cerca o por encima de su temperatura de transición (también llamada temperatura de fusión) conduce a un desplegamiento ("unfolding") de la proteína, es decir, se pierden la estructura nativa y la actividad biológica del polipéptido. La temperatura de transición guarda una estrecha relación con la estabilidad térmica de la proteína y depende del entorno de la proteína (p.ej. el pH, las sales, la fuerza iónica, la sustancia tampón, etc.). Por ejemplo, la desnaturalización puede conducir a la agregación de las moléculas de eritropoyetina, es decir, a la formación de dímeros (covalentes o no covalentes), a agregados de orden superior o incluso a macropartículas. Esto se traduce en una reducción de la potencia del fármaco y puede inducir a efectos secundarios molestos después de la inyección a pacientes humanos.

65 El objetivo perseguido por la presente invención es, pues, el proporcionar una composición que sea capaz de minimizar o evitar los inconvenientes recién mencionados.

## ES 2 237 574 T3

Este objetivo se alcanza según la presente invención presentando una composición farmacéutica que tenga una proteína eritropoyetina peguilada, un anión inorgánico tipo multicarga en una solución tampón de pH entre 5,5 y 7,0 y opcionalmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 Ahora se ha encontrado de forma sorprendente que formulando una eritropoyetina peguilada en esta composición mejora su estabilidad a temperaturas superiores a la temperatura del frigorífico (2-8°C), en especial a temperatura ambiente (es decir, por debajo de 25°C) e incluso a temperaturas elevadas, p.ej. a 40°C. Esto significa que la composición puede almacenarse sin enfriar durante un tiempo prolongado sin perder una parte importante de su actividad y sin degradarse de forma significativa.

10 A menos que se indique lo contrario, las definiciones siguientes ilustran y explican el significado y alcance de varios términos empleados en la descripción.

15 El término “anión inorgánico del tipo multicarga” significa un anión inorgánico que tiene dos o más cargas negativas en cada molécula, por ejemplo el anión sulfato  $\text{SO}_4^{2-}$  o un anión fosfato, p.ej. el hidrogenofosfato  $\text{HPO}_4^{2-}$ . El anión inorgánico de carga múltiple puede añadirse en forma de la sal correspondiente, p.ej. la sal sódica, la sal potásica y las mezclas de las mismas, y/o en forma de una sustancia tampón, p.ej. tampón fosfato.

20 El término “isoosmótico o isotónico” significa una solución que puede mezclarse con líquidos corporales sin que afecte a sus constituyentes. Las soluciones que son isotónicas con la sangre, por ejemplo el cloruro sódico del 0,9%, tienen la misma presión osmótica que el suero y no afectan a las membranas de los glóbulos rojos. En general, las soluciones que son isotónicas con la sangre tienen una concentración en torno a 290 mosm/kg de  $\text{H}_2\text{O}$ .

25 El término “ácido inorgánico fuerte” significa un ácido inorgánico que en una solución 1 N presenta una disociación comprendida entre el 20 y el 100%, por ejemplo el  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

El término “farmacéuticamente aceptable” significa que el tampón o las sales son aceptables desde el punto de vista toxicológico.

30 El término “diluyente” significa un ingrediente de una preparación medicinal que no posee actividad farmacológica pero que es necesario o deseable desde el punto de vista farmacéutico. Un diluyente puede ser por ejemplo un líquido para disolver el (los) fármaco(s) a inyectar, p.ej. el agua.

35 El término “disolventes” significa un líquido que mantiene otra sustancia en solución, es decir, la disuelve, p.ej. el agua.

El término “conservantes” significa una sustancia que se añade a una composición farmacéutica para prevenir el crecimiento bacteriano, p.ej. el cloruro de benzalconio o el alcohol bencílico.

40 El término “poliol” se refiere a cualquier sustancia que posea varios grupos hidroxilo, incluyendo a los alcoholes polihídricos y a los hidratos de carbono. Los hidratos de carbono son moléculas cíclicas que tiene un grupo ceto o aldehído, p.ej. la sucrosa y la trehalosa.

45 El término “eritropoyetina” o “proteína eritropoyetina” significa una proteína que posee la actividad biológica “*in vivo*” de incrementar la producción de reticulocitos y glóbulos rojos en el tuétano y que se elige entre el grupo de la eritropoyetina humana y los análogos de la misma que se definen posteriormente.

El término “eritropoyetina pegilada (Peg-EPO o PEG-EPO)” se refiere a la proteína eritropoyetina unida mediante enlaces covalentes a uno, dos o tres derivados de polietilenglicol que se describen posteriormente.

50 El término “dispositivo” significa un artefacto para un propósito específico. En la presente invención, el propósito perseguido es permitir, apoyar o facilitar la administración de la composición farmacéutica líquida.

### Descripción de las figuras

55 Figura 1: Estructura primaria de la EPO humana (165 aminoácidos) (SEQ ID NO:1).

Figura 2: Estructura primaria de la EPO humana (166 aminoácidos) (SEQ ID NO:2).

60 Figura 3: Estabilidad térmica en función del pH. Presenta la temperatura de transición frente al pH.

Figura 4: Influencia de la fuerza iónica en la estabilidad térmica. Se representa la temperatura de transición frente a la concentración de fosfato.

65 Figura 5: Dependencia de la estabilidad térmica de la sustancia tampón.

La figura 6 muestra que el sulfato es también un tampón/aditivo idóneo en un pH bajo (p.ej. pH 6,2), mientras que

## ES 2 237 574 T3

el fosfato es menos indicado a pH 6,2 que a pH 7,5. Esto demuestra que el sulfato da una gran estabilidad térmica, incluso a pH bajo.

5 Figura 7: Dependencia de agregación de la peg-EPO en función del pH. Se analizan con SDS-PAGE las muestras de peg-EPO que se han sometido al calor (tal como se describe antes). Las proteínas se tiñen con plata. Calle 1: peso molecular estándar. Calle 2: pH 5. Calle 3: pH 5, reducido. Calle 4: pH 6. Calle 5: pH 6, reducido. Calle 6: pH 6,5. Calle 7: pH 6,5, reducido. Calle 8: pH 7. Calle 9: pH 7, reducido. Calle 10: peg-EPO no sometido al calor.

10 La figura 8 muestra que el uso de 1 mg/ml de acetilcisteína como antioxidante evita la formación de agregados por acción del calor. Agregación de pegEPO sometida al calor (20 min. a 80°C): calle 1: pegEPO a pH 7,5 no sometida al calor; calle 2: pegEPO a 7,5 sometida al calor; calle 3: pegEPO a pH 6,2, sometida al calor; calle 4: pegEPO a pH 6,2, sometida al calor, reducida; calle 5: pegEPO a pH 7,5 + 1 mg/ml de N-acetil-cisteína, sometida al calor; calle 6: pegEPO a pH 7,5 + 1 mg/ml de N-acetilcisteína, sometida al calor, reducida.

15 Figura 9: Contenido de ácido siálico (NANA) en muestras de peg-EPO de nuevas formulaciones, almacenado durante seis meses a diversas temperaturas.

20 Figura 10: Ensayo de bioactividad en ratón de muestras de peg-EPO después de almacenarse en fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, manitol del 3% (p/v), pH 6,2, durante 6 meses a diversas temperaturas.

Figura 11: Superposición de cromatogramas de exclusión de tamaño de muestras de peg-EPO almacenadas durante 6 meses en fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, manitol del 3% (p/v), pH 6,2 (de abajo hacia arriba: tampón, material de partida, 4°C, 25°C, 30°C y 40°C).

25 Con mayor detalle, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida que contiene una proteína eritropoyetina peguilada, un anión inorgánico de varias cargas en un tampón farmacéuticamente aceptable, idóneo para mantener el pH de la solución en el margen comprendido entre 5,5 y 7,0 y opcionalmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

30 En una forma preferida de ejecución, la composición es una solución líquida, p.ej. una solución acuosa. En una forma preferida de ejecución de la invención, las composiciones farmacéuticas anteriores son soluciones isotónicas.

35 El anión se selecciona con preferencia entre los aniones de ácidos inorgánicos fuertes, por ejemplo el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o el ácido cítrico. Por consiguiente, los aniones preferidos se seleccionan entre el grupo formado por sulfato, fosfato y citrato, con preferencia sulfato o fosfato y con mayor preferencia sulfato. La concentración del anión inorgánico de varias cargas puede variar entre 10 y 200 mmoles/l, p.ej. entre 10 y 200 mmoles/l en el caso del anión sulfato.

40 Los tampones a utilizar en la presente invención para mantener el pH en el intervalo comprendido entre 5,5 y 7,0, con preferencia en el intervalo de 5,8 a 6,7, con mayor preferencia todavía en el intervalo de 6,0 a 6,5 y con preferencia especial en un pH en torno a 6,2, pueden ser tampones convencionales de ácidos orgánicos o inorgánicos (p.ej. tampón fosfato, tampón arginina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o cualquier otro sistema tampón farmacéuticamente aceptable). En una forma preferida de ejecución, la composición contiene un tampón fosfato o arginina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, con mayor preferencia de 10 a 50 mmoles/l de tampón fosfato. Obviamente, las combinaciones de estos sistemas tampón forman también parte de la presente invención. El pH puede ajustarse con una base apropiada, p.ej. NaOH en el sistema tampón fosfato y un ácido adecuado, p.ej. ácido sulfúrico en el sistema tampón arginina, respectivamente.

45 Las composiciones de la presente invención pueden comprender uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse entre sales, diluyentes y/o disolventes y/o conservantes farmacéuticamente aceptables, etc. p.ej. agentes tonificadores (agentes isotónicos), polioles, antioxidantes y detergentes no iónicos. Son ejemplos de estas sustancias el cloruro sódico, el cloruro cálcico, la sorbita, la manitol, la glicerina, la sacarosa, la trehalosa, la acetilcisteína, el polisorbato 20, el polisorbato 80 o el Pluronic F68.

50 En una forma preferida de ejecución de la presente invención, las composiciones farmacéuticas contienen un poliol seleccionado entre el grupo de la manitol, sorbita, glicerina, trehalosa y sacarosa, con preferencia la manitol. La concentración del poliol puede variar entre el 1 y el 10% (p/v).

55 Son ejemplos de antioxidantes la cisteína, la metionina, la acetilcisteína y el ácido ascórbico, con preferencia la metionina. Los antioxidantes se añaden normalmente en una concentración comprendida entre el 0,01 y el 0,5% (p/v) o, p.ej. en el caso de la metionina, en una concentración de 1 a 20 mM.

60 Además, las composiciones antes descritas pueden contener opcionalmente un agente isotonicador en una cantidad del 0,01 al 0,9% en peso. Estos compuestos son conocidos por el técnico en la materia; son ejemplos de tales agentes el cloruro sódico y el sulfato sódico. En una forma preferida de ejecución, la composición puede contener además un detergente no iónico, por ejemplo un polisorbato 20, polisorbato 80 o Pluronic F 68, con preferencia el Pluronic F 68, p.ej. en una cantidad de hasta el 1% (p/v), con mayor preferencia de hasta el 0,1% (p/v), p.ej. del 0,001 al 0,01% (p/v).

La composición anterior puede contener además sales adicionales, p.ej. hasta 1 mmol/l de CaCl<sub>2</sub>.

La presente invención es especialmente útil para la preparación de composiciones farmacéuticas que, como ingrediente activo farmacéutico, contienen eritropoyetina peguilada. El término “eritropoyetina” o “proteína eritropoyetina” o “EPO” indica lo siguiente: estos términos se refieren en concreto a una glicoproteína, a saber la eritropoyetina humana que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la (SEQ ID NO:1) o (SEQ ID NO:2) o una secuencia de aminoácidos fundamentalmente homóloga de las anteriores, cuyas propiedades biológicas estimulan la producción de glóbulos rojos y la división y diferenciación de los precursores de eritroide en la médula ósea. Tal como se utilizan en el presente escrito, estos términos abarcan también a las proteínas modificadas de forma deliberada, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida a un sitio, o de forma accidental por mutaciones. Estos términos abarcan también a los análogos que tienen de 1 a 6 sitios adicionales para la glicosilación, a los análogos que tienen por lo menos un aminoácido adicional en el extremo terminal carboxi de la glicoproteína, en la que el aminoácido adicional incluye por lo menos un sitio de glicosilación, y a los análogos que tienen una secuencia de aminoácido que incluye un reordenamiento de por lo menos un sitio para la glicosilación. Estos términos incluyen tanto la eritropoyetina natural humana como la obtenida por recombinación.

Tal como se describe seguidamente con detalle, la obtención y purificación de la EPO son bien conocidas en la técnica. Se entiende por eritropoyetina la proteína natural o recombinante, preferentemente humana, obtenida a partir de una fuente convencional, por ejemplo tejidos, síntesis proteica, cultivo celular de células naturales o recombinantes. Abarca también a las proteínas que tienen la actividad de la eritropoyetina, por ejemplo las muténeas y las proteínas modificadas de otro modo. La EPO recombinante puede sintetizarse por expresión en líneas celulares CHO, BHK o HeLa, por tecnología de DNA recombinante o por activación genética endógena. La expresión de proteínas, incluida la resultante de activación genética endógena, es bien conocida en la técnica y se ha publicado por ejemplo en las patentes US nº 5,733,761, 5,641,670 y 5,733,746 y en la publicación de patente internacional nº WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 90/11354, WO 91/06667 y WO 91/09955, cuyos contenidos se incorporan a la presente en calidad de referencias. Las especies preferidas de EPO para la obtención de productos de glicoproteína eritropoyetina son las especies de EPO humana. Con mayor preferencia, la especie EPO es la EPO humana que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:1 y en la SEQ ID NO:2, con mayor preferencia la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO:1.

La eritropoyetina puede ser además un análogo de glicoproteína que tenga de 1 a 6 sitios adicionales para glicosilar. La glicosilación de una proteína con uno o varios grupos oligosacáridos tiene lugar en puntos o ubicaciones específicas a lo largo de la cadena de polipéptido y afecta en gran manera a las propiedades físicas de la proteína, por ejemplo la estabilidad, la secreción, la localización subcelular y la actividad biológica. La glicosilación es normalmente de dos tipos. Los oligosacáridos con enlaces O están unidos a restos serina o treonina y los oligosacáridos con enlaces N están unidos a restos asparagina. Un tipo de oligosacárido que se halla tanto entre los oligosacáridos de enlaces N y los de enlaces O es el ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), que es un grupo de aminoazúcares que contienen 9 átomos de carbono o más. El ácido siálico es normalmente el resto terminal tanto de oligosacáridos de enlaces N como de enlaces O y, debido a que lleva una carga negativa, confiere propiedades ácidas a la glicoproteína. La eritropoyetina humana que tiene 165 aminoácidos consta de tres cadenas de oligosacárido con enlaces N y una cadena con enlace O, cadenas que forman aproximadamente el 40% del peso molecular total de la glicoproteína. La glicosilación con enlace N tiene lugar en restos asparagina situados en las posiciones 24, 38 y 83 y la glicosilación con enlace O tiene lugar en un resto serina situado en la posición 126. Las cadenas de oligosacárido se modifican con restos ácido siálico terminales. La eliminación enzimática de todos los restos ácido siálico que tiene la eritropoyetina glicosilada se traduce en una pérdida de actividad “*in vivo*” pero no “*in vitro*”, porque la sialización de la eritropoyetina impide su fijación y posterior eliminación por acción de la proteína de fijación hepática.

