

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 888**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/08** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 47/02** (2006.01)

**A61K 47/10** (2006.01)

**A61K 47/12** (2006.01)

**A61K 47/18** (2006.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04773889 .3**

96 Fecha de presentación: **07.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1641486**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

54 Título: **Solución acuosa estable de eritropoyetina humana que no contiene albúmina sérica**

30 Prioridad:  
**10.06.2003 KR 2003037060**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.08.2012**

73 Titular/es:  
**LG LIFE SCIENCES LTD.  
LG TWIN TOWER, EAST TOWER, 20 YOIDO-  
DONG, YOUNGDUNGPO-GU  
SEOUL 150-721, KR**

72 Inventor/es:  
**KWON, Kyu Chan;  
CHOI, Suk Young;  
KANG, Young Cheol;  
JEH, Hoon Sung;  
LEE, Seung Joo;  
KIM, Myung Jin;  
KIM, Ji Eon y  
Oh, Jin-Seok**

74 Agente/Representante:  
**Aznárez Urbieta, Pablo**

ES 2 385 888 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**

Solución acuosa estable de eritropoyetina humana que no contiene albúmina sérica.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una formulación acuosa de eritropoyetina humana que presenta estabilidad de almacenamiento durante un largo período de tiempo sin albúmina sérica. Más específicamente, la presente invención se refiere a la formulación que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de eritropoyetina humana; un agente tensioactivo no iónico, un alcohol polihídrico seleccionado de entre el grupo consistente en propilenglicol y glicerol, un aminoácido neutro y un alcohol de azúcar como estabilizantes; reactivos isotónicos; y un reactivo tampón, oscilando el pH del reactivo tampón entre 6,0 y 7,5.

**10 Antecedentes de la invención**

15 La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína que induce la producción de eritrocitos en la médula ósea por estimulación de la diferenciación de las células progenitoras eritroides. La EPO consiste en 165 aminoácidos. Después de que en 1977 Mijake purificara eritropoyetina a partir de orina humana, actualmente es posible producirla en grandes cantidades mediante tecnologías de ingeniería genética. Se ha comprobado que la eritropoyetina es capaz de inducir eficazmente diversas hematopoyesis en el tratamiento de anemia resultante de una insuficiencia renal crónica y en diversos tipos de anemia de variado origen, siendo durante ciertos procedimientos quirúrgicos (Mijake y col., J. Biol. Chem. 25, 5558-5564, 1977; Eschbach y col., New Engl. J. Med. 316, 73-78, 1987; Sandford. B.K, Blood, 177, 419-434, 1991; WO 85-02610). Por esta razón, la eritropoyetina se ha venido utilizando durante tiempo como medicamento en diversas indicaciones de enfermedades. Sin embargo, al igual que otros productos 20 farmacéuticos proteicos, la eritropoyetina también se debe preparar cuidadosamente para evitar una desnaturalización provocada por la pérdida de estabilidad, con el fin de un uso de forma eficaz.

25 En general, las proteínas tienen una vida media corta y la desnaturalización se produce fácilmente, por ejemplo por agregación de monómeros, precipitación por agregación y adsorción en las paredes de la ampolla cuando se expone a temperaturas extremas, una superficie de contacto agua y aire, a presión elevada, a tensiones físicas y mecánicas, a disolventes orgánicos, a contaminación por microorganismos y similares. Las proteínas desnaturalizadas pierden sus propiedades fisicoquímicas y su actividad fisiológica nativa, siendo esta desnaturalización de las proteínas generalmente irreversible. Así, una vez desnaturalizadas, las proteínas no pueden recuperar sus propiedades nativas. En especial en el caso de proteínas tales como la eritropoyetina, que se administra en dosis simples de tan solo unos microgramos, cuando éstas son adsorbidas en la pared de la ampolla a causa de la inestabilidad, la pérdida resultante es relativamente considerable. Además, la proteína así adsorbida se agrega fácilmente vía un proceso de desnaturalización y la administración de la proteína desnaturalizada provoca la aparición de anticuerpos, como proteínas producidas de forma espontánea, contra esta proteína desnaturalizada en el cuerpo, por lo que la proteína debe ser administrada en una forma esencialmente estable. Por ello se han estudiado diversos métodos para prevenir la desnaturalización de proteínas en solución acuosa (John Geigert, J. Parenteral Sci. Tech, 43, N° 5, 220-224, 1989; David Wong, Pharm. Tech Octubre, 34-48, 1997; Wei Wang, Int. J. Pharm., 1 85, 129-188, 1999; Willem Norde, Adv. Colloid Interface Sci., 25, 267-340, 1986; Michelle y col., Int. J. Pharm. 120, 179-188,1995).

35 Algunas formulaciones proteicas solucionan la desnaturalización con un método de liofilización. Sin embargo, los productos liofilizados resultan inconvenientes, ya que han de reconstituirse antes de la inyección y además se requiere un liofilizador de alta capacidad para su procesamiento, por lo que es necesaria una gran inversión. También se aplican métodos para producir formas en polvo de proteína utilizando técnicas de secado por pulverización. Sin embargo, este método tiene las desventajas de que la eficacia económica disminuye debido al bajo rendimiento y de que la exposición a altas temperaturas puede provocar la desnaturalización de las proteínas durante el proceso.