El término “eritropoyetina” de la presente composición farmacéutica incluye a los análogos de eritropoyetina humana que presentan uno o varios cambios en la secuencia de aminoácidos propia de la eritropoyetina humana, resultando de ello un aumento del número de sitio para el anclaje del ácido siálico. Estos análogos de glicoproteína pueden generarse por mutagénesis dirigida a un sitio que comporte adiciones, eliminaciones o sustituciones de restos aminoácido que aumenten o alteren los sitios disponibles para la glicosilación. Los análogos de glicoproteína que poseen niveles de ácido siálico superiores a los que se encuentran en la eritropoyetina humana se generan añadiendo sitios de glicosilación que no perturban la conformación secundaria o terciaria exigida para la actividad biológica. Las glicoproteínas de la presente invención incluyen además a los análogos de mayores niveles de uniones de carbohidratos en el sitio de glicosilación, lo cual normalmente supone la sustitución de uno o varios aminoácidos muy próximos a un sitio con enlace N o con enlace O. Las glicoproteínas de la presente invención abarcan además a los análogos que tienen uno o varios aminoácidos que salen del extremo carboxi de la eritropoyetina y que proporcionan por lo menos un sitio carbohidrato adicional. Las proteínas de eritropoyetina de la presente invención incluyen además a los análogos que tienen una secuencia de aminoácidos en la que ha tenido lugar un reordenamiento de por lo menos un sitio de glicosilación. Tal reordenamiento de sitios de glicosilación incluye la supresión de uno o varios sitios de glicosilación de la eritropoyetina humana y la adición de uno o varios sitios de glicosilación de origen no natural. El aumento del número de cadenas carbohidrato en la eritropoyetina y, por tanto, del número de ácidos siálicos por molécula de eritropoyetina puede conferir propiedades ventajosas, por ejemplo una mayor solubilidad, mayor resistencia a la proteólisis, menos inmunogenicidad, mayor vida media del suero y mayor actividad biológica. Los análogos de eritropoyetina con sitios adicionales de glicosilación se describen con mayor detalle en la solicitud de patente europea 640619, presentada por Elliot, publicada el 1 de marzo de 1995.

## ES 2 237 574 T3

En una forma preferida de ejecución, la composición farmacéutica de la presente invención contiene proteínas eritropoyetina con una secuencia de aminoácidos que incluye por lo menos un sitio adicional para la glicosilación, por ejemplo y sin limitarlas a él las eritropoyetinas que contienen la secuencia de la eritropoyetina humana modificadas con una de las modificaciones elegidas del grupo siguiente:

- 5 Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>;  
Asn<sup>51</sup>Thr<sup>53</sup>;  
10 Asn<sup>57</sup>Thr<sup>59</sup>;  
Asn<sup>69</sup>;  
Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;  
15 Ser<sup>68</sup>Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;  
Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
20 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Gly<sup>89</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Thr<sup>92</sup>;  
25 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Ala<sup>162</sup>;  
Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
30 Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;  
35 Asn<sup>136</sup>Thr<sup>138</sup>;  
Asn<sup>138</sup>Thr<sup>140</sup>;  
40 Thr<sup>125</sup>; y  
Pro<sup>124</sup>Thr<sup>125</sup>.

45 La notación utilizada en este escrito para la modificación de la secuencia de aminoácidos significa que la posición de la proteína no modificada correspondiente (p.ej. hEPO de la SEQ ID NO:1 o de la SEQ ID NO:2) indicada con el superíndice se ha convertido en el aminoácido que precede inmediatamente al superíndice en cuestión.

50 La proteína eritropoyetina puede ser además un análogo que tenga por lo menos un aminoácido adicional en el extremo carboxi de la glicoproteína, en cuyo caso el aminoácido adicional contiene por lo menos un sitio de glicosilación. El aminoácido adicional puede contener un fragmento péptido derivado del extremo carboxi de la gonadotropina coriónica humana. La glicoproteína es con preferencia un análogo elegido entre el grupo formado por (a) la eritropoyetina humana que posee la secuencia de aminoácidos Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln (SEQ ID NO:3), como prolongación del extremo carboxi; (b) el análogo de (a) que comprende además la EPO del tipo Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>; y (c) el análogo de (a) que comprende además la EPO del tipo Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>.

60 La proteína eritropoyetina puede ser además un análogo que tenga una secuencia de aminoácidos que tenga por lo menos un sitio de glicosilación. El reordenamiento puede suponer la eliminación de los sitios de carbohidrato unidos con enlace N de la eritropoyetina humana y además la adición de un sitio carbohidrato unido con enlace N a la posición 88 de la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina humana. La glicoproteína es con preferencia un análogo elegido del grupo formado por la EPO del tipo Gln<sup>24</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>; la EPO del tipo Gln<sup>38</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>; y la EPO del tipo Gln<sup>83</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>.

65 Más en particular, la proteína eritropoyetina de la presente composición farmacéutica antes descrita incluye derivados pegilados de la misma. Los derivados pegilados de la eritropoyetina y su obtención se conocen en la técnica y se describen por ejemplo en los documentos siguientes: EP-A-539,167, EP-A-605,963, WO 93/25212, WO 94/20069, WO 95/11924, patente US n° 5,56, EP-A-584,876, WO 92/16555, WO 94/28024, WO 97/04796, patentes US n° 5,359,030 y 5,681,811, patente US n° 4,179,337, patente japonesa, WO 98/32466, patente US n° 5,324,650. Una for-

## ES 2 237 574 T3

ma preferida de ejecución de las especies de eritropoyetina pegilada es la constituida por los derivados que se describen posteriormente.

La presente invención se refiere, pues a un conjugado de eritropoyetina, dicho conjugado comprende una proteína eritropoyetina tal como se ha descrito antes, provista de por lo menos un grupo amino libre y provista de una actividad biológica "in vivo" que aumenta la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos en la médula ósea y se elige entre el grupo formado por la eritropoyetina humana y los análogos de la misma que tengan la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación o un reordenamiento de por lo menos un sitio de glicosilación; dicha eritropoyetina está unida con enlace covalente a "n" grupos polietilenglicol de la fórmula -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-OR, formando el grupo -CO (es decir, carbonilo) de cada grupo polietilenglicol un enlace amídico con uno de dichos grupos amino; en ella, R es alquilo de bajo peso molecular; x es el número 2 ó 3; m es un número entre aprox. 450 y aprox. 900; n es un número de 1 a 3; y n y m se eligen de tal manera que el peso molecular del conjugado menos la glicoproteína eritropoyetina se sitúe entre 20 y 100 kilodaltones. Esta invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen los conjugados descritos, en ellas el porcentaje de conjugados en los que n es 1 se sitúa por lo menos en el noventa por ciento, con preferencia por lo menos en el noventa y dos por ciento, o con mayor preferencia en el noventa y seis por ciento de todos los conjugados de la composición.

Los conjugados anteriores pueden representarse más específicamente por la fórmula (I)



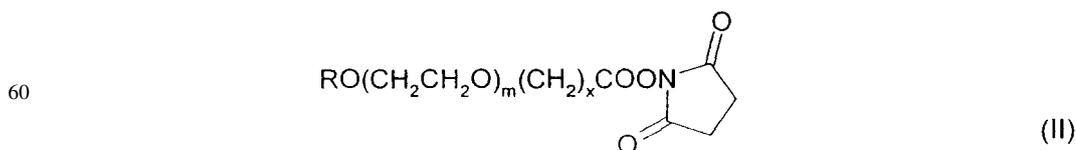
en la que P es el resto de una proteína eritropoyetina tal como se describe en este documento (es decir, sin el grupo amino o los grupos amino que forman un enlace amida con el carbonilo que aparece en la fórmula I), y tienen una actividad biológica "in vivo" que consiste en incrementar la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos en la médula ósea; y en ella, R es alquilo de bajo peso molecular; x es el número 2 ó 3; m es un número de 450 a 900; n es un número de 1 a 3; y n y m se eligen de tal manera que el peso molecular del conjugado menos la glicoproteína eritropoyetina se sitúe entre 20 y 100 kilodaltones.

Tal como se emplea en este escrito, "alquilo de bajo peso molecular" indica un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono. Son ejemplos de grupos alquilo de bajo peso molecular el metilo, etilo e isopropilo. Con arreglo a esta invención, R es cualquier alquilo de bajo peso molecular. Son preferidos los conjugados en los que R es metilo.

El símbolo "m" significa el número de restos óxido de etileno (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) dentro del grupo poli(óxido de etileno). Una subunidad PEG (polietilenglicol) del óxido de etileno tiene un peso molecular de 44 daltones. De este modo, el peso molecular del conjugado (excluyendo el peso molecular de la EPO) dependerá del número "m". En los conjugados de esta invención, "m" es un número entre aprox. 450 y aprox. 900 (equivalente a un peso molecular entre 20 y 40 kDa), con preferencia entre 650 y 750 (equivalente a un peso molecular de aprox. 30 kDa). El número "m" se elige de tal manera que el conjugado resultante de esta invención tenga una actividad fisiológica similar a la de la EPO no modificada, dicha actividad puede suponer el mismo valor, un valor superior o una fracción del valor de la actividad que despliega la EPO no modificada. Un peso molecular de "aprox." un cierto número significa un margen razonable en torno a este número, tal como se determina con las técnicas analíticas convencionales. El número "m" se elige de tal manera que el peso molecular de cada grupo polietilenglicol unido con enlace covalente a la glicoproteína eritropoyetina se sitúe entre 20 y 40 kDa, con mayor preferencia en torno a 30 kDa.

En los conjugados de esta invención, el número "n" es el número de grupos polietilenglicol unidos con enlace covalente a los grupos amino libres (incluidos los grupos ε-amino de un aminoácido lisina y/o el grupo amino terminal amino) de una proteína eritropoyetina mediante enlace(s) amida. El conjugado de esta invención puede tener uno, dos o tres grupos PEG por cada molécula de EPO. "n" es un número entero situado entre 1 y 3, "n" es con preferencia el número 1 ó 2, y con mayor preferencia "n" es 1. Un conjugado preferido entre los conjugados descritos antes está constituido por los compuestos en los que x es el número 2, m es un número entre 650 y 750, n es el número 1 y R es metilo.

El compuesto de la fórmula (I) puede obtenerse a partir de material polimérico conocido:



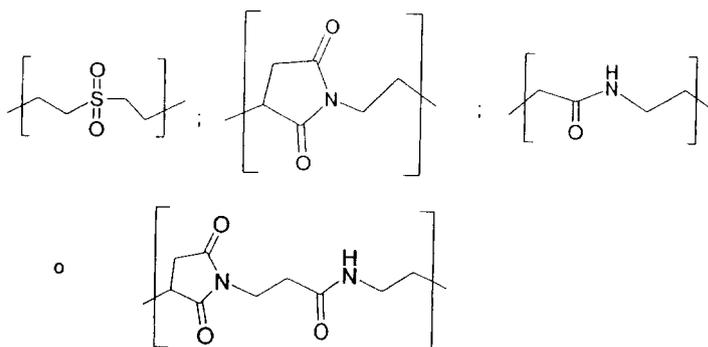
en la que R y m tienen los significados definidos antes, por condensación del compuesto de la fórmula II con glicoproteína eritropoyetina. Los compuestos de la fórmula (II) en la que x es 3 son alfa(alcoxi de bajo peso molecular)-ésteres succinimidilo del ácido butírico de polietilenglicol (alcoxi de bajo peso molecular-PEG-SBA). Los compuestos de la fórmula (II) en los que x es 2 son alfa(alcoxi de bajo peso molecular)-ésteres succinimidilo del ácido propiónico del

## ES 2 237 574 T3

polietilenglicol (alcoxi de bajo peso molecular-PEG-SPA). Puede utilizarse cualquier método convencional de reacción de un éster activado con una amina para formar una amida. En la reacción descrita anteriormente, el éster de succinimidilo del ejemplo es un grupo saliente que provoca la formación de una amida. El uso de ésteres de succinimidilo tales como los compuestos de la fórmula II para obtener conjugados de proteínas se describe en la patente U.S. n° 5,672,662, publicada el 30 de setiembre de 1997 (Harris y col.).

La EPO humana contiene nueve grupos amino libres, el grupo amino terminal amino y los grupos  $\epsilon$ -amino de 8 restos lisina. Cuando el reactivo de pegilación se combina con un compuesto SBA de la fórmula II, se observa que a pH 7,5 se produce una proporción de proteína:PEG de 1:3 y cuando la temperatura de reacción se sitúa entre 20 y 25°C se produce una mezcla de especies mono-, di-pegilada y trazas de la especie tri-pegilada. Cuando el reactivo de pegilación es un compuesto SPA de la fórmula II, en las mismas condiciones salvo que la proporción proteína:PEG es de 1:2, se produce una especie básicamente mono-pegilada. La EPO pegilada puede administrarse en forma de mezcla o en forma de especie pegilada diferente, separada por cromatografía de intercambio catiónico. Variando las condiciones de reacción (p.ej. la proporción entre los reactivos, el pH, la temperatura, la concentración de proteína, el tiempo de reacción, etc.), pueden lograrse diferentes cantidades relativas de las distintas especies pegiladas.

Las composiciones farmacéuticas descritas antes pueden contener además una proteína eritropoyetina como la que se ha definido anteriormente, provista por lo menos de un grupo amino libre y provista de una actividad biológica "in vivo" que aumenta la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos en la médula ósea y elegida entre el grupo formado por la eritropoyetina humana y análogos de la misma que tengan la estructura primaria de la eritropoyetina humana modificada por la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación; dicha glicoproteína está unida por enlace covalente con grupos (alcoxi de bajo peso molecular)-polietilenglicol en un número de uno a tres, cada grupo polietilenglicol está unido mediante enlace covalente a la glicoproteína mediante un engarce de la fórmula -C(O)-X-S-Y-, formando el C(O) del engarce o eslabón un enlace amida con uno de dichos grupos amino, X es  $-(CH_2)_k-$  o  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$ , k es un número de 1 a 10, Y es



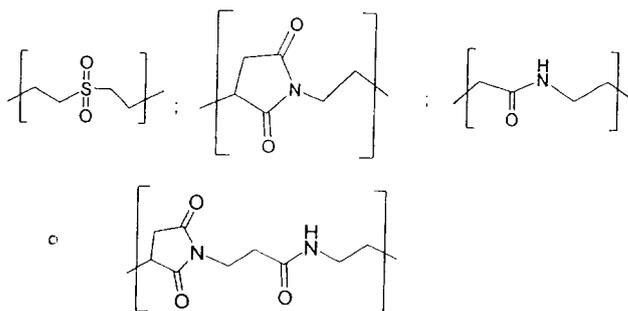
el peso molecular medio de cada fracción polietilenglicol se sitúa entre 20 kilodaltones y 40 kilodaltones y el peso molecular del conjugado se sitúa entre 51 kilodaltones y 175 kilodaltones.

Esta especie eritropoyetina puede representarse también con la fórmula (III)



en la que R puede ser cualquier alquilo de bajo peso molecular, entendiéndose por tal un grupo alquilo lineal o ramificado que tenga de uno de seis átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, isopropilo, etc. Un alquilo preferido es el metilo. X puede ser  $-(CH_2)_k-$  o  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$ , en los que k es un número de 1 a 10. k es con preferencia un número de 1 a 4, k es con mayor preferencia todavía el número 1 ó 2. X es con mayor preferencia  $-(CH_2)$ .

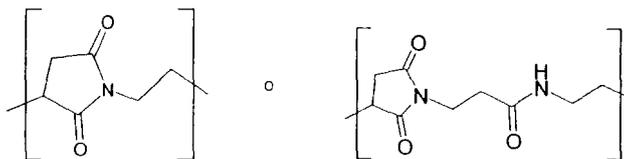
En la fórmula 1, Y es



## ES 2 237 574 T3

con preferencia

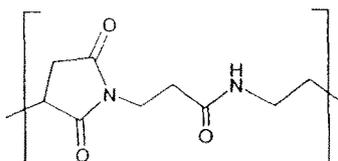
5



10

con mayor preferencia

15



20

En la fórmula (III), el número m se selecciona de tal manera que el conjugado resultante de la fórmula (III) tenga una actividad fisiológica similar a la de la EPO sin modificar, dicha actividad puede suponer un valor igual, superior a, o una fracción de la actividad correspondiente de la EPO sin modificar. m significa el número de restos óxido de etileno existentes en la unidad PEG. Una subunidad PEG (polietilenglicol) de  $-(OCH_2CH_2)-$  tiene un peso molecular de 44 daltones. De este modo, el peso molecular del conjugado (excluyendo el peso molecular de la EPO) dependerá del número m. Un peso molecular de "aprox." un cierto número significa que es un valor comprendido dentro de un intervalo razonable en torno a dicho número, tal valor es el resultado de aplicar técnicas analíticas convencionales. m es un número entero entre aprox. 450 y aprox. 900 (equivalente a un peso molecular entre 20 y 40 kDa), m se sitúa con preferencia entre 550 y 800 (entre 24 y 35 kDa) y con mayor preferencia m se sitúa entre 650 y 700 (entre 29 y 31 kDa).

25

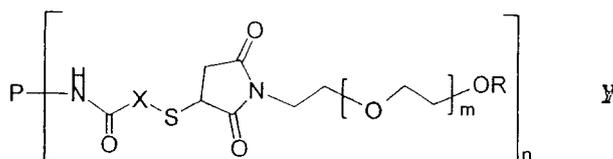
30

En la fórmula (III), el número n es el número de grupos  $\epsilon$ -amino existentes en un aminoácido lisina en una proteína eritropoyetina unida con enlace covalente a la unidad PEG mediante un enlace amida. Un conjugado de la presente invención puede tener una, dos o tres unidades PEG por cada molécula de EPO. n es un número entero de 1 a 3, n es con preferencia el número 1 ó 2 y, con mayor preferencia, n es el número 1.

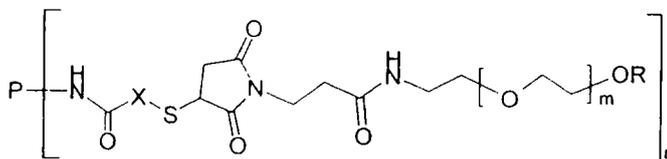
35

Las proteínas eritropoyetina preferidas de la fórmula (III) se representan en las fórmulas siguientes:

40



45

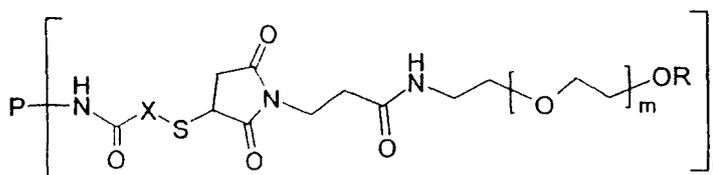


50

55

Los productos glicoproteínicos eritropoyetina más preferidos se representan mediante la fórmula:

60



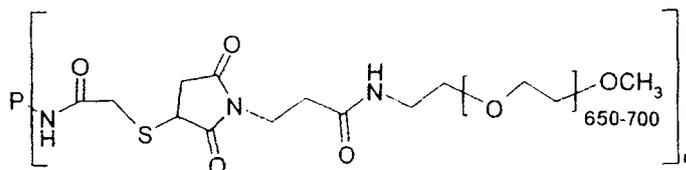
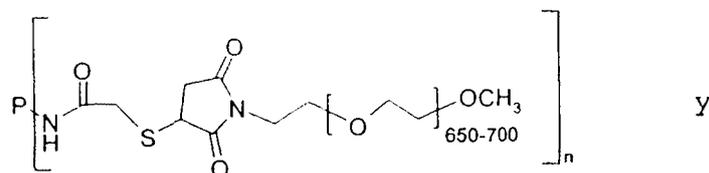
65

en dichas fórmulas, n es un número entero de 1 a 3; m es un entero de 450 a 900; R es alquilo de bajo peso molecular;

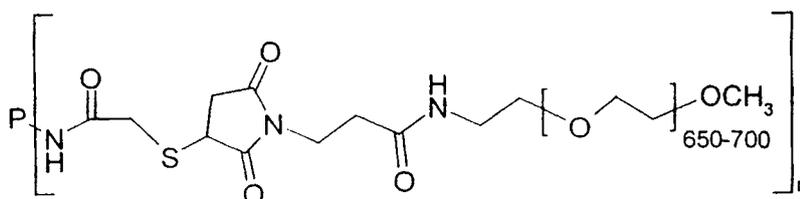
## ES 2 237 574 T3

X es  $-(CH_2)_k-$  o  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$  y P es el resto de una glicoproteína eritropoyetina sin el grupo amino o grupos que con X forman un enlace amida.

Otros productos glicoproteína eritropoyetina se representan mediante las fórmulas:

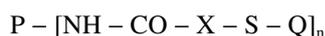


Los productos glicoproteína eritropoyetina más preferidos se representan en la fórmula:



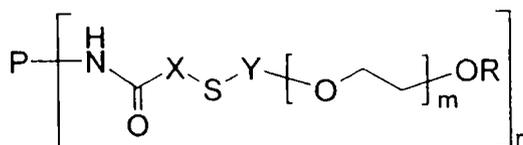
Estas proteínas eritropoyetina pueden obtenerse por

(a) reacción covalente de un grupo  $\epsilon$ -amino de un aminoácido lisina existente en una proteína eritropoyetina representada por la fórmula  $P-[NH_2]_n$ , con un reactivo bifuncional representado por la fórmula  $Z-CO-X-S-Q$ , formando un intermedio provisto de un enlace amida y representado por la fórmula:



en la que P es una proteína eritropoyetina menos el grupo amino que forma un enlace amida; n es un número entero de 1 a 3; Z es un grupo reactivo, p.ej. un éster NHS de ácido carboxílico; X es  $-(CH_2)_k-$  o  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$ , en el que k es un número de 1 a 10; y Q es un grupo protector, por ejemplo alcoñilo, p.ej. acetilo.

(b) reacción covalente del producto intermedio provisto de un enlace amida de la etapa (a) con un derivado activado de polietilenglicol, representado por la fórmula  $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$ , para formar un producto glicoproteína eritropoyetina representado por la fórmula:



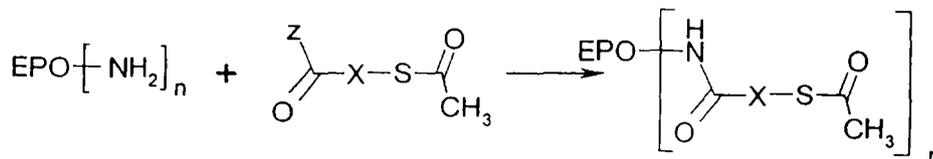
en la que W es una forma de Y reactiva con sulfhidrilo; m es un número entero entre 450 y 900; R es alquilo de bajo peso molecular; e Y tiene el significado definido anteriormente.

En esta forma de ejecución, el reactivo bifuncional es con preferencia el S-acetiltiopropionato de N-succinimidilo o el S-acetiltioacetato de N-succinimidilo, Z es con preferencia la N-hidroxi-succinimida y el derivado polietilenglicol activado  $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$  se elige con preferencia del grupo formado por yodo-acetil-metoxi-PEG, metoxi-PEG-vinilsulfona y metoxi-PEG-maleimida.

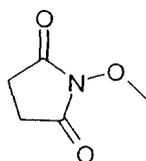
Más en concreto, las proteínas eritropoyetina de la fórmula (III) pueden obtenerse por enlace covalente de grupos tiol con EPO ("activación") y unión de la EPO activada resultante con un derivado de polietilenglicol (PEG). La

## ES 2 237 574 T3

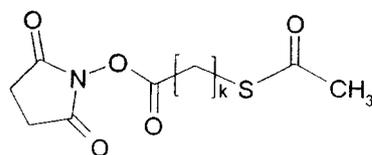
primera etapa de la obtención de la EPO pegilada según la presente invención consiste en crear el enlace covalente entre los grupos tiol y los grupos NH<sub>2</sub> de la EPO. La activación de la EPO se efectúa con reactivos bifuncionales que llevan un grupo tiol protegido y un grupo reactivo adicional, por ejemplo los ésteres activos (p.ej. ésteres de succinimidilo), los anhídridos, los ésteres de ácidos sulfónicos, los halogenuros de ácidos carboxílicos y de ácidos sulfónicos, respectivamente. El grupo tiol se protege con grupos conocidos en la técnica, p.ej. grupos acetilo. Estos reactivos bifuncionales son capaces de reaccionar con los grupos ε-amino de los aminoácidos lisina formando un enlace amida. La primera etapa de la reacción se representa como sigue:



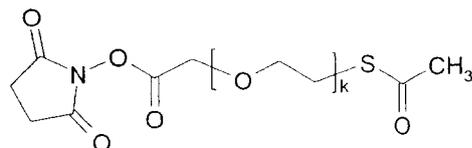
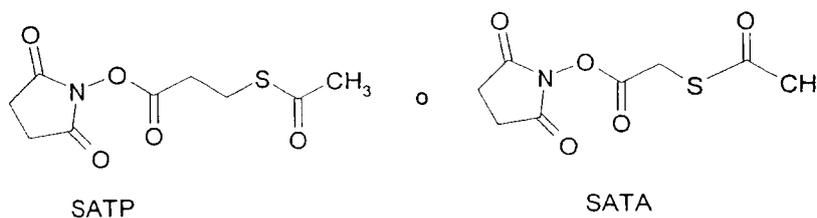
EPO, n y X tienen los significados definidos anteriormente y Z es un grupo reactivo conocido en la técnica, p.ej. un sustituyente N-hidroxi-succinimida (NHS) de la fórmula



En una forma preferida de ejecución, la activación de los grupos ε-amino de la lisina se efectúa por reacción con reactivos bifuncionales que tengan una fracción succinimidilo. Los reactivos bifuncionales pueden llevar diferentes especies de espaciadores, p.ej. segmentos  $-(\text{CH}_2)_k-$  o  $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$ , en los que k es un número de 1 a 10, con preferencia de 1 a 4 y con mayor preferencia 1 ó 2, y con preferencia especial el número 1. Son ejemplos de estos reactivos el S-acetiltiopropionato de N-succinimidilo (SATP) y el S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA).



éster NHS de ácido acetiltioalquilcarboxílico, p.ej.



éster NHS de ácido 2-acetiltio-(etoxi)<sub>k</sub>-acético

teniendo k el significado definido anteriormente.

La obtención de reactivos bifuncionales ya es conocida en la técnica. En el documento DE-3924705 se describen

## ES 2 237 574 T3

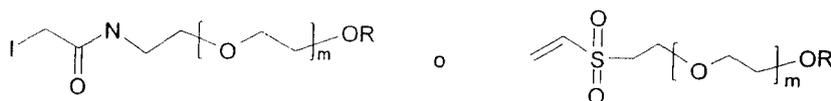
precursores de ésteres NHS de ácido 2-acetilto-(etoxi)<sub>k</sub>-acético, mientras que la derivatización para obtener el compuesto acetiltio se describe en March, J., *Advanced Organic Chemistry*, McGraw-Hill, 1977, 375-376. El SATA es un producto comercial (Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos y Pierce, Rockford, IL).

5 El número de grupos tiol que hay que añadir a una molécula de EPO puede regularse ajustando los parámetros de la reacción, es decir, la concentración de proteína (EPO) y la proporción entre proteína y reactivo bifuncional. La EPO se activa con preferencia creando un enlace covalente a partir de 1 a 5 grupos tiol por cada molécula de EPO, con mayor preferencia de 1,5 a 3 grupos tiol por molécula de EPO. Estos márgenes se refieren a la distribución estadística del grupo tiol entre la población de proteínas EPO.

10 La reacción se lleva a cabo por ejemplo en una solución tampón acuosa, pH 6,5-8,0, p.ej. en fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,3. El reactivo bifuncional puede añadirse en DMSO. Una vez finalizada la reacción, con preferencia después de 30 minutos, se interrumpe la reacción por adición de lisina. El exceso de reactivo bifuncional puede separarse por métodos ya conocidos en la técnica, p.ej. por diálisis o filtración en columna. El promedio de grupos tiol añadidos a la EPO puede determinarse por métodos fotométricos, descritos por ejemplo en Grasetti, D.R. y Murray, J.F., en *J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 119, 41-49 (1967).

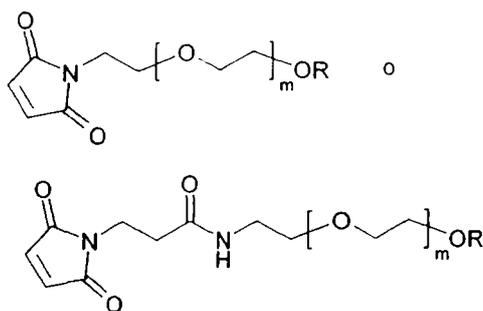
20 Después de la reacción anterior puede crearse un enlace covalente con un derivado de polietilenglicol (PEG) activado. Los derivados PEG idóneos son moléculas PEG activadas que tienen un peso molecular medio de 20 a 40 kDa, con mayor preferencia entre 24 y 35 kDa y con preferencia especial en torno a 30 kDa.

25 Los derivados PEG activados son conocidos en la técnica y se describen por ejemplo en Morpurgo, M. y col., *J. Bioconj. Chem.* (1996), 7, página 363 y sig. para el caso de la PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal y de cadena ramificada son idóneas para la obtención de compuestos de la fórmula 1. Son ejemplos de compuestos PEG reactivos el yodo-acetil-metoxi-PEG y la metoxi-PEG-vinilsulfona:

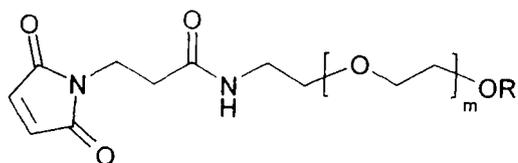


El uso de estas sustancias activadas con yodo es conocido en la técnica y se describe p.ej. en Hermanson, G.T., en *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996), pp. 147-148.

35 Las especies PEG se activan con preferencia especial con maleimida utilizando la (alcoxi-PEG-maleimida), por ejemplo la metoxi-PEG-maleimida (peso molecular 30.000; Shearwater Polymers, Inc.). La estructura de las alcoxi-PEG-maleimidadas es la siguiente:



45 en la que R y m tienen los significados definidos antes, con preferencia



55 La reacción de acoplamiento con alcoxi-PEG-maleimidadas tiene lugar después de haber eliminado “*in situ*” el grupo protector del tiol en una solución tampón acuosa, p.ej. fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,2. La eliminación del grupo protector puede efectuarse por ejemplo con hidroxilamina en DMSO a 25°C, pH 6,2, durante 90 minutos. Para la modificación con PEG, la proporción entre EPO activada y alcoxi-PEG-maleimida debería situarse entre 1:3 y 1:6, con preferencia en 1:4. La reacción puede interrumpirse por adición de cisteína y reacción de los grupos tiol (-SH) remanentes con N-metilmaleimida o bien otro compuesto capaz de formar enlaces disulfuro.

## ES 2 237 574 T3

Debido a la reacción de los grupos tiol activos remanentes con un grupo protector, por ejemplo la N-metilmaleimida o cualquier otro grupo protector idóneo, las glicoproteínas EPO de los conjugados de esta invención pueden contener tales grupos protectores. En general, el procedimiento aquí descrito generará una mezcla de moléculas provistas de tioles en diferentes cantidades y protegidos por números distintos de grupos protectores, en función del número de grupos tiol activados que tenga la glicoproteína que no estén conjugados con la PEG-maleimida.

La N-metilmaleimida forma el mismo tipo de enlace covalente cuando se emplea para bloquear los grupos tiol restantes de la proteína pegilada, en cambio los compuestos disulfuro, por una reacción de intercambio intermolecular sulfuro/disulfuro, conducen a una unión de puente disulfuro con el agente bloqueante. Los agentes bloqueantes preferidos para este tipo de reacción de bloqueo son las glutatonas oxidadas (GSSG), las cisteínas y las cistaminas. En el caso de las cisteínas no se introduce carga neta adicional en la proteína pegilada, mientras que el uso de reactivos bloqueantes GSSG o cistamina implica una carga negativa o positiva adicional.