45 Como modo alternativo para solucionar las limitaciones de los métodos arriba descritos, existe un método para mejorar la estabilidad de las proteínas mediante la adición de estabilizantes a una solución proteica acuosa. Como estabilizadores de proteínas son conocidos agentes tensioactivos, albúmina sérica, polisacáridos, aminoácidos, macromoléculas y sales (John Geigert, J. Parenteral Sci. Tech., 43, N° 5, 220-224, 1989; David Wong, Pharm. Tech., Octubre, 34-48, 1997; Wei Wang., Int. J. Pharm., 185, 129-188, 1999). Sin embargo, se deben seleccionar los estabilizantes adecuados según las características fisicoquímicas de cada proteína, ya que, de lo contrario, por ejemplo si se utilizan estabilizantes en determinadas combinaciones, se puede producir una reacción competitiva o una reacción secundaria con efectos negativos diferentes a los previstos. Además, dado que para cada estabilizador existe un intervalo de concentración apropiado, se requiere mucho esfuerzo y prudencia para estabilizar proteínas acuosas (Wei Wang, Int. J. Pharm., 185, 129-188, 1999).

55 Entre los estabilizantes de proteínas, generalmente se utiliza albúmina sérica y gelatina, de origen humano o animal, como estabilizadores de las formulaciones de proteínas acuosas, demostrando ser eficaces. Sin embargo, la albúmina sérica de origen humano supone un riesgo de contaminación viral y la gelatina y la albúmina sérica bovina pueden transmitir enfermedades tales como "Encefalopatías Espongiformes Transmisibles" o provocar alergias en algunos pacientes. Por ello, en Europa, el uso de materiales de origen humano y animal como aditivos farmacéuticos

está cada vez más restringido (EMEA/CPMP/BWP/450/10 Report from the Expert Workshop on Human TSEs and Medicinal products derived from Human Blood and Plasma (1 de diciembre de 2000), CPMP/PS/201/98 Position Statement on New Variant CJD and Plasma-Derived Medicinal Products (*Sustituido por CPMP/BWP/2879/02*). Por consiguiente, es necesario desarrollar métodos para formular formulaciones proteicas estables sin albúmina sérica de origen humano o animal y solucionar así los problemas de las formulaciones de eritropoyetina existentes que contienen albúmina sérica.

En la Patente US 4.879.272 se describe la adición de seroalbúmina humana/bovina, lecitina, dextrano y celulosa como agentes para inhibir la adherencia de las proteínas a las paredes de la ampolla. De acuerdo con esta patente, el rendimiento de recuperación de eritropoyetina es bueno con un 69 ~ 98% después del almacenamiento durante aproximadamente 2 horas a 20°C, en comparación con un rendimiento de sólo un 16% sin dicha adición, pero tiene el problema de que la pérdida debida a la adsorción puede ser considerable.

En la Patente US 4.806.524 se da a conocer una formulación liofilizada y una formulación acuosa de eritropoyetina donde se utiliza polietilenglicol, proteína, sacáridos, aminoácidos, sales orgánicas y sales inorgánicas como estabilizantes de la eritropoyetina. De acuerdo con esta patente, después de un almacenamiento de aproximadamente 7 días a 25°C, la formulación liofilizada tiene un alto rendimiento de recuperación, del 87 ~ 98%, pero la formulación acuosa tiene un bajo rendimiento de recuperación, de sólo el 60 ~ 70%, por lo que la formulación acuosa es relativamente menos estable.

En la Patente US 4.992.419 se describe una formulación acuosa y una formulación liofilizada de eritropoyetina donde se utilizan 0,5 ~ 5 g/l de agente tensioactivo no iónico como agente antiadsorción y 5 ~ 50 g/l de urea y 5 ~ 25 g/l de aminoácidos como estabilizantes. Sin embargo, esta patente tiene el problema de que la formulación acuosa presenta una estabilidad limitada en comparación con las formulaciones que contienen seroalbúmina humana y de que la formulación liofilizada requiere un proceso de reconstitución para mantener una actividad suficiente.

En la Patente US 5.376.632 se describe una formulación acuosa, una formulación liofilizada y una formulación en polvo secado por pulverización de eritropoyetina que contiene  $\beta$  o  $\gamma$  ciclodextrinas pero no ningún otro excipiente farmacéutico adicional. Sin embargo, las formulaciones donde se utilizan ciclodextrinas no son prácticas debido a su toxicidad renal.

En la Patente US 5.661.125 se da a conocer una formulación de eritropoyetina que contiene alcohol bencílico, parabenos, fenol y mezclas de los mismos, y un experimento que demuestra su estabilidad en comparación con una formulación de eritropoyetina que contiene albúmina sérica humana. Sin embargo, la formulación de esta patente presenta una baja estabilidad y una precipitación significativa de la eritropoyetina incluso a bajas temperaturas.

En el documento WO 01/87329 A1 se describen formulaciones acuosas de eritropoyetina y un anión inorgánico de carga múltiple en un tampón farmacéuticamente aceptable para mantener el pH de la solución en el intervalo de entre aproximadamente pH 5,5 y aproximadamente pH 7,0. Esta solicitud presenta un experimento comparativo referido a la estabilidad donde, después del almacenamiento de EPO y EPO PEGilada a diferentes temperaturas durante 6 meses, se midió el contenido de ácido siálico y la bioactividad estándar (%) de cada EPO en diferentes formulaciones. Sin embargo, dado que no se midió la cantidad de monómeros de EPO, el rendimiento de recuperación (%) de monómeros de EPO no se puede determinar con precisión.