La purificación posterior de los compuestos de fórmula (III), incluida la separación de las especies EPO mono-, di- y tri-pegiladas, puede realizarse por métodos técnicos ya conocidos, p.ej. cromatografía de columna.

Una composición que contenga derivados de eritropoyetina pegilada llevará con preferencia por lo menos un noventa por ciento de conjugados mono-PEG, es decir, en ellos  $n$  es 1, esta composición puede prepararse con arreglo al ejemplo 5. Normalmente los conjugados mono-PEG de las glicoproteínas eritropoyetina son deseables porque suelen tener una actividad mayor que los conjugados di-PEG. El porcentaje de conjugados mono-PEG y la proporción entre las especies mono- y di-PEG puede controlarse cargando fracciones más abundantes en torno al pico de elución para disminuir el porcentaje de mono-PEG o bien fracciones más escasas para aumentar el porcentaje de mono-PEG en la composición. Los conjugados con un noventa por ciento de mono-PEG constituyen un buen equilibrio entre rendimiento y actividad. A veces puede ser deseable obtener composiciones en las que por ejemplo por lo menos el noventa y dos por ciento o por lo menos el noventa y seis por ciento de los conjugados sean especies mono-PEG ( $n$  igual a 1). En una forma de ejecución de esta invención, el porcentaje de conjugados en los que  $n$  es 1 se sitúa entre el noventa y el noventa y seis por ciento.

Las composiciones según la presente invención pueden contener de 10 a 10.000  $\mu\text{g}$  de una proteína eritropoyetina por ml, tal como se definido antes. Las composiciones contienen con preferencia de 10 a 1.000  $\mu\text{g}$ , p.ej. 10, 50, 100 ó 400  $\mu\text{g}$  por ml.

Las composiciones según la presente invención pueden contener además de 10 a 10.000  $\mu\text{g}$  de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 200 mmoles/l de sulfato, de 10 a 50 mmoles/l de fosfato, pH de 6,0 a 6,5. Esta composición puede contener metionina hasta 20 mM, del 1 al 5% de un poliol (p/v), hasta el 0,1% de Pluronic F68 (p/v) y opcionalmente  $\text{CaCl}_2$  hasta 1 mM. Un ejemplo de esta composición contiene de 10 a 10.000  $\mu\text{g}$  de proteína eritropoyetina por ml, 40 mmoles/l de sulfato, 10 mmoles/l de fosfato, un 3% de manitol (p/v), metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68 (p/v), pH 6,2.

En otra forma de ejecución de la presente invención, la composición puede contener de 10 a 10.000  $\mu\text{g}$  de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 100 mmoles/l de NaCl, de 10 a 50 mmoles/l de fosfato pH 6,0 - 7,0, opcionalmente del 1 al 5% (p/v) de un poliol. Esta composición puede contener además metionina hasta 20 mM, hasta un 0,1% de Pluronic F68 (p/v) y opcionalmente 7,5  $\mu\text{moles/l}$  de  $\text{CaCl}_2$ . En concreto, esta composición puede contener de 10 a 10.000  $\mu\text{g}$  de proteína eritropoyetina por ml, 100 mmoles/l de NaCl, metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68 (p/v) y 10 mmoles/l de fosfato, pH 7,0.

La presente invención se refiere además a la composición anterior que contiene de 10 a 10.000  $\mu\text{g}$  de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 50 mmoles/l de arginina, de pH 6 a pH 6,5, de 10 a 100 mmoles/l de sulfato sódico. Además, la composición puede contener metionina hasta 20 mM, hasta un 0,1% de Pluronic F68 (p/v), opcionalmente hasta 1 mmol/l de  $\text{CaCl}_2$  y opcionalmente del 1 al 5% (p/v) de un poliol. La composición puede contener en especial de 10 a 10.000  $\mu\text{g}$  de proteína eritropoyetina por ml, 40 mmoles/l de arginina, pH 6,2, 30 mmoles/l de sulfato sódico, un 3% de manitol (p/v), metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68 (p/v) y opcionalmente 1 mmol/l de  $\text{CaCl}_2$ .

Una forma preferida de ejecución de la presente invención se refiere a composiciones que contienen de 10 a 10.000  $\mu\text{g/ml}$  de eritropoyetina, con preferencia de 25 a 500  $\mu\text{g/ml}$  de eritropoyetina y

a) fosfato sódico/potásico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 ó

b) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 120 mM, pH 6,2 ó

c) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3% de manitol (p/v), pH 6,2 ó

d) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3% de manitol (p/v), metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68 (p/v), pH 6,2 ó

e) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3% de manitol (p/v), pH 6,2 ó

## ES 2 237 574 T3

f) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3% de manitol (p/v), metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68 (p/v), pH 6,2.

5 En la forma más preferida de ejecución, las composiciones contienen una cantidad de proteína eritropoyetina de 50, 100 ó 400  $\mu\text{g/ml}$ . Las composiciones más preferidas contienen ya sea fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3% de manitol (p/v), metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68 (p/v), pH 6,2, ya sea arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3% de manitol (p/v), metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68 (p/v), pH 6,2.

10 Las composiciones de la presente invención pueden presentarse en forma de polvo secado por atomización.

10 La invención se refiere además a una composición que es un liofilizado o un polvo secado por atomización de las composiciones antes descritas. La composición puede reconstituirse para generar una solución líquida por adición de un disolvente, p.ej. agua, o aplicarse directamente p.ej. con un dispositivo de inhalación o con un dispositivo de aplicación transdermal.

15 La invención se refiere además a un procedimiento de preparación de una composición tal como se ha descrito anteriormente, que consiste en mezclar una proteína eritropoyetina con una solución que contiene un anión de carga negativa múltiple y opcionalmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables, como los definidos anteriormente.

20 La presente invención se refiere además al uso de composiciones como las definidas anteriormente para fabricar medicamentos útiles para el tratamiento y prevención de enfermedades relacionadas con la anemia en pacientes de deficiencia renal crónica (CRF), sida y/o para el tratamiento de pacientes de cáncer sometidos a quimioterapia. Incluye un método para el tratamiento y prevención de enfermedades que implican anemia en pacientes con deficiencia renal crónica (CRF), sida y pacientes de cáncer que se someten a quimioterapia, tal método consiste en la etapa de administración de una composición definida anteriormente a un paciente.

30 Otra forma de ejecución de la presente invención se refiere a dispositivos para la liberación persistente, local y sistémica, que contienen una composición definida anteriormente. Tal dispositivo puede ser cualquier tipo de implantado que proporcione una cesión controlada de eritropoyetina y que contenga la composición descrita anteriormente, p.ej. micro- o nanopartículas basadas en polímeros. La composición descrita antes puede suministrarse también en forma de jeringuilla prerrellenada o en forma de cualquier otro dispositivo de aplicación, p. ej. un dispositivo de inyección sin aguja o un dispositivo de inhalación.

35 La composición de este invento puede estar presente como una dosis unitaria para inyectable o administración intravenosa. Por otra parte, la composición de este invento puede guardarse en formas líquidas o sólidas y luego dividirse en formas de dosificación unitaria para administración intravenosa o inyectable. Por consiguiente la composición líquida de este invento puede estar presente en cantidades tan reducidas como de 0,3 ml para uso como una forma de dosificación simple para administración. Por otra parte el volumen de la composición reivindicada puede ser tan grande como de 60 litros cuando se almacena antes de distribución en una forma de dosificación envasada. En vista de su estabilidad mejorada la composición de este invento puede guardarse en grandes contenedores para poderse disponer luego en medios de envasado apropiados para distribución a doctores, pacientes y hospitales.

45 La solución inyectable de este invento puede administrarse con medios de inyección convencionales tales como jeringas que en general permiten la administración de 0,3 ml a 20 ml de esta composición en forma de dosis unitaria simple. Por otra parte, la composición de este invento puede administrarse mediante inyección utilizando ampollas que contengan esta composición como un liofilizado o como un polvo secado por pulverización que se reconstituye luego en forma convencional antes de la inyección. Por otra parte, debido a la estabilidad de las composiciones de este invento las composiciones pueden suministrarse en forma de dosificación unitaria tal como viales que contengan entre 50 alrededor de 0,3 ml y alrededor de 10 ml de esta composición. En adición, las composiciones de este invento pueden administrarse por vía intravenosa utilizando bolsas intravenosas. Estas bolsas contienen entre alrededor de 20 ml y alrededor de 500 ml de la solución dependiendo del periodo en el que ha de administrarse la solución a un paciente. De conformidad con este invento la solución líquida de este invento puede guardarse en contenedores de almacenamiento de los que puede separarse en pequeños envases de forma de dosificación para distribución a doctores, hospitales y 55 pacientes. Debido a la estabilidad de las composiciones de este invento estas composiciones pueden almacenarse en contenedores de almacenamiento durante largos periodos de tiempo antes de la administración.

60 La obtención de la eritropoyetina como ingrediente para composiciones como las descritas anteriormente o como material de partida para la obtención de derivados de eritropoyetina descritos antes se describe con detalle por ejemplo en las patentes US n° 5,547,933 y 5,621,080, EP-B-0 148 605, Huang, S.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984), 2708-2712, EP-B-0 205 564, EP-B-0 209 539 y EP-B-0 411 678 así como en Lai, P.H. y col., J. Biol. Chem. 261 (1986), 3116-3121, y Sasaki, H. y col., J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076. La eritropoyetina para fines terapéuticos puede obtenerse por medios recombinantes (EP-B-0 148 605, EP-B-0 209 539 y Egrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J. y col. (1986), Immunobiol. 72: 213-224).

65 Los métodos de expresión y obtención de la eritropoyetina en medio sin suero se describen por ejemplo en WO 96/35718, de Burg, publicada el 14 de noviembre de 1996 y en la publicación de patente europea n° 513 738, de Koch, publicada el 12 de junio de 1992. Además de las publicaciones recién mencionadas, se conoce que puede efectuarse

## ES 2 237 574 T3

una fermentación sin suero de células CHO recombinantes que contiene un gen EPO. Tales métodos se describen por ejemplo en EP-A-0 513 738, EP-A-0 267 678 y en forma general en Kawamoto, T. y col., Analytical Biochem. 130 (1983), 445-453, EP-A-0 248 656, Kowar, J. y Franek, F., Methods in Enzymology 421 (1986), 277-292, Bavister, B., Enzymology 271 (1981), 45-51, EP-A-0 481 791, EP-A-0 307 247, EP-A-0 343 635, WO 88/00967.

5 En el documento EP-A-0 267 678 se describen la cromatografía de intercambio iónico en S-Sepharose, una cromatografía HPLC preparativa de fase inversa en una columna C<sub>8</sub> y la cromatografía de filtración a través de gel para utilizarlas en la purificación de la EPO producida en cultivo sin suero después de diálisis. En este contexto se puede sustituir la cromatografía de filtración a través de gel por la cromatografía de intercambio iónico a través de S-Sepharose con flujo rápido. Se ha propuesto también realizar una cromatografía de colorante a través de una columna de Blue Trisacryl antes de proceder a la cromatografía de intercambio iónico.

15 Nobuo, I. y col., J. Biochem. 107 (1990), 352-359, describen un proceso de purificación de la EPO recombinante. En este proceso se trata la EPO con una solución de Tween<sup>®</sup> 20, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, etilmaleimida, pepsatina A, sulfato de cobre y ácido oxámico antes de realizar las etapas de purificación. Existen publicaciones, incluida la WO 96/35718, de Burg, publicada el 14 de noviembre de 1996, que describen un procedimiento de obtención de eritropoyetina en un proceso de fermentación sin suero (EPOsf).

20 La actividad específica de la EPO o de conjugados de EPO con arreglo a esta invención puede determinarse mediante varios ensayos ya conocidos en la técnica. La actividad biológica de proteínas EPO purificadas de esta invención es tal que la administración de la proteína EPo por inyección a pacientes humanos se traduce en un aumento de la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos en la médula ósea con respecto a grupos de sujetos de control no inyectados. La actividad biológica de las proteínas EPO o de fragmentos de las mismas, obtenidas y purificadas con arreglo a esta invención, puede comprobarse mediante métodos propuestos por Annable y col., Bull. Wld. Hlth. Org. 25 (1972), 47:99-112 y Pharm. Europa edición especial Erythropoietin BRP Bio 1997(2). En el ejemplo 6 se describe otro ensayo biológico para determinar la actividad de la proteína EPO, el ensayo del ratón normocitémico.

Esta invención se comprenderá mejor con los ejemplos siguientes que ilustran pero no limitan la invención aquí descrita.

### 30 **Ejemplos**

#### Ejemplo 1

#### 35 *Fermentación y purificación de la EPO humana*

##### a) *Preparación y fermentación del inóculo*

40 De la fase gaseosa del tanque de almacenaje en nitrógeno líquido se toma un vial del Banco de Trabajo Celular (Working Cell Bank), que se abastece de una línea celular CHO productora de EPO (puede utilizarse un ATCC CRL8695, publicado en EP-411 678 (Genetics Institute)). Se trasladan las células a frascos rotativos de vidrio y se cultivan en un medio tamponado con hidrogenocarbonato en un incubador humidificado de CO<sub>2</sub>. Los medios típicos sin suero utilizados para la obtención y fermentación del inóculo se publican en la solicitud de patente europea 513 738, de Koch, publicada el 12 de junio de 1992, o en WO 96/35718, de Burg, publicada el 14 de noviembre de 45 1996 y contienen por ejemplo como medio el DMEM/F12 (p.ej. JRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, US, producto nº 57-736) y además hidrogenocarbonato sódico, L+glutamina, D+glucosa, insulina recombinante, selenita sódica, diamminobutano, hidrocortisona, sulfato de hierro (II), asparagina, ácido aspártico, serina y estabilizador para células de mamíferos, p.ej. alcohol polivinílico, metilcelulosa, polidextrano, polietilenglicol, Pluronic F68, poligelina expansionadora de plasma (HEMACCEL<sup>®</sup>) o polivinilpirrolidona (WO 96/35718).

50 Se comprueba a nivel microscópico la ausencia de microorganismos contaminantes en los cultivos y de determinan las densidades celulares. Los ensayos se realizan en cada etapa de división.

55 Después del período de crecimiento inicial se diluye el cultivo celular en medio fresco hasta la densidad celular de partida y se somete a otro ciclo de crecimiento. Se repite el procedimiento hasta lograr un volumen de cultivo de aproximadamente 2 l por frasco rotatorio de vidrio. Después de unas 12 duplicaciones se dispone de 1 a 5 litros de este cultivo que se utiliza seguidamente como inóculo para el fermentador de 10 l.

60 Pasados de 3 a 5 días, el cultivo del fermentador de 10 l puede utilizarse como inóculo para el fermentador de 100 l.

Pasados otros 3-5 días de fermentación, el cultivo del fermentador de 100 l puede utilizarse como inóculo para el fermentador de producción de 1000 l.

##### 65 b) *Recolección y separación de las células*

Se utiliza un procedimiento de realimentación de partidas, es decir, una vez se alcanza la densidad celular deseada se recoge aprox. el 80% del cultivo. Se rellena el cultivo restante con medio fresco de cultivo y se cultiva hasta la

## ES 2 237 574 T3

recolección siguiente. Un ciclo productivo consiste en un máximo de 10 recolecciones consecutivas: 9 recolecciones parciales y 1 recolección final al término de la fermentación. La recolección tiene lugar cada 3-4 días.

Se traslada el volumen recolectado determinado a un reactor refrigerado. Se eliminan las células por centrifugación o filtración y se descartan. El líquido sobrenadante de la etapa de centrifugación que contiene la EPO se filtra en línea y se recoge un segundo reactor refrigerado. Cada cosecha se procesa por separado durante la purificación.

Un proceso típico de purificación de la proteína EPO se publica en WO 96/35718, de Burg, publicada el 14 de noviembre de 1996. El proceso de purificación se explica a continuación.

### a) *Cromatografía a través de Blue Sepharose*

El Blue Sepharose (Pharmacia) consiste en perlas de Sepharose sobre cuya superficie se ha fijado el colorante Cibacron blue por enlace covalente. La EPO se une al Blue Sepharose con mayor fuerza que la mayoría de contaminantes no proteínicos, algunas impurezas proteínicas y el PVA, por consiguiente la EPO puede aumentar de concentración durante esta etapa. La elución a través de la columna de Blue Sepharose se lleva a cabo aumentando la concentración de sal y el pH.

Se rellena la columna con 80-100 l de Blue Sepharose, regenerada con NaOH y equilibrada con tampón (cloruro sódico/cálcico y acetato sódico). Se carga el líquido sobrenadante del fermentador acidificado y filtrado. Una vez finalizada la carga se lava la columna primero con un tampón similar al tampón de equilibrado que contiene una mayor concentración de cloruro sódico y a continuación con un tampón basado en Tris. Se eluye el producto con un tampón basado en Tris y se recoge en una sola fracción con arreglo al perfil maestro de elución.

### b) *Cromatografía a través de Butyl Toyopearl*

El Butyl Toyopearl 650 C (Toso Haas) es una estructura basada en poliestireno, sobre ella se unen con enlaces covalentes restos butilo alifáticos. La EPO se une a este gel con mayor fuerza que la mayoría de impurezas y el PVA, por lo tanto tiene que eluirse con un tampón que contenga isopropanol.

Se rellena la columna con 30-40 l de Butyl Toyopearl 650 C, regenerador con NaOH, se lava con un tampón basado en el Tris y se equilibra con un tampón basado en Tris que contenga isopropanol.

El líquido eluido a través de Blue Sepharose se ajusta a la concentración del isopropanol dentro del tampón de equilibrado de la columna y se carga en la columna. Se lava la columna con tampón de equilibrado con una mayor concentración de isopropanol. Se eluye el producto con tampón (tampón basado en Tris con contenido alto de isopropanol) y se recoge en una sola fracción con arreglo al perfil maestro de elución.

### c) *Cromatografía a través de Ultrogel de hidroxiapatita*

El Ultrogel de hidroxiapatita (Biosepra) consiste en hidroxiapatita que se incorpora a una estructura (matriz) de agarosa para mejorar sus propiedades mecánicas. La EPO tiene poca afinidad con la hidroxiapatita y por tanto puede eluirse empleando concentraciones de fosfato menores que para el caso de impureza de proteína.

Se rellena la columna con 30-40 l de Ultrogel de hidroxiapatita y se regenera con un tampón de fosfato potásico/cloruro cálcico y NaOH y después con un tampón basado en Tris. A continuación se equilibra con un tampón basado en Tris que contenga una pequeña cantidad de isopropanol y cloruro sódico.

Después de la cromatografía a través de Butyl Toyopearl, el líquido eluido que contiene la EPO se carga en la columna. Seguidamente se lava la columna con tampón de equilibrado y tampón basado en Tris sin isopropanol ni cloruro sódico. Se eluye el producto con un tampón basado en Tris que contenga una concentración baja de fosfato potásico y se recoge una solución fracción con arreglo al perfil maestro de elución.

### d) *Cromatografía HPLC de fase inversa con Vydac C4*

El Vydac C4 (Vydac), material de la cromatografía HPLC en fase inversa, consiste en partículas de gel de sílice cuya superficie lleva cadenas de alquilo C4. La separación de la EPO de las impurezas proteínicas se basa en las diferencias existentes en su fuerza de interacción hidrófoba. La elución se realiza con un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético diluido.

La cromatografía HPLC se lleva a cabo utilizando una columna de acero inoxidable (relleno: de 2,8 a 3,2 litros de gel de sílice Vydac C4). El líquido eluido a través de Ultrogel de hidroxiapatita se acidifica por adición de ácido trifluoroacético y se carga en la columna de Vydac C4. Para el lavado y la elución se emplea un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético diluido. Se recogen las fracciones y se neutralizan inmediatamente con tampón fosfato. Se reúnen las fracciones de EPO comprendidas dentro de los límites IPC.

## ES 2 237 574 T3

### e) Cromatografía a través de DEAE Sepharose

El material DEAE Sepharose (Pharmacia) consiste en grupos dietilaminoetilo (DEAE) unidos a la superficie de las perlas de Sepharose mediante enlaces covalentes. La unión entre la EPO y los grupos DEAE se debe a interacciones iónicas. El acetonitrilo y el ácido trifluoroacético pasan por la columna sin ser retenidos. Una vez han salido estas sustancias, se eliminan las impurezas existentes en cantidades de trazas por lavado de la columna con tampón acetato a pH bajo. A continuación se lava la columna con tampón fosfato neutro y se eluye la EPO con un tampón que tengan mayor fuerza iónica.

Se rellena la columna con DEAE Sepharose de flujo rápido. Se ajusta el volumen de la columna para asegurar una carga de EPO dentro del margen de 3 a 10 mg de EPO por ml de gel. Se lava la columna con agua y tampón de equilibrado (fosfato sódico/potásico). Se reúnen las fracciones de líquido eluido de la HPLC y se carga en la columna, lavando esta con tampón de equilibrado. A continuación se lava la columna con tampón de lavado (tampón de acetato sódico) y después con tampón de equilibrado. A continuación se eluye la EPO de la columna con tampón de elución (cloruro sódico, fosfato sódico/potásico) y se recoge una sola fracción con arreglo al perfil maestro de elución.

Se ajusta el líquido eluido a través de la columna de DEAE Sepharose a la conductividad especificada. Se filtra en condiciones estériles la sustancia farmacológica resultante, se envasa en frascos de Teflon y se almacena a -70°C.

### 20 Ejemplo 2

#### *Pegilación de la EPO con mPEG-SBA*

La EPO purificada con arreglo al procedimiento sin suero del ejemplo 1 (EPOsf) es homogénea según se determina por métodos analíticos y presenta los patrones típicos que consisten en 8 isoformas. Tiene una actividad biológica específica de 190.000 IU/mg según se determina por el ensayo del ratón normocitémico. El reactivo de pegilación empleado es el metoxi-PEG-SBA, que es un compuesto de la fórmula II en la que R es metilo; x es 3; y m es un número de 650 a 750 (promedio en torno a 680, equivalente a un peso molecular medio de unos 30 kDa).

### 30 *Reacción de pegilación*

A cien miligramos de EPOsf (9,71 moles de material que contiene 10,3 mg/ml de EPOsf, 5,48  $\mu$ moles) se le añaden 10 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,5, que contiene 506 mg de metoxi-PEG-SBA de 30 kDa (16,5  $\mu$ moles) (adquirido a la empresa Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama), y se mezclan a temperatura ambiente (20-23°C) durante 2 h. La concentración final de proteína es de 5 mg/ml y la proporción entre proteína y reactivo PEG es de 1:3. Pasadas dos horas se interrumpe la reacción ajustando el pH a 4,5 con ácido acético glacial y se almacena a -20°C hasta quedar listo para la purificación.

#### *Purificación*

1. Mezcla de conjugado: En una columna de vidrio AMICON (2,2 x 7,5 cm) se introducen 28 ml de relleno SP-SEPHAROSE FF (resina sulfo-propilo de intercambio catiónico) y se equilibra con 20 mM de tampón acetato, pH 4,5 con un caudal de 150 ml/h. Se diluyen seis mililitros de la mezcla reaccionante que contienen 30 mg de proteína 5 veces con el tampón de equilibrado y se cargan a la columna. Los materiales no adsorbidos se eliminan por lavado con el tampón y la mezcla de conjugados PEG adsorbidos se eluyen de la columna con NaCl 0,175 M en el tampón de equilibrado. La EPOsf sin modificar que continúa dentro de la columna se eluye con NaCl 750 mM. Se reequilibra la columna con el tampón inicial. Se analizan las muestras por SDS-PAGE y se determina su grado de pegilación. Se encuentra que el líquido eluido con NaCl 0,175 M contiene especies mono- y di-pegiladas así como trazas de especies tri-pegiladas, mientras que el líquido eluido con NaCl 750 mM contiene EPOsf sin modificar.

2. EPOsf mono-PEG y di-PEG: Se diluye 4 veces con el tampón la mezcla purificada de conjugados eluida de la columna en la etapa anterior, se vuelve a cargar en la columna y se lava del modo descrito. Se eluyen por separado la EPOsf di-PEG y la EPOsf mono-PEG empleando como eluyente NaCl 0,1 M y NaCl 0,175 M, respectivamente. La elución se realiza además con NaCl 750 mM con el fin de eluir toda la EPOsf sin modificar que pudiera quedar en la columna.

Como alternativa se diluye la mezcla reaccionante 5 veces con tampón acetato y se carga en la columna de SP-Sepharose (~0,5 mg de proteína/mg de gel). Se lava la columna y se eluyen la EPOsf mono-PEG, la EPOsf-di-PEG y la EPOsf sin modificar que estaban adsorbidas del modo descrito en la sección anterior.

#### *Resultados*

Se sintetiza la EPOsf-PEG por conjugación química con una molécula lineal de PEG de peso molecular medio de 30 kDa. La EPOsf-PEG se deriva de la reacción entre los grupos amino primarios de la EPOsf con el derivado éster succinimidilo de un ácido butírico-PEG de 30 kDa, resultando de tal reacción un enlace amida.

Los resultados se resumen en la tabla 1. La mezcla de conjugados purificados contiene EPOsf mono- y di-PEG y está libre de EPOsf sin modificar, según se determina por análisis SDS-PAGE. La mezcla de conjugados forma 23,4

mg o el 78% del material de partida. La separación por cromatografía de intercambio catiónico de las EPOsf mono- y di-PEG indica que la proporción entre conjugados mono- y di-PEG dentro de la mezcla se sitúa casi en 1:1. Una vez finalizada la reacción, la proporción entre los componentes individuales mono:di:sin modificar se sitúa en 40:38:20 (%). El rendimiento global es casi cuantitativo.

TABLA 1

*Resumen de resultados de pegilación de EPOsf*

Muestra	Proteína (mg)	Rendimiento (%)
mezcla reaccionante	30	100
mono-	12,0	40
di-	11,4	38
sin modificar	6,0	20
mezcla conjug.	23,4	78

## Ejemplo 3

*Pegilación de EPO con mPEG-SPA*

Una parte alícuota diferente de la EPOsf utilizada en el ejemplo 2 se hace reaccionar con 30 kDa de metoxi-PEG-SPA (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama). Se realiza la reacción con una proporción entre proteína y reactivo de 1:2 y se emplean técnicas de purificación con arreglo al ejemplo 2. Se obtiene básicamente una especie mono-pegilada.

## Ejemplo 4

*Unión covalente de los grupos tiol con la EPO*

Este ejemplo ilustra la determinación de las condiciones de reacción para lograr una unión covalente de los grupos tiol con la EPO. Para determinar las condiciones se añaden diferentes cantidades de un reactivo que contiene un grupo tiol bloqueado, en este caso SATA o SATP (disuelto en DMSO a razón de 10 mg/ml), a la solución de EPO, en este caso 1 ml de 5 mg/ml de EPO en fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,3. Se agita la reacción durante 30 minutos (25°C) y se interrumpe por adición de una solución 1 M de lisina hasta alcanzar una concentración de 10 mM. Las cantidades en exceso de SATA o SATP se eliminan por diálisis frente a fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM y EDTA 2 mM, pH 6,2. Una vez eliminado el grupo acetilo protector con hidroxilamina se determina fotométricamente con ditiodipiridina el número de grupos tiol unidos a la EPO con enlace covalente según el método descrito por Grasetti, D.R. y Murray, J.F. en J. Appl. Biochem. Biotechnol. 119, pp. 41-49 (1967).

El número de grupos tiol unidos por enlace covalente a la molécula de EPO se muestra seguidamente.

Proporción molar EPO:SATA o EPO:SATP	Moles de grupos tiol/mol de EPO
EPO:SATA = 1:3	1,5
EPO:SATA = 1:5	2,4
EPO:SATA = 1:6	3,2
EPO:SATP = 1:3	1,3
EPO:SATP = 1:4	2,5
EPO:SATP = 1:6	3,7

## Ejemplo 5

*Modificación de EPO activada con metoxi-PEG-maleimida*5 A) *Activación de la EPO*

Se activan 100 mg de EPO producida según el ejemplo 1 (190.000 IU/mg, determinado por el ensayo del ratón normocitémico) con SATA (proporción molar EPO/SATA = 1/5) según el ejemplo 2. La EPO resultante ("EPO activada") lleva grupos tiol bloqueados, unidos mediante enlace covalente, se separa por diálisis de los productos secundarios del tipo N-hidroxi-succinimida y SATA no reaccionado, tal como se describe en el ejemplo 1. Se obtiene una solución de 10 4,5 mg/ml de EPO activada en fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,2.

B) *Pegilación de la EPO activada*

15 Se disuelven 380 mg de metoxi-PEG-maleimida que tienen la estructura "más preferida" ilustrada antes (peso molecular 30.000; Shearwater Polymers, Inc., Huntsville (Alabama, Estados Unidos)) en la solución anterior que contiene 95 mg de EPO activada (4,5 mg/ml en fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,2). La proporción molar resultante entre EPO activada y la metoxi-PEG-maleimida en la solución es de 1:4. Añadiendo una solución acuosa 1 M de hidroxilamina hasta alcanzar una concentración de 30 mM, pH 6,2, a la solución anterior, se desbloquean los grupos tiol bloqueados y unidos por enlace covalente con la EPO activada. La EPO activada resultante de la mezcla reaccionante en solución contiene grupos tiol (-SH) libres. Después del desbloqueo de los grupos tiol se efectúa inmediatamente la reacción de unión de la EPO activada, provista ahora de grupos tiol (-SH) libres, con la metoxi-PEG-maleimida durante 90 minutos (agitación a 25°C). Se interrumpe la reacción de unión añadiendo a la mezcla reaccionante una solución acuosa 0,2 M de cisteína hasta alcanzar una concentración de 2 mM. Pasados 20 minutos, el exceso de grupos tiol libres de la EPO activada, que no hayan reaccionado con la metoxi-PEG-maleimida, se bloquean añadiendo una solución 0,5 M de N-metilmaleimida en DMSO hasta alcanzar una concentración de 5 mM. Pasados 30 minutos, la mezcla reaccionante obtenida, que ahora contiene especies EPO pegiladas, se dializa con fosfato potásico 10 mM, pH 7,5 durante  $\geq 15$  horas.

30 C) *Purificación de especies EPO pegiladas*

Para separar las especies EPO pegiladas de la mezcla reaccionante se efectúa el siguiente proceso de purificación: Se equilibra una columna de 50 ml de Q-Sepharose FF con fosfato potásico 10 mM, pH 7,5. Se carga en la columna la mezcla reaccionante obtenida en la etapa B) (caudal: 3 volúmenes de columna (VC) por hora). Con el fin de separar el reactivo metoxi-PEG-maleimida que no haya reaccionado se lava la columna con 5 VC de fosfato potásico 10 mM, pH 7,5. Se separa la especie EPO pegilada por elución con un gradiente de sal creciente que consiste en 5 VC de tampón A ( fosfato potásico 10 mM, pH 7,5) y 5 VC de tampón B (fosfato potásico 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5) con un caudal de 3 VC por hora. Basándose en el gradiente de NaCl se eluyen en primer lugar las especies EPO pegiladas (especies EPO tri-, di- y mono-pegiladas), después se eluyen las especies EPO no pegiladas. La fracción de líquido eluido que contiene las especies EPO pegiladas (especies EPO tri-, di- y mono-pegiladas) se reúne y se filtra (filtración 40 estéril a través de un filtro 0,2  $\mu$ m).