El documento EP 0 909 564 da a conocer la preparación de una solución de eritropoyetina que contiene un aminoácido como estabilizantes y con una excelente estabilidad de almacenamiento a largo plazo.

El documento WO 00/61169 describe formulaciones farmacéuticas acuosas de eritropoyetina libres de productos sanguíneos de suero humano, estabilizadas con cantidades de aminoácido y un derivado de sorbitol mono-9-octadecanoato poli(oxo-1,2-etanedilo).

Por consiguiente, es deseable proporcionar una nueva formulación acuosa que presente estabilidad a largo plazo sin utilizar componentes proteicos derivados de animales tales como la albúmina sérica.

#### 45 **Sumario de la invención**

El objeto de la presente invención es proporcionar una formulación acuosa de eritropoyetina que pueda mantener su actividad biológica durante largos periodos de tiempo *in vivo* sin utilizar albúmina sérica de origen humano o animal.

Gracias a muchos experimentos y estudios intensivos, el inventor ha encontrado una formulación acuosa de eritropoyetina humana que evita la adhesión a la pared de la ampolla y la desnaturalización de las proteínas que se produce con el almacenamiento durante largos periodos, al combinar una cantidad farmacéuticamente eficaz de eritropoyetina con componentes específicos como estabilizantes, reactivos isotónicos y tampón, y llevó a cabo la invención.

**Descripción detalla de la invención**

Por tanto, la presente invención proporciona una formulación acuosa de eritropoyetina humana sin albúmina sérica, la cual comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de eritropoyetina humana; un agente tensioactivo no iónico, un alcohol polihídrico seleccionado de entre el grupo consistente en propilenglicol y glicerol, aminoácidos neutros, un alcohol de azúcar como estabilizantes; un reactivo isotónico; y un reactivo tampón, oscilando el pH del reactivo tampón entre 6,0 y 7,5.

La eritropoyetina humana que se puede utilizar en la formulación acuosa de la presente invención incluye todos los tipos de eritropoyetina obtenibles mediante aislamiento y purificación de células animales por métodos recombinantes nativos y/o genéticos. La cantidad de eritropoyetina en la formulación acuosa oscila preferentemente entre 100 IU/ml y 120.000 IU/ml.

La formulación acuosa de la presente invención contiene un agente tensioactivo no iónico para estabilizar la formulación, evitando la adhesión a las paredes de la ampolla. El agente tensioactivo no iónico disminuye la tensión superficial de las proteínas, evitando su adhesión o agregación sobre las superficies hidrófobas. Ejemplos de agentes tensioactivos no iónicos preferentes para su uso con la presente invención incluyen agentes tensioactivos no iónicos basados en polisorbato y basados en poloxámero, pudiéndose utilizar de forma individual o en combinación de dos o más de los mismos. Entre éstos, los agentes tensioactivos no iónicos basados en polisorbato son especialmente preferentes. Ejemplos de tales agentes tensioactivos no iónicos basados en polisorbato incluyen polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 y polisorbato 80, y, entre éstos, el polisorbato 20 es particularmente preferente. El polisorbato 20 inhibe la degradación química de las proteínas y disminuye o previene su adhesión a baja concentración, dado que su Concentración Micelar Crítica es relativamente baja. Preferiblemente no se utilizan altas concentraciones del agente tensioactivo no iónico en la formulación acuosa, ya que tales concentraciones provocan interferencias en la espectroscopía UV y en el punto isoeléctrico durante el examen de la estabilidad y concentración proteica, lo que dificulta evaluar su estabilidad. Por ello, el agente tensioactivo no iónico se incorpora en la formulación acuosa de la presente invención en cantidades inferiores al 0,01%, de forma especialmente preferente de entre el 0,0001 y el 0,01% (peso/volumen).

El aminoácido neutro permite que haya muchas más moléculas de agua presentes alrededor de la eritropoyetina, lo que hace posible estabilizar los aminoácidos hidrófilos más externos de la eritropoyetina, estabilizando así la propia eritropoyetina (Wang, Int. J. Pharm. 185 (1999) 129-188). En la formulación acuosa de la presente invención se utilizan aminoácidos neutros porque los aminoácidos cargados pueden facilitar la agregación de la eritropoyetina por interacción electrostática. Ejemplos de aminoácidos neutros preferentes a utilizar en la presente invención incluyen glicina, alanina, leucina, isoleucina, etc. Entre éstos, la glicina es especialmente preferente. Estos aminoácidos neutros se pueden utilizar de forma individual o en combinación de dos o más de los mismos. No obstante, de acuerdo con los experimentos realizados por presentes inventores, la glicina es más eficaz cuando se utiliza sola que cuando se utiliza en combinación con otros aminoácidos. Sin embargo, la formulación acuosa de la presente invención no ha de estar limitada al uso de un tipo de aminoácido neutro. La cantidad de aminoácido neutro a utilizar en la presente invención oscila preferentemente entre el 0,001 y el 2% (p/v). Si la cantidad es inferior a este intervalo, puede que no se produzca ningún efecto de aumento de la estabilidad. Por otro lado, si la cantidad es superior a este intervalo, no se logra una alta concentración de eritropoyetina, ya que la presión osmótica elevada influye en su solubilidad.

En la formulación acuosa de la presente invención, el alcohol polihídrico se utiliza como uno de los estabilizantes de la eritropoyetina en solución. Los alcoholes polihídricos incluyen propilenglicol, glicerol y uno o una combinación de dos o más de los mismos. Especialmente, entre éstos, el propilenglicol es particularmente preferente. El propilenglicol se ha utilizado ampliamente en productos farmacéuticos a administrar vía parenteral o no parenteral como disolvente de materiales hidrófobos, extractante y conservante, y se considera no tóxico. Además, se utiliza como emulsionante o como vehículo en alimentos y cosméticos. Aparte de lo arriba indicado, también puede utilizarse como estabilizante en productos farmacéuticos para aumentar la solubilidad de los fosfolípidos en caso de emplearse éstos como estabilizantes de formulaciones acuosas. El propilenglicol también se puede emplear para aumentar la estabilidad de las formulaciones acuosas de proteínas y, en general, mejora en mayor medida la estabilidad de las formulaciones acuosas cuando se utiliza en combinación con otros estabilizantes en concentraciones adecuadas que cuando se utiliza solo. No obstante, se ha de señalar que los presentes inventores han comprobado que, a pesar del uso de propilenglicol, la estabilidad de la formulación acuosa disminuye de forma inesperada si no se seleccionan adecuadamente los tipos y los intervalos de concentración de resto de los estabilizantes utilizados en combinación con el propilenglicol. La cantidad de alcohol polihídrico oscila preferentemente entre el 0,0001 y el 0,1% (p/v). Si la cantidad es inferior a este intervalo, puede que no se produzca ningún efecto de aumento de la estabilidad. Por otro lado, si la cantidad es superior a este intervalo, se pueden producir problemas debidos al aumento de la presión osmótica.

El alcohol de azúcar, como uno de los estabilizantes de las formulaciones acuosas de la presente invención, desempeña su función estabilizante de la eritropoyetina cuando se suministra en solución con el agente tensioactivo no iónico, el aminoácido neutro y el alcohol polihídrico tal como se menciona más arriba. Ejemplos de alcoholes de azúcar preferentes incluyen manitol, sorbitol, ciclitol, inositol, etc., pudiéndose utilizar de forma individual o en combinaciones de dos o más de los mismos. Entre ellos, el manitol es especialmente preferente. La cantidad de

alcohol de azúcar oscila preferentemente entre el 0,1 y el 1,0% (p/v). Si la cantidad es inferior a este intervalo, puede que no se produzca ningún efecto de aumento de la estabilidad. Por otro lado, si la cantidad es superior a este intervalo, se pueden producir problemas debidos al aumento de la presión osmótica.

- 5 Ciertos estabilizantes, por ejemplo alcohol de azúcar y similares, pueden no limitarse al significado literal del propio término, sino que, en algunos casos, también está previsto que desempeñen otras funciones para la preparación de la formulación acuosa de acuerdo con la presente invención, por ejemplo una función como reactivo isotónico.

10 El reactivo isotónico, utilizado como otro componente de la formulación acuosa de la presente invención, sirve para mantener la presión osmótica cuando la eritropoyetina se administra en forma de solución a un organismo, teniendo también un efecto adicional de aumento de la estabilidad de la eritropoyetina en solución. Ejemplos representativos de reactivos isotónicos incluyen sales inorgánicas solubles en agua, incluyendo estas sales, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de calcio, sulfato de sodio, etc. Estas sales se pueden utilizar de forma individual o en combinaciones de dos o más de las mismas. Entre ellas, el cloruro de sodio es especialmente preferente. La cantidad de sal inorgánica soluble en agua oscila preferentemente entre el 0,001 y el 0,7% (p/v) y se puede ajustar apropiadamente para que la formulación acuosa, que contiene diversos componentes tal como se describe más arriba, sea isotónica.

15 La combinación de los estabilizantes arriba indicados con el reactivo isotónico, contenidos en la formulación acuosa, estabiliza la eritropoyetina en solución de forma sinérgica y no de forma competitiva entre sí. De acuerdo con los estudios de los presentes inventores se ha comprobado que, por ejemplo, aunque el propilenglicol tiene un efecto estabilizador de la eritropoyetina en solución hasta cierto punto incluso cuando se utiliza solo, este efecto de estabilización se puede aumentar adicionalmente si se utiliza en combinación con aminoácidos neutros.

20 Por tanto, si se elimina uno cualquiera de los estabilizantes o reactivos isotónicos arriba mencionados se produce una sorprendente disminución de la estabilidad de la eritropoyetina. Esto se demuestra en los Ejemplos y Ejemplos Comparativos que se ilustran más abajo.

25 En las formulaciones acuosas de la presente invención, el reactivo tampón sirve para mantener el pH de la solución con el fin de estabilizar la eritropoyetina. Ejemplos de reactivos tampón preferentes incluyen tampón fosfato, tampón citrato y similares. Entre éstos, el tampón fosfato es especialmente preferente. Por ejemplo, el intervalo de concentración del fosfato que compone el reactivo tampón fosfato es preferentemente de 5 ~ 50 mM y el rango de pH de la solución es de aproximadamente 6,0 ~ 7,5, siendo especialmente preferente un intervalo de aproximadamente 6,5 ~ 7,5.