El contenido y la pureza de las especies EPO tri-, di- y mono-pegiladas se evalúa con geles SDS-PAA teñidos con colorante Coomassie (Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970)), mientras que las concentraciones de proteína se determinan a 280 nm según la ley de Beer-Lambert. Los peso moleculares aparentes de las especies EPO se determinan por electroforesis SDS-PAA y se sitúan en torno a 68 kDa (especie EPO mono-pegilada), en torno a 98 kDa (especie EPO di-pegilada) y en torno a 128 kDa (especie EPO tri-pegilada).

La ulterior separación de las especies EPO tri-, di- y mono-pegiladas puede llevarse a cabo por cromatografía, p.ej. por cromatografía de exclusión de tamaños (Superdex, pg 200; Pharmacia). La determinación de la actividad biológica "in vivo" de los líquidos eluidos que contienen las especies tri-, di- y mono-pegiladas se realiza por el método descrito posteriormente.

## Ejemplo 6

55

*Actividad "in vivo" de la EPO pegilada, determinada por el ensayo del ratón normocitémico*

El ensayo biológico del ratón normocitémico ya es conocido en la técnica (Pharm. Europa, edición especial: Erythropoietin BRP Bio 1997(2)) así como un método de la monografía de la eritropoyetina de la Ph. Eur. BRP. Se diluyen las muestras en BSA-PBS. A los ratones de salud normal, de 7-15 semanas de edad, se les administran por vía subcutánea 0,2 ml de la fracción de EPO que contiene la EPO no pegilada o las EPO tri-, di- o mono-pegiladas del ejemplo 2 ó 3. Durante un período de 6 días se extrae sangre por punción de la vena caudal y se diluye de tal manera que 1  $\mu$ l de sangre esté presente en 1 ml de una solución colorante anaranjada de acridina 0,15  $\mu$ molar. El período de tintura es de 3 a 10 minutos. El recuento de reticulocitos se efectúa por microfluorimetría en un citómetro de flujo por análisis del histograma de fluorescencia roja. El número de reticulocitos se expresa en forma de figuras absolutas (por cada 30.000 células sanguíneas analizadas). En cuanto a los datos presentados, cada grupo consta de 5 ratones por día y se extrae sangre de los ratones solamente una vez.

## ES 2 237 574 T3

En ensayos separados se administran a los ratones una dosis única de EPO sin modificar (25 ng de EPO), la mezcla PEG(SBA)-EPO del ejemplo 2 (10 ng de conjugado), las EPO mono- y di-pegiladas del ejemplo 2 (10 ng de conjugado), la EPO PEG(SPA) del ejemplo 3 (10 ng de conjugado) y la solución tampón. Los resultados se recogen en la tabla 2. Los resultados confirman la actividad superior y la prolongada vida media de las especies EPO pegiladas, que se ponen de manifiesto con las cantidades significativamente mayores de reticulocitos y por el aumento del número máximo de reticulocitos utilizando la misma dosis por ratón (10 ng), por comparación con la dosis de 25 ng de EPO sin modificar.

TABLA 2

	EPO (no modif. )	SPA PEG 30 kDa	Mono 30K SBA	Di 30K SBA	PEG-EPO SBA Mezcla de conjugados	Contro l tampón
72 h	1000	1393	1411	994	1328	857
96 h	500	1406	1501	926	1338	697
120 h	~200	1100	1182	791	944	701
144 h	~0	535	607	665	660	708

### Ejemplo 7

#### *Obtención de EPO predominantemente mono-PEG*

##### *Reacción de pegilación*

Partiendo de 100 mg (5,48  $\mu$ moles) de EPOsf en tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, obtenida con arreglo al ejemplo 1, se añaden 329 mg (10,96  $\mu$ moles) de reactivo PEG-SBA 30 kDa disuelto en 3 ml de HCl 1 mM. Se añade tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, suficiente para que el volumen de la mezcla reaccionante alcance los 20 ml. La concentración final de proteína es de 5 mg/ml y la proporción entre proteína y reactivo PEG se sitúa en 1:2. Se mezcla la masa reaccionante durante 2 h a temperatura ambiente (20-22°C). Pasadas 2 h se interrumpe la reacción ajustando el pH a 4,5 con ácido acético glacial y almacenando el material congelado a -20°C hasta que esté listo para la purificación.

##### *Purificación*

Se diluye la mezcla reaccionante de la etapa anterior en proporción 1:5 con acetato sódico 10 mM, pH 4,5, y se carga en una columna de 4,2 x 19 cm, cuyo relleno son 300 ml de SP-Sepharose FF (resina sulfopropilo de intercambio catiónico). La columna se equilibra previamente con el mismo tampón. Los líquidos eluidos de la columna se controlan a 280 nm con un monitor Gilson UV y se traza la gráfica correspondiente en un registro Kipp & Zonen. Se lava la columna con 300 ml o con 1 volumen de columna de tampón de equilibrado para eliminar el exceso de reactivos, productos secundarios de la reacción y EPO-PEG oligomérica. Después se lava con 2 volúmenes de columna de NaCl 100 mM para eliminar la EPO di-PEG. A continuación se eluye la EPO mono-PEG con NaCl 200 mM. Durante la elución de la EPO mono-PEG se descartan los primeros 50 ml del pico de proteína, recogiendo la EPO mono-PEG en forma de fracción de 150 ml. La EPOsf sin modificar que permanece en la columna se eluye con NaCl 750 mM. Todos los tampones de elución se preparan del tampón de equilibrado. Todas las muestras eluidas se analizan por SDS-PAGE y por cromatografía de exclusión de tamaños de alta resolución (SEC). El conjunto de EPO mono-PEG obtenida de la fracción de 150 ml, que no contiene EPOsf sin modificar detectable, se concentra hasta ~4,5-7,5 mg/ml y se diafiltra en el tampón de almacenaje, fosfato potásico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5. La concentración/diafiltración se efectúa a temperatura ambiente en un sistema Millipore Labscale™ TFF, equipado con una membrana Millipore Pellicon XL Biomax 50 de corte en 50 kDa. La EPO mono-PEG concentrada se filtra en condiciones estériles y se almacena congelada a -20°C.

Aproximadamente el 75% de la EPOsf está pegilada. Después de la purificación, el rendimiento total es de ~30% de EPO mono-PEG con una cantidad no detectable de EPOsf sin modificar y en torno al 25% de EPO di-PEG. Los

## ES 2 237 574 T3

oligómeros y la EPOsf sin pegilar se cuenta como proteína restante. El conjunto de EPO mono-PEG obtenida a partir de la fracción de 150 ml contiene aproximadamente un 90% de EPO mono-PEG y aproximadamente un 10% de EPO di-PEG.

### 5 Ejemplo 8

*Termoestabilidad de la EPO y de la EPO pegilada en varias formulaciones: análisis DSC (calorimetría de escaneo diferencial)*

10 Se acepta en general que la temperatura de transición de desnaturalización térmica, medida por calorimetría de escaneo diferencial, es un indicador válido de la termoestabilidad de las proteínas. Se analizan soluciones de eritropoyetina o de eritropoyetina pegilada con concentraciones comprendidas entre 0,6 y 1,2 mg/ml en diversos tampones con o sin estabilizadores mediante la nano-DSC (Calorimetric Sciences Corporation, Utah, Estados Unidos), calentando a razón de 2 K/min. Un aumento de la temperatura de transición indica un aumento de la estabilidad térmica de la proteína. Los valores de temperatura medidos no deben tomarse como valores absolutos sino como diferencias de estabilidad entre las distintas formulaciones individuales entre sí.

Con el fin de definir el pH óptimo de la formulación se estudia la desnaturalización térmica de la eritropoyetina pegilada en función del pH en el intervalo comprendido entre 4 y 9. Se analizan muestras de proteína en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 mM, citrato sódico 30 mM, borato 30 mM. La figura 3 muestra una meseta de temperatura máxima de transición entre pH 6 y pH 9 y un fuerte descenso por debajo de pH 5,5. Esto indica que el pH óptimo para una estabilidad térmica máxima se sitúa por encima de pH 5,5 (figura 3).

Con el fin de investigar el efecto de la fuerza iónica se determina la desnaturalización térmica en función de la concentración de fosfato. La figura 4 demuestra que la estabilidad térmica aumenta cuando aumenta la fuerza iónica de la formulación.

Se investiga también con la DSC la influencia que tiene la sustancia tampón. De la figura 5 se deriva que los tampones o aditivos más idóneos para conseguir una estabilidad térmica elevada son el sulfato, el citrato o el fosfato. La glicina que se utiliza como tampón en las formulaciones convencionales (ver antes) no es muy indicada.

La figura 6 demuestra que el sulfato es también un tampón/aditivo idóneo para pH bajo (p.ej. pH 6,2), mientras que el fosfato es menos indicado para pH 6,2 que para pH 7,5. Esto indica que el sulfato mantiene alta la estabilidad térmica, incluso a pH bajo. Estos resultados hacen viables las formulaciones a un pH comprendido entre 6,0 y 6,5, sin pérdidas graves de estabilidad térmica de la eritropoyetina.

### Ejemplo 9

*Agregación de EPO y peg-EPO bajo la acción del calor, análisis SDS-PAGE (electroforesis a través de gel de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico)*

Con el fin de investigar el efecto de la aportación de calor a la proteína eritropoyetina, se exponen al calor (20 min a 80°C) muestras de diferentes formulaciones y se analizan por electroforesis a través de gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones reductoras (con DTT en el tampón de la muestra) y no reductoras (sin DTT en el tampón de la muestra). Este método permite la detección de la formación de agregados covalentes. Tal como se ha apuntado antes, la formación de agregados es una de las principales vías de degradación de proteínas y por tanto debería impedirse que este fenómeno ocurriera en las formulaciones farmacéuticas de proteínas. Los agregados detectables en ausencia de agente reductor (p.ej. DTT) y no detectables en presencia de agente reductor es muy probable que se formen por puentes disulfuro incorrectos, una reacción de oxidación, por acción del calor. La figura 5 representa la agregación por acción del calor en función del pH. Este ensayo demuestra claramente que la formación de agregados se evita por debajo de pH 6,5. Cuanto más alto es el pH, tanto mayor será la cantidad de agregación. La mayoría de agregados que se forman pueden reducirse por tratamiento de las muestras con un agente reductor durante la SDS-PAGE, sugiriendo que una gran porción de los agregados formados por acción del calor son dímeros unidos mediante puente disulfuro, oligómeros u otros agregados de orden superior. En su conjunto, esto indica que la formación de agregados puede impedir en gran manera manteniendo el pH de la formulación en o por debajo de 6,5.

Figura 7: Agregación de la peg-EPO en función del pH. Después de someterlas al calor (tal como se describe antes), las muestras de peg-EPO se analizan por SDS-PAGE. Las proteínas se colorean con plata. Calle 1: peso molecular estándar. Calle 2: pH 5. Calle 3: pH 5, reducido. Calle 4: pH 6. Calle 5: pH 6, reducido. Calle 6: pH 6,5. Calle 7: pH 6,5, reducido. Calle 8: pH 7. Calle 9: pH 7, reducido. Calle 10: peg-EPO no sometida al calor.

La formación de agregados puede impedirse también utilizando antioxidantes. La figura 8 muestra que el uso de 1 mg/ml de acetilcisteína como antioxidante impide la formación de agregados por acción del calor. Por lo tanto es útil utilizar un antioxidante, por ejemplo la acetilcisteína, a pH bajo, p.ej. pH 6,2, para impedir la formación de agregados por acción del calor.

Figura 6: La agregación de la peg-EPO puede impedirse por pH 6,2 y/o por acetilcisteína. Las muestras de peg-EPO sometidas al calor (tal como se describe antes) se analizan por SDS-PAGE. Las proteínas se colorean con plata.

## ES 2 237 574 T3

Calle 1: peg-EPO no sometida al calor. Calle 2: pH 7,5, sometida al calor. Calle 3: pH 6,2, sometida al calor. Calle 4: pH 6,2, sometida al calor, reducida. Calle 5: pH 7,5, 1 mg/ml de acetilcisteína, sometida al calor. Calle 6: pH 7,5, 1 mg/ml de acetilcisteína, sometida al calor, reducida.

### 5 Ejemplo 10

*Estabilidad de la peg-EPO en varias formulaciones a 4, 25, 30 y 40°C*

10 Se incubó la EPO pegilada en varias formulaciones a diversas temperaturas. En momentos temporales preestablecidos se toman muestras y se evalúa la estabilidad por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa (rpHPLC), cromatografía de exclusión de tamaños de alta eficacia (SEC) y electroforesis a través de gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). La tabla 3 compara la estabilidad de la peg-EPO en varias formulaciones y a diversas temperaturas. Estos datos demuestran claramente la superioridad de las formulaciones de la presente invención en lo tocante a recuperación de proteínas y agregación.

15 TABLA 3

*Estabilidad de la peg-EPO en varias formulaciones y diversas temperaturas*

20

Formulación *	peg-EPO (µg/ml)	% de recuperación después de seis meses a				Agregación detectable a 30°C (+/-)
		4°C	25°C	30°C	40°C	
A	10	92	91	n.d.	39	n.d.
B	50	97	98	97	78	-
C	50	95	79	79	52	+
E	50	103	102	100	87	-
A	100	96	97	n.d.	50	n.d.
B	400	101	101	101	77	-
C	400	100	94	90	56	+
D	400	98	96	93	73	-
E	400	99	98	100	66	-

25

30

35

40

45

50

55 \* Las formulaciones son:

formulación A: fosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 7,5

formulación B: fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, 3% de manitol (p/v), pH 6,2

formulación C: fosfato sódico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0

60 formulación D: fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 120 mM, pH 6,2

formulación E: arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, 3% de manitol, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6,2.

## Ejemplo 11

*Formulaciones optimizadas que evitan la oxidación de la metionina-54 en la proteína EPO, la metionina actúa como antioxidante*

5

Se incubó la EPO pegilada en varias formulaciones a diversas temperaturas. Pasados 6 meses se toman muestras y se determina el grado de oxidación de la metionina-54, del modo siguiente. Para abreviar, se tratan las muestras de EPO con endoproteinasa LysC. Los péptidos resultantes se separan por cromatografía en fase inversa. Se calcula la proporción entre péptido oxidado en T8 (que contiene la metionina-54 oxidada) y péptido T8 (que contiene metionina-54 no oxidada). Los datos se recogen en la tabla 4.

10

TABLA 4

*Grado de oxidación de metionina-54 en la proteína EPO en varias formulaciones después de seis meses a la temperatura indicada*

15

		% de metionina-54 oxidada			
Formulación	peg-EPO ( $\mu\text{g/ml}$ )	4°C	25°C	30°C	40°C
*					
A	400	2,00	15,89	24,89	37,89
B	400	2,33	6,55	12,88	30,24
C	400	2,51	2,95	5,99	14,4
A	50	5,37	21,36	30,62	48,05
B	50	3,44	13,38	16,59	30,83
C	50	4,41	5,52	10,01	15,62

20

25

30

35

40

\* Las formulaciones se indican seguidamente:

formulación A: fosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 7,0

45

formulación B: fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, 3% de manitol (p/v), pH 6,2

formulación C: fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, 3% de manitol (p/v), metionina 1 mM, pH 6,2

50

Estos datos demuestran claramente que la formulación preferida de la presente invención (fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, 3% de manitol (p/v), pH 6,2) es superior a otras formulaciones por ejemplo fosfato sódico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0, en cuanto al grado de oxidación de la metionina-54. La adición de metionina 1 ó 10 mM a la formulación evita claramente la oxidación de la metionina-54. Además, la metionina actúa como antioxidante y estabiliza la EPO.