30 En la formulación acuosa de la presente invención, además de los estabilizantes, el reactivo isotónico y el reactivo tampón, también se pueden incluir de forma selectiva otras sustancias o materiales cualesquiera conocidos en la técnica, en intervalos de concentración que no influyan negativamente en los efectos de la invención.

A continuación se ilustran detalladamente ejemplos de formulaciones de la presente invención. No obstante, dichos ejemplos de formulaciones son únicamente ilustrativos de la presente invención y, en consecuencia, la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

### 35 **Ejemplo 1: Preparación de una formulación acuosa de eritropoyetina humana - 1**

40 Se preparó una solución isotónica añadiendo un 0,003% de polisorbato 20, un 0,1% de propilenglicol, un 1,5% de glicina, un 0,1% de cloruro de sodio y un 1,0% de manitol a una solución de tampón fosfato 10 mM, y se añadió eritropoyetina (LG Life Science Co., Ltd.) a aproximadamente 4.000 IU/ml. Después se transfirieron cuidadosamente partes alícuotas de 2 ml de la solución preparada a viales de vidrio de 3 ml y éstos se sellaron y se almacenaron a 25°C y 37°C, respectivamente.

#### **Ejemplo comparativo 1:**

##### **Preparación de una formulación acuosa de eritropoyetina humana sin aditivos**

45 Se añadió eritropoyetina en una cantidad de 4.000 IU/ml a una solución de tampón fosfato 10 mM. Después se transfirieron cuidadosamente partes alícuotas de 2 ml de la solución preparada a viales de vidrio de 3 ml y éstos se sellaron y se almacenaron a 25°C y 37°C, respectivamente.

#### **Ejemplo comparativo 2:**

##### **Preparación de una formulación acuosa de eritropoyetina humana que sólo contiene polisorbato 20**

50 Se añadió eritropoyetina en una cantidad de 4.000 IU/ml a una solución de tampón fosfato 10 mM que contenía un 0,003% de polisorbato 20. Después se transfirieron cuidadosamente partes alícuotas de 2 ml de la solución preparada a viales de vidrio de 3 ml y éstos se sellaron y se almacenaron a 25°C y 37°C, respectivamente.

**Ejemplo comparativo 3:**

**Preparación de una formulación acuosa de eritropoyetina humana sin propilenglicol**

5 Se preparó una solución isotónica añadiendo un 0,003% de polisorbato 20, un 1,5% de glicina, un 0,1% de cloruro de sodio y un 1,0% de manitol a una solución de tampón fosfato 10 mM, y se añadió eritropoyetina a aproximadamente 4.000 IU/ml. Después se transfirieron cuidadosamente partes alícuotas de 2 ml de la solución preparada a viales de vidrio de 3 ml y éstos se sellaron y se almacenaron a 25°C y 37°C, respectivamente.

**Ejemplo comparativo 4:**

**Preparación de una formulación acuosa de eritropoyetina humana sin glicina**

10 Se preparó una solución isotónica añadiendo un 0,003% de polisorbato 20, un 0,5% de propilenglicol, un 0,1% de cloruro de sodio y un 1,0% de manitol a una solución de tampón fosfato 10 mM, y se añadió eritropoyetina a aproximadamente 4.000 IU/ml. Después se transfirieron cuidadosamente partes alícuotas de 2 ml de la solución preparada a viales de vidrio de 3 ml y éstos se sellaron y se almacenaron a 25°C y 37°C, respectivamente.

**Ejemplo comparativo 5:**

**Preparación de una formulación acuosa de eritropoyetina humana sin cloruro de sodio**

15 Se preparó una solución isotónica añadiendo un 0,003% de polisorbato 20, un 1,7% de glicina, un 0,5% de propilenglicol y un 1,0% de manitol a una solución de tampón fosfato 10 mM, y se añadió eritropoyetina a aproximadamente 4.000 IU/ml. Después se transfirieron cuidadosamente partes alícuotas de 2 ml de la solución preparada a viales de vidrio de 3 ml y éstos se sellaron y se almacenaron a 25°C y 37°C, respectivamente.

**Ejemplo comparativo 6:**

**Preparación de una formulación acuosa de eritropoyetina humana sin manitol**

20 Se preparó una solución isotónica añadiendo un 0,003% de polisorbato 20, un 0,5% de propilenglicol, un 1,5% de glicina y un 0,1% de cloruro de sodio a una solución de tampón fosfato 10 mM, y se añadió eritropoyetina a aproximadamente 4.000 IU/ml. Después se transfirieron cuidadosamente partes alícuotas de 2 ml de la solución preparada a viales de vidrio de 3 ml y éstos se sellaron y se almacenaron a 37°C.

**Ejemplo experimental 1:**

25 **Estabilidad de las formulaciones acuosas de eritropoyetina humana**

Se determinó la relación entre los monómeros y dímeros de eritropoyetina de las formulaciones acuosas del Ejemplo 1 y los Ejemplos Comparativos 1 a 6 utilizando SEC-HPLC después de un almacenamiento durante 3 y 5 semanas, respectivamente. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 1.

**Tabla 1**

	Rendimiento recuperación (%)				Dímero (%)			
	25°C		37°C		25°C		37°C	
	3 sem.	5 sem.	3 sem.	5 sem.	3 sem.	5 sem.	3 sem.	5 sem.
Ejp. 1	100	98,9	94,2	93,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Ejp.Com. 1	87,1	86,5	78,6	75,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Ejp.Com. 2	91,1	92,4	83,4	82,6	0,0	0,0	11,1	13,1
Ejp.Com. 3	93,4	93,0	85,5	83,7	0,0	0,0	7,2	9,8
Ejp.Com. 4	94,1	93,5	87,2	85,1	0,0	0,0	4,3	6,5
Ejp.Com. 5	95,2	94,8	90,2	88,3	0,0	0,0	1,35	2,4
Ejp.Com. 6	-	-	85,1	81,1	-	-	8,3	5,5
sem = semanas								

Como se puede observar más arriba en la Tabla 1, el Ejemplo 1, consistente en una formulación acuosa de eritropoyetina según la presente invención, mostró un rendimiento de recuperación de más del 92% después de su almacenamiento durante 5 semanas a 37°C sin que se detectara ningún dímero. Por otro lado, el Ejemplo Comparativo 2, que sólo contenía polisorbato 20 en la formulación, mostró un alto rendimiento en comparación con el Ejemplo Comparativo 1 libre de aditivos, pero se detectaron dímeros. En los Ejemplos Comparativos 3 a 6, que no contenían alguno de los componentes de acuerdo con la presente invención en la formulación, se detectaron dímeros después del almacenamiento a 37°C durante 3 semanas, disminuyendo el rendimiento de recuperación a aproximadamente el 80%. Además, en los Ejemplos Comparativos 3 y 4, que no contenían propilenglicol y glicina en la formulación, respectivamente, el rendimiento de recuperación era bajo en comparación con la formulación del Ejemplo 1, detectándose muchos dímeros. Los resultados arriba mostrados confirman que el propilenglicol y el resto de estabilizantes y el reactivo isotónico previstos por la presente invención tienen efectos sinérgicos cuando se utilizan en combinación. Se puede observar que, si bien cada uno de estos componentes añadido a la formulación de la presente invención tiene un efecto estabilizador, la antiadhesión de la eritropoyetina en solución y la estabilidad de la eritropoyetina acuosa se pueden mejorar de forma sinérgica mediante los efectos combinados de cada ingrediente.

#### **Ejemplo 2: Preparación de una formulación acuosa de eritropoyetina humana - 2**

Se preparó una solución isotónica añadiendo un 0,01% de polisorbato 20, un 0,1% de propilenglicol, un 0,1% de glicina, un 0,55% de cloruro de sodio y un 1,0% de manitol a una solución de tampón fosfato 10 mM, y se añadió eritropoyetina a aproximadamente 4.000 IU/ml. Después se recogieron partes alícuotas de 0,5 ml de la solución preparada en jeringuillas precargadas de 1 ml (Becton-Dickinson) y éstas se almacenaron a 40°C durante 4 semanas.

#### **Ejemplo comparativo 7:**

##### **Preparación de una formulación acuosa de eritropoyetina humana sin propilenglicol ni manitol**

A una solución que contenía 4,38 mg/ml de cloruro de sodio, 1,16 mg/ml de monosodio fosfato (dihidrato), 2,23 mg/ml de disodio fosfato (dihidrato), 5 mg/ml de glicina y 0,3 mg/ml de polisorbato 80 se añadió eritropoyetina a aproximadamente 4.000 IU/ml. Después se recogieron partes alícuotas de 0,5 ml de la solución preparada en jeringuillas precargadas de 1 ml (Becton-Dickinson) y éstas se almacenaron a 40°C durante 4 semanas.

#### **Ejemplo experimental 2:**

#### **30 Estabilidad de formulaciones acuosas de eritropoyetina humana - 2**

La pureza y el rendimiento de recuperación de la eritropoyetina de las formulaciones acuosas del Ejemplo 2 y del Ejemplo Comparativo 7 se determinaron utilizando SEC-HPLC después de 0, 1, 3 y 4 semanas, respectivamente. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 2.

**Tabla 2**

	Rendimiento de recuperación del monómero (%)			
	0 semanas	1 semana	3 semanas	4 semanas
Ejp. 2	100,0	95,8	89,9	92,9
Ejp. Comp. 7	100,0	93,9	85,2	86,4

Como se puede observar más arriba en la Tabla 2, la formulación de la presente invención mostró un alto rendimiento de recuperación de un 92,9% después de 4 semanas de incubación, en comparación con el 86,4% de la formulación de referencia. Por consiguiente, la formulación de la presente invención mejora la estabilidad de la eritropoyetina en solución.

#### **Ejemplos comparativos 9-13:**

#### **40 Preparación de varias formulaciones acuosas de eritropoyetina humana**

Se prepararon las formulaciones acuosas de la Tabla 3 mostrada más abajo, que se diferenciaban de las formulaciones acuosas del Ejemplo 1 en ciertos componentes y se almacenaron a 25°C y 37°C, respectivamente, bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 1.