## 55 Ejemplo 12

*Contenido de ácido siálico en muestras de peg-EPO de varias formulaciones*

60

Con el fin de estudiar la integridad de la estructura carbohidrato de la glicoproteína peg-EPO se analiza con técnicas estándar el contenido en ácido siálico en muestras de peg-EPO de formulaciones optimizadas después de mantenerlas almacenadas durante 6 meses a varias temperaturas. Los resultados indican que la integridad de la estructura carbohidrato no sufre efectos negativos por almacenaje de la proteína en las nuevas formulaciones aquí descritas (figura 9).

65

## ES 2 237 574 T3

### Ejemplo 13

*Bioactividad de la EPO pegilada después de mantenerla a temperaturas elevadas durante períodos prolongados de tiempo*

5 Con el fin de comprobar que el almacenaje de la peg-EPO en fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, 3% de manitol (p/v), pH 6,2, no influye negativamente en la bioactividad “*in vivo*”, se realiza un ensayo estándar de EPO en ratón (ver ejemplo 6). Las muestras de peg-EPO almacenadas durante 6 meses en fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3% (p/v) de manitol, pH 6,2, a las temperaturas indicadas, no presentan pérdida de actividad “*in vivo*” después de almacenarse a 4, 25 y 30°C, con respecto al estándar de referencia recién preparado (figura 10).

### Ejemplo 14

*Contenido de agregados en peg-EPO después de almacenaje a temperatura elevada durante 6 meses*

15 En orden a analizar el contenido de agregados en las muestras de peg-EPO después de almacenarlas a temperaturas elevadas en fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3% (p/v) de manitol, pH 6,2, se toman muestras al cabo de 6 meses y se analizan por cromatografía de exclusión de tamaños.

20 No se detectan agregados a 4, 25 ni 30°C, demostrándose la estabilidad de la EPO pegilada en las formulaciones antes mencionadas. La figura 11 muestra una superposición de los cromatogramas de exclusión de tamaños.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

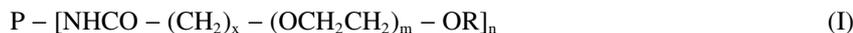
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica líquida que contiene una proteína eritropoyetina humana peguilada, un anión inorgánico de carga múltiple en un tampón farmacéuticamente aceptable, idóneo para mantener el pH de la solución en un intervalo comprendido entre 5,5 y 7,0 y opcionalmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables, siendo dicha composición líquida estable a temperatura ambiente.
2. La composición según la reivindicación 1 en forma de solución acuosa.
- 10 3. La composición según las reivindicaciones 1 y 2 en forma de solución isotónica.
4. La composición según las reivindicaciones de 1 a 3 en la que el anión es un anión de un ácido inorgánico fuerte y provisto de carga múltiple.
- 15 5. La composición según las reivindicaciones de 1 a 4, en la que el anión se elige entre el grupo formado por sulfato, citrato y fosfato.
6. La composición según las reivindicaciones de 1 a 5, en la que el anión es el anión sulfato.
- 20 7. La composición según la reivindicación 6 que contiene de 10 a 200 mmoles/l de sulfato.
8. La composición según las reivindicaciones de 1 a 7, en la que el pH se sitúa entre 5,8 y 6,7.
- 25 9. La composición según la reivindicación 8 en la que el pH se sitúa entre 6,0 y 6,5.
10. La composición según la reivindicación 9 en la que el pH se sitúa en torno a 6,2.
11. La composición según las reivindicaciones de 1 a 10 en la que el tampón se elige entre el grupo formado por un tampón fosfato y un tampón arginina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- 30 12. La composición según la reivindicación 11 en la que el tampón es un tampón fosfato de 10 a 50 mmolar/l.
13. La composición según las reivindicaciones de 1 a 12, **caracterizada** porque consta de uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 35 14. La composición según la reivindicación 13 **caracterizada** porque uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables se eligen entre el grupo formado por sales, diluyentes, disolventes y conservantes farmacéuticamente aceptables.
- 40 15. La composición según las reivindicaciones 13 y 14 en la que los excipientes farmacéuticamente aceptables se eligen del grupo formado por agentes tonificadores, polioles, antioxidantes y detergentes no iónicos.
16. La composición según las reivindicaciones de 13 a 15 en la que el excipiente farmacéuticamente aceptable es un poliol.
- 45 17. La composición según la reivindicación 16, en la que el poliol se elige del grupo formado por la manitol, la sorbita, la glicerina, la trehalosa y la sacarosa.
- 50 18. La composición según la reivindicación 17, en la que el poliol es la manitol.
19. La composición según las reivindicaciones de 13 a 18 que comprende un antioxidante.
20. La composición según la reivindicación 19 en la que el antioxidante es la metionina.
- 55 21. La composición según las reivindicaciones de 13 a 20 que contiene hasta 1 mmol/l de CaCl<sub>2</sub>.
22. La composición según las reivindicaciones de 15 a 21, en la que el detergente no iónico es el polisorbato 80, polisorbato 20 o el Pluronic F68.
- 60 23. La composición según la reivindicación 22, en la que el detergente no iónico es el Pluronic F68.
24. La composición según las reivindicaciones 22 ó 23, **caracterizada** porque contiene hasta un 1% (p/v) de detergente no iónico.
- 65 25. La composición según una de las reivindicaciones de 22 a 24, **caracterizada** porque contiene hasta un 0,1% (p/v) de detergente no iónico.

## ES 2 237 574 T3

26. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, **caracterizada** porque la proteína eritropoyetina es un conjugado, dicho conjugado comprende una proteína eritropoyetina humana, estando dicha glicoproteína unida con enlace covalente a "n" grupos polietilenglicol de la fórmula  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ , formando el grupo  $-\text{CO}$  de cada grupo polietilenglicol un enlace amídico con uno de dichos grupos amino; donde R es alquilo de bajo peso molecular; x es el número 2 ó 3; m es un número entre aprox. 450 y aprox. 900; n es un número de 1 a 3; y n y m se eligen de tal manera que el peso molecular del conjugado menos la glicoproteína eritropoyetina se sitúe entre 20 y 100 kilodaltones.

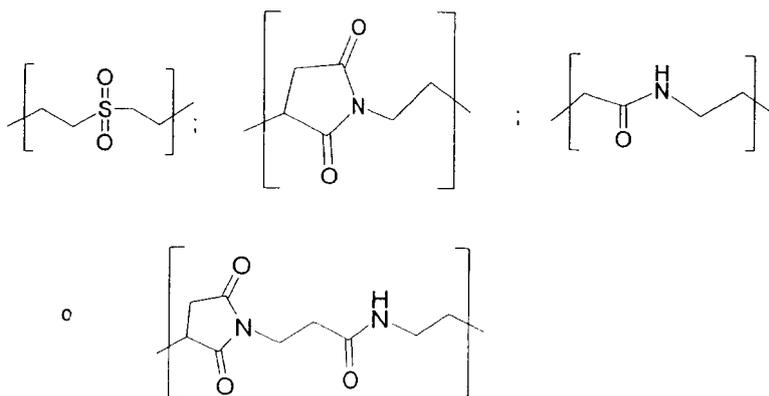
27. La composición según la reivindicación 26 con una proteína eritropoyetina de la fórmula:



en la que m, n, x y R tienen los significados definidos antes y P es el resto de una glicoproteína sin los n grupos amino que forman enlaces amida con los grupos polietilenglicol.

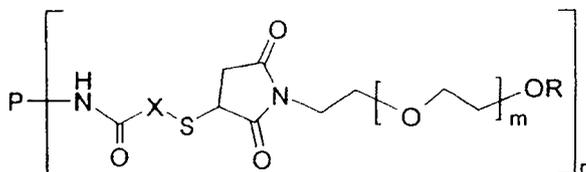
28. La composición según la reivindicación 27, en la que en la fórmula (I), x es 2, m es un número de 650 a 750 y n es el número 1 y R es metilo.

29. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en la que la proteína eritropoyetina es un conjugado, comprendiendo dicho conjugado una glicoproteína eritropoyetina humana, estando dicha glicoproteína unida por enlace covalente con grupos alcoxi de bajo peso molecular-polietilenglicol en un número de uno a tres, estando cada grupo polietilenglicol unido mediante enlace covalente a la glicoproteína mediante un engarce de la fórmula  $-\text{C}(\text{O})-\text{X}-\text{S}-\text{Y}-$ , formando el  $\text{C}(\text{O})$  del engarce o eslabón un enlace amida con uno de dichos grupos amino, X es  $-(\text{CH}_2)_k-$  o  $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$ , k es un número de 1 a 10, Y es



el peso molecular medio de cada fracción polietilenglicol se sitúa entre 20 kilodaltones y 40 kilodaltones y el peso molecular del conjugado se sitúa entre 51 kilodaltones y 175 kilodaltones.

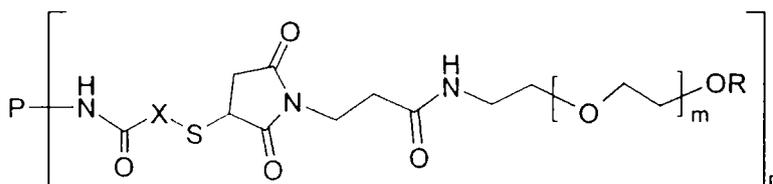
30. La composición de la reivindicación 29 en donde la proteína eritropoyetina es un conjugado de la fórmula



en la que n es un número entero de 1 a 3; m es un número entero de 450 a 900; R es alquilo de bajo peso molecular; X es  $-(\text{CH}_2)_k-$  o  $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$ , y P es el resto de una glicoproteína eritropoyetina sin el grupo amino o los grupos aminos que forman un enlace amida con X.

31. La composición de la reivindicación 30, en donde la proteína eritropoyetina es un conjugado de la fórmula

## ES 2 237 574 T3



10 en la que n es un número entero de 1 a 3; mes un número entero de 450 a 900; R es alquilo de bajo peso molecular; X es  $-(\text{CH}_2)_k-$  o  $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$ , y P es el resto de una glicoproteína eritropoyetina sin el grupo amino o los grupos aminos que forman un enlace amida con X.

15 32. La composición según las reivindicaciones de 1 a 31 que consta de 10 a 10.000  $\mu\text{g}$  de proteína eritropoyetina por ml.

33. La composición según las reivindicaciones de 1 a 32 que consta de 10 a 10.000  $\mu\text{g}$  de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 200 mmoles/l de sulfato y de 10 a 50 mmoles/l de fosfato, pH de 6,0 a 6,5.

20 34. La composición según las reivindicaciones 1 a 33, que comprende de 10  $\mu\text{g}$  de fosfato sódico, 40 mM de sulfato sódico, 3% de manitol (p/v) y 1 mM de metionina, pH 6,2.

35. La composición de la reivindicación 33 o 34 que contiene metionina hasta 20 mM, del 1 al 5% de poliol (p/v), hasta un 0,1% de Pluronic F68 (p/v) y opcionalmente  $\text{CaCl}_2$  hasta 1 mM.

25 36. La composición según las reivindicaciones 33 a 35 que contiene del 10 a 10.000  $\mu\text{g}$  de proteína eritropoyetina por ml, 40 mmoles/l de sulfato, 10 mmoles/l de fosfato, el 3% de manitol (p/v), metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68 (p/v), pH 6,2.

30 37. La composición según las reivindicaciones 1 a 32 que contiene de 10 a 10.000  $\mu\text{g}$  de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 100 mmoles/l de NaCl, de 10 a 50 mmoles/l de fosfato, pH de 6,0 a 7,0, opcionalmente del 1 al 5% de un poliol.

35 38. La composición según la reivindicación 37 que contiene metionina hasta 20 mM, hasta un 0,1% de Pluronic F68 y opcionalmente 7,5  $\mu\text{moles/l}$  de  $\text{CaCl}_2$ .

39. La composición de la reivindicación 37 o 38 que contiene de 10  $\mu\text{g}$  a 10.000  $\mu\text{g}$  de proteína eritropoyetina por ml, 100 mmoles/l de NaCl, metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68 y 10 mmoles/l de fosfato, pH 7,0.

40 40. La composición de las reivindicaciones 1 a 32 que contiene de 10 a 10.000  $\mu\text{g}$  de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 50 mmoles/l de arginina, pH de 6 a 6,5, de 10 a 100 mmoles/l de sulfato sódico.

41. La composición de la reivindicación 40 que contiene metionina hasta 20 mM, hasta un 0,1% de Pluronic F68, opcionalmente hasta 1 mmol/l de  $\text{CaCl}_2$  y opcionalmente del 1 al 5% de un poliol.

45 42. La composición de las reivindicaciones 40 ó 41, que contiene de 10 a 10.000  $\mu\text{g}$  de proteína eritropoyetina por ml, 40 mmoles/l de arginina, pH 6,2, 30 mmoles/l de sulfato sódico, un 3% de manitol, metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68 y opcionalmente 1 mmol/l de  $\text{CaCl}_2$ .

50 43. La composición de las reivindicaciones 1 a 32 que contiene de 25 a 500  $\mu\text{g/ml}$  de proteína eritropoyetina y

a) fosfato sódico/potásico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 ó

b) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 120 mM, pH 6,2 ó

55 c) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3% de manitol, pH 6,2 ó

d) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3% de manitol, metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68, pH 6,2 ó

60 e) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3% de manitol, pH 6,2 ó

f) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3% de manitol, metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68, pH 6,2.

65 44. La composición según las reivindicaciones 1 a 43 en la que la cantidad de proteína eritropoyetina es 50, 100, 400, 800 o 2500  $\mu\text{g/ml}$ .

## ES 2 237 574 T3

45. La composición según las reivindicaciones 1 a 44 que contiene fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3% de manitol, metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68, pH 6,2.

5 46. La composición según la reivindicación 44 que contiene fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, manitol 3% (p/v), metionina 1 mM, pH 6,2.

47. La composición según la reivindicación 44 que contiene arginina 10 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3% de manitol, metionina 10 mM, un 0,01% de Pluronic F68, pH 6,2.

10 48. La composición según las reivindicaciones 1 a 47, en donde la proteína eritropoyetina tiene la secuencia aminoácido SEG ID NO:1 o SEQ ID NO:2.

15 49. Un procedimiento para la preparación de la composición según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 48, que consiste en mezclar una proteína eritropoyetina humana pegilada con una solución que contiene un anión de carga múltiple y opcionalmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables y ajustar el pH entre 5,5 y 7,0 utilizando un tampón farmacéuticamente aceptable.

20 50. Uso de una composición según una de las reivindicaciones de 1 a 48 para la fabricación de medicamentos destinados al tratamiento y prevención de enfermedades relacionadas con la anemia en pacientes de insuficiencia renal crónica (CRF), sida y/o tratamiento de enfermos de cáncer sometidos a la quimioterapia.