Tabla 3

	Composición de las formulaciones
Ejp. com. 9	EPO 4.000 IU/ml en PB, 0,5% PG, 0,003% Tween 20, sacarosa 0,5 mM, 1 mg/ml NaCl
Ejp. com. 10	EPO 4.000 IU/ml en Tris, 0,5% PG, 0,003% Tween 20, 1,5% Gly, 1 mg/ml NaCl
Ejp. com. 11	EPO 4.000 IU/ml en PB, 0,5% PVP 15K, 0,003% Tween 20, 1,5% Gly, 0,1% NaCl, 1% manitol
Ejp. com. 12	EPO 4.000 IU/ml en PB, 0,5% PG, 0,003% Tween 20, 1,5% Gly, 1 mg/ml NaCl, 0,00001% carboximetilcelulosa
Ejp. com. 13	EPO 2.000 IU/ml en PB, 2% PG, 2% glucosa, 0,002% lecitina, 0,001% Tween 20
PB: tampón fosfato	
PG: propilenglicol	
PVP: polivinilpirrolidona	

**Ejemplo experimental 3:****Estabilidad de formulaciones acuosas de eritropoyetina humana - 3**

5 Se determinó la relación entre los monómeros y dímeros de eritropoyetina de las formulaciones acuosas de los Ejemplos Comparativos 9-13 utilizando SEC-HPLC a las 3 y 5 semanas, respectivamente. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 4, comparados con los resultados de las formulaciones acuosas del Ejemplo 1.

Tabla 4

	Rendimiento recuperación (%)				Dímero (%)			
	25°C		37°C		25°C		37°C	
	3 sem.	5 sem.	3 sem.	5 sem.	3 sem.	5 sem.	3 sem.	5 sem.
Ej. 1	100	98,9	94,2	93,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Ejp. Com. 9	NA	NA	68,1	72,9	NA	NA	5,8	12,5
Ejp.Com. 10	NA	NA	48,2	-*	NA	NA	21,0	-*
Ejp.Com. 11	**	**	**	**	**	**	**	**
Ejp.Com. 12	***	***	***_	***_	***	***	***	***
Ejp.Com. 13	NA	NA	NA	NA	46,6	56,6	59,2	58,9
*: interrupción del ensayo por precipitación.								
**: interrupción del ensayo por precipitación después de la preparación de las formulaciones.								
***: interrupción del ensayo por precipitación después de la preparación de las formulaciones.								
NA: no aplicable								
Ejemplo comparativo 13: resultados obtenidos a 30°C y 50°C.								

10 Como se puede observar más arriba en la Tabla 4, al sustituir algunos de los componentes de las formulaciones acuosas del Ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención por otros compuestos no se obtenían los resultados deseados.

**Ejemplo comparativo 14:****Preparación de una formulación acuosa de eritropoyetina humana - 3**

5 Para la preparación de las formulaciones acuosas utilizando alcoholes polihídricos diferentes al propilenglicol, las formulaciones acuosas de eritropoyetina humana se prepararon del mismo modo que en el Ejemplo 1, excepto que se utilizó un 0,025% de PEG 300 (polietilenglicol, Mn = 300) en lugar de propilenglicol. La solución preparada se introdujo en viales de vidrio y éstos se sellaron y se almacenaron a 37°C.

**Ejemplo experimental comparativo:****Estabilidad de formulaciones acuosas de eritropoyetina humana - 4**

10 Se determinó la relación entre los monómeros y dímeros de eritropoyetina de las formulaciones acuosas del Ejemplo Comparativo 14 utilizando SEC-HPLC a las 3 y 5 semanas, respectivamente. Para comparar, también se ensayó la formulación acuosa del Ejemplo Comparativo 3, que no contenía alcohol polihídrico. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5**

	Rendimiento recuperación (%)		Dímero (%)	
	3 semanas	5 semanas	3 semanas	5 semanas
Ejp. Comp. 14	100,0	97,2	0,0	0,0
Ejp. Comp. 3	85,5	83,7	7,2	9,8

15 Como se puede observar más arriba en la Tabla 5, el Ejemplo Comparativo 14, que consiste en una formulación acuosa de eritropoyetina donde se utiliza polietilenglicol como alcohol polihídrico tiene un rendimiento de recuperación de monómeros de un 97%, no detectándose ningún dímero. Este resultado es muy diferente al de la formulación acuosa del Ejemplo Comparativo 3 en la que no se utiliza alcohol polihídrico.

**Ejemplo 4: Estabilidad de una formulación acuosa con alta concentración de eritropoyetina**

20 Se preparó una solución isotónica añadiendo un 0,003% de polisorbato 20, un 0,1% de propilenglicol, un 1,5% de glicina, un 1,0% de manitol y un 0,1% de cloruro de sodio a una solución de tampón fosfato 10 mM, y se añadió eritropoyetina a aproximadamente 12.000 IU/ml. Después se recogieron partes alícuotas de 0,5 ml de la solución preparada en jeringuillas precargadas de 1 ml (Becton-Dickinson) y éstas se almacenaron a 5°C, 25°C y 40°C durante 3 meses, respectivamente.

**Ejemplo experimental 5:****Estabilidad de las formulaciones acuosas con alta concentración de eritropoyetina**

25 Para confirmar la estabilidad de las formulaciones acuosas con alta concentración de eritropoyetina, se determinaron el rendimiento de recuperación y la pureza de la formulación preparada en el Ejemplo 4 mediante SEC-HPLC y RP-HPLC después de un almacenamiento durante 0, 6 y 12 meses a 5°C, después de un almacenamiento durante 2, 4 y 6 meses a 25°C y después de un almacenamiento durante 1, 2 y 3 meses a 40°C, respectivamente. Se evaluó el nivel de actividad fisiológica administrando las formulaciones a ratones B6D2F1 y midiendo el aumento de reticulocitos. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 6.