51. Dispositivo para la liberación persistente local y sistémica que consta de una composición según una de las reivindicaciones de 1 a 48 elegido del grupo constituido por un implante, una jeringa y un dispositivo de inhalación.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURAS

**Fig. 1**

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg<sup>10</sup> Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys<sup>20</sup>  
 Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala<sup>30</sup> Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr<sup>40</sup>  
 Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala<sup>50</sup> Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala<sup>60</sup>  
 Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu<sup>70</sup> Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu<sup>80</sup>  
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro<sup>84</sup> Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser<sup>100</sup>  
 Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg<sup>110</sup> Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser<sup>120</sup>  
 Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu<sup>130</sup> Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys<sup>140</sup>  
 Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg<sup>146</sup> Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala<sup>160</sup>  
 Cys Arg Thr Gly Asp<sup>165</sup>

**Fig. 2**

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg<sup>10</sup> Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys<sup>20</sup>  
 Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala<sup>30</sup> Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr<sup>40</sup>  
 Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala<sup>50</sup> Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala<sup>60</sup>  
 Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu<sup>70</sup> Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu<sup>80</sup>  
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro<sup>90</sup> Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser<sup>100</sup>  
 Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg<sup>110</sup> Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser<sup>120</sup>  
 Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu<sup>130</sup> Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys<sup>140</sup>  
 Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg<sup>150</sup> Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala<sup>160</sup>  
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg<sup>166</sup>

Fig. 3

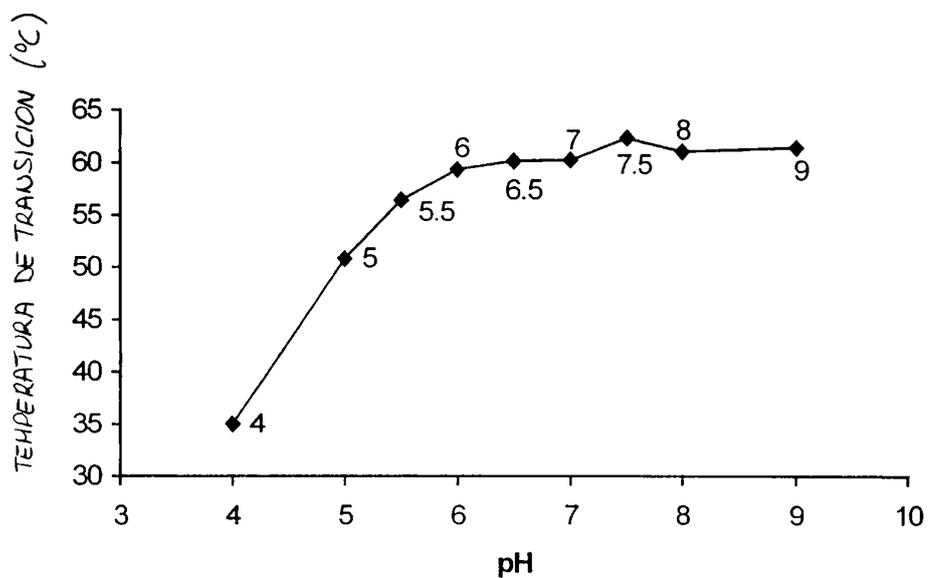


Fig. 4

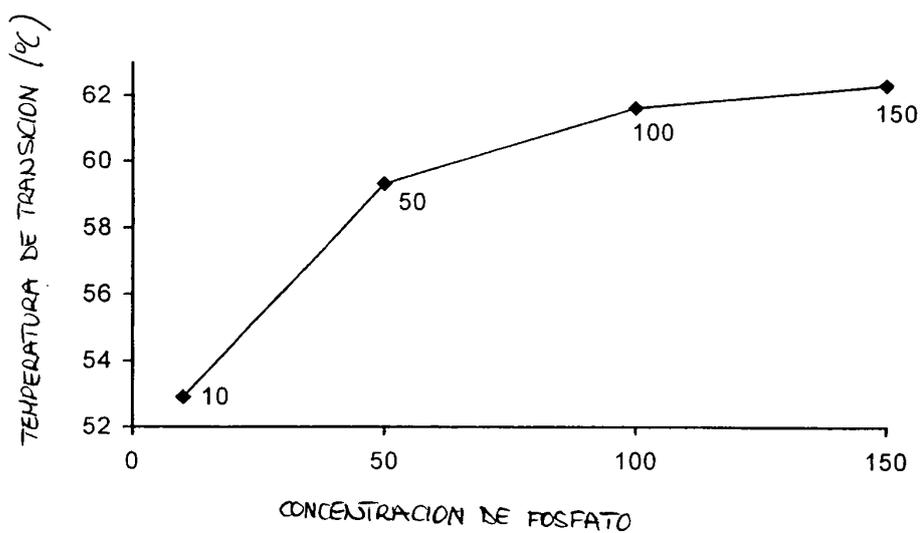


Fig. 5

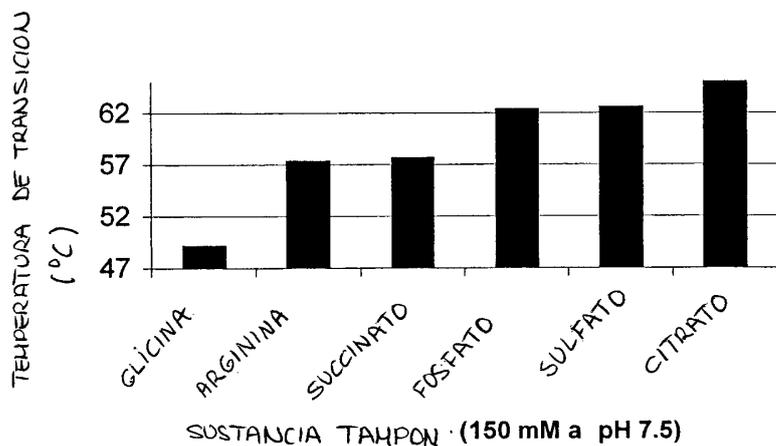


Fig. 6

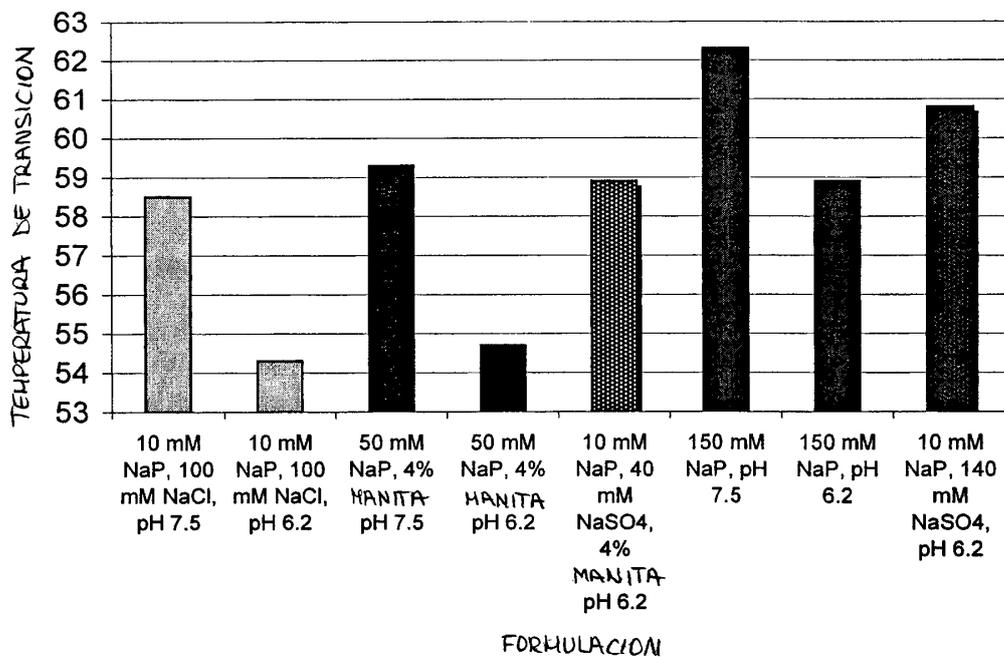


Fig. 7

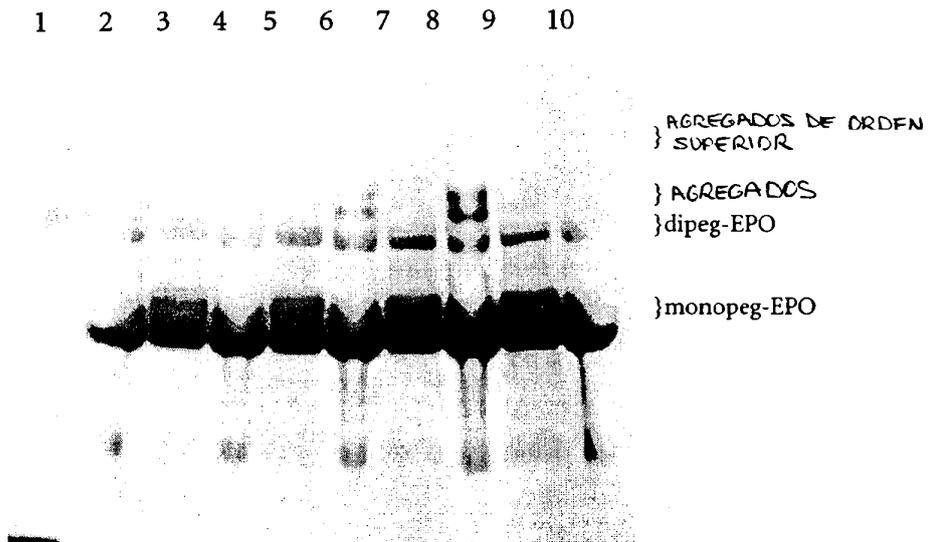


Fig. 8

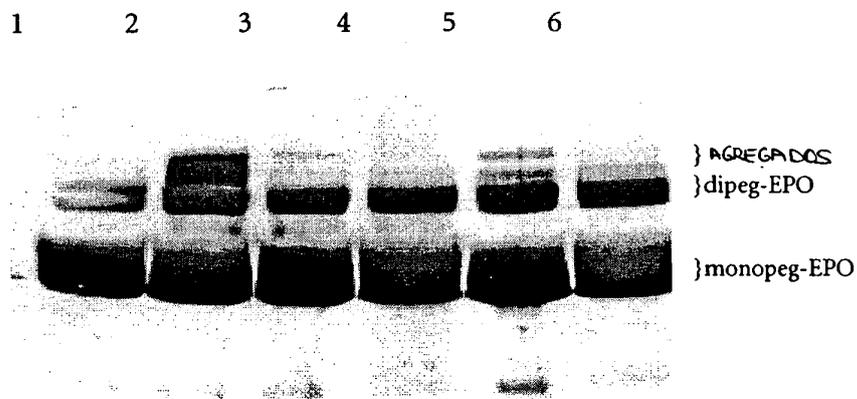


Fig. 9

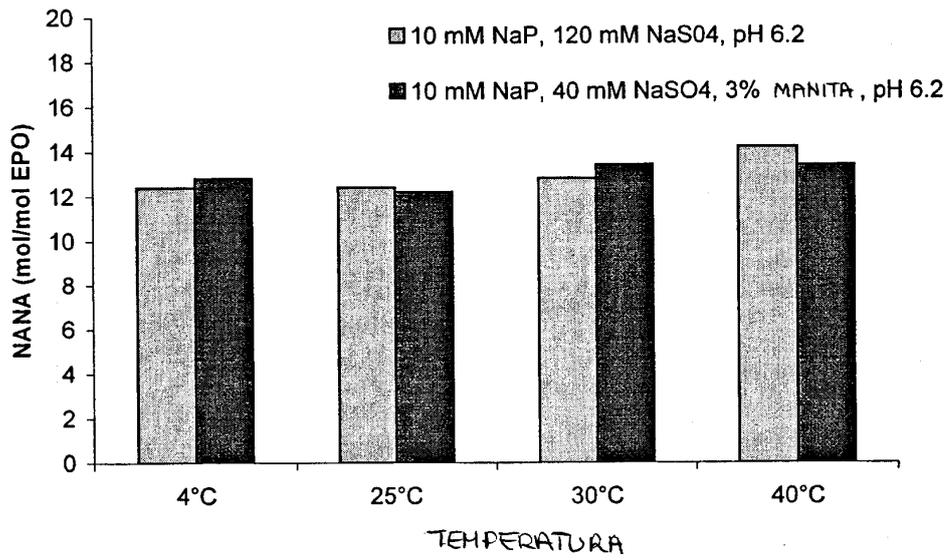


Fig. 10

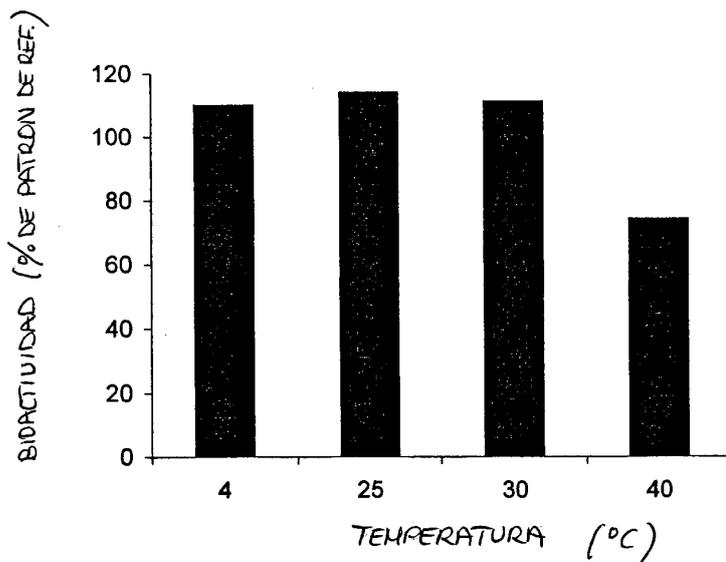
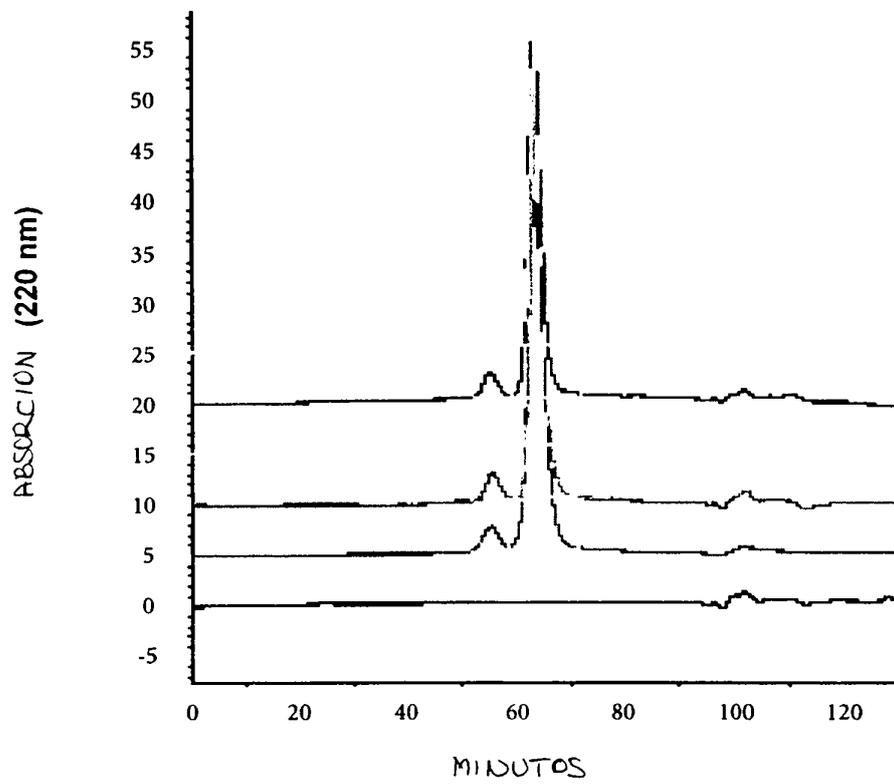


Fig. 11



# ES 2 237 574 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:  
(A) NOMBRE: F.Hoffmann-La Roche AG  
(B) CALLE: 124 Grenzacherstrasse  
10 (C) CIUDAD: Basilea  
(D) NACIÓN: Suiza  
(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): CH-4070  
(G) TELÉFONO: (61) 688 11 11  
15 (H) TELEFAX: (61) 688 13 95  
(I) TELEX: 962 292 hlr ch

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Nueva composición farmacéutica

20 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2

(iv) FORMA COMPUTERIZADA:

- 25 (A) TIPO DE MEDIO: disquete (floppy disk)  
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible  
(C) SISTEMA OPERATIVO: WORD  
(D) SOFTWARE: PatentIn edición 2.0

30 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 165

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

40 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu  
1 5 10 15  
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His  
45 20 25 30  
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe  
35 35 40 45  
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp  
50 50 55 60  
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu  
65 65 70 75 80  
55 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp  
85 90 95  
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu  
60 100 105 110  
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala  
115 120 125  
65 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val