**Tabla 6**

	Almacenamiento a 5°C			Almacenamiento a 25°C			Almacenamiento a 40°C		
	0	6	12	2	4	6	1	2	3
Tiempo (meses)	0	6	12	2	4	6	1	2	3
Rendimiento de recuperación (%)	100,0	107,8	104,9	100,0	100,0	103,9	100,0	96,1	94,1
Pureza (%)	100,0	99,9	99,9	100,0	99,8	99,3	99,8	99,3	99,2
Act. fisiológica (%)	89,7	90,8	NT	90,4	90,8	93,8	105,3	82,8	91,8

Como puede observarse más arriba en la Tabla 6, la alta concentración de eritropoyetina en las formulaciones acuosas mostró un rendimiento de recuperación, una pureza y una actividad fisiológica completos durante un almacenamiento de hasta 12 meses a 5°C y también durante un almacenamiento de hasta 6 meses a 25°C. Además, durante un almacenamiento de hasta 3 meses a 40°C se observó un rendimiento de recuperación de un 94%, con poca disminución de la pureza y la actividad fisiológica. Por consiguiente, se confirmó que las formulaciones de acuerdo con el Ejemplo 2 eran muy estables.

**Ejemplo experimental 6:**

**Estabilidad en función de los efectos del pH**

A una solución de tampón fosfato 10 mM se le añadió un 0,003% de polisorbato 20, un 0,5% de propilenglicol, un 1,5% de glicina, un 1,0% de manitol y un 0,1% de cloruro de sodio, y se añadió eritropoyetina a 4.000 IU/ml. Después se ajustó el pH utilizando acetato e hidróxido de sodio. La solución preparada se dividió en partes alícuotas de 2 ml y se introdujo en tubos de ensayo de 3 ml, y éstos se sellaron y se almacenaron a 40°C durante 3 semanas. Después se midió la relación entre los monómeros y dímeros de eritropoyetina. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 7.

**Tabla 7**

pH	Rdto. recuperación (%)	Dímero (%)
6,0	94,4	0,0
6,5	95,2	0,0
7,0	94,3	0,0
7,5	90,3	0,0
8,0	81,7	0,0
8,5	69,8	0,0
9,0	55,3	11,8

Como se puede observar más arriba en la Tabla 7, el rendimiento de recuperación del monómero era superior al 90% incluso después de 3 semanas de almacenamiento a 40°C en el caso de los valores pH de 6,0 a 7,5. Este resultado demuestra que las formulaciones acuosas de eritropoyetina de acuerdo con la presente invención, que contienen un agente tensioactivo no iónico, propilenglicol, aminoácido neutro, cloruro de sodio y reactivo isotónico, son muy estables a valores pH 6,0 - 7,5.

**Aplicación industrial**

Tal como se ha descrito anteriormente, la formulación acuosa de eritropoyetina de acuerdo con la presente invención, que contiene eritropoyetina humana y agente tensioactivo no iónico, alcohol polihídrico, aminoácido neutro, alcohol de azúcar como estabilizador, reactivo isotónico y reactivo tampón, mejora el problema de la disminución de la actividad fisiológica debido a la desnaturalización durante el almacenamiento a largo plazo en solución. Además, tiene la propiedad de evitar que las proteínas de eritropoyetina se adhieran a las paredes de la ampolla.

Otros ejemplos y usos de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica teniendo en cuenta la descripción y la práctica de la invención aquí descritas. Los ejemplos se han de considerar únicamente como tales, siendo el alcance de los ejemplos particulares de la invención el de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Formulaci3n acuosa de eritropoyetina humana sin alb3mina s3rica, que comprende eritropoyetina humana; un agente tensioactivo no i3nico, un alcohol polih3drico seleccionado de entre el grupo consistente en propilenglicol y glicerol, un amino3cido neutro y un alcohol de az3car como estabilizantes; un reactivo isot3nico; y un reactivo tamp3n, oscilando el pH del reactivo tamp3n entre 6,0 y 7,5.  
5
2. Formulaci3n acuosa de eritropoyetina humana seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque dicha eritropoyetina humana es eritropoyetina nativa o recombinante.
3. Formulaci3n acuosa de eritropoyetina humana seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el agente tensioactivo no i3nico es un agente tensioactivo no i3nico basado en polisorbato o un agente tensioactivo no i3nico basado en polox3mero, o una combinaci3n de 3stos; el amino3cido neutro es uno o m3s amino3cidos seleccionados de entre el grupo consistente en glicina, alanina, leucina e isoleucina; el alcohol de az3car es uno o m3s alcoholes seleccionados de entre el grupo consistente en manitol, sorbitol, ciclitol e inositol; el reactivo isot3nico es uno o m3s reactivos seleccionados de entre el grupo consistente en cloruro de sodio, cloruro de calcio y sulfato de sodio; y el reactivo tamp3n es uno o m3s reactivos de entre el grupo consistente en tamp3n fosfato y tamp3n citrato.  
10  
15
4. Formulaci3n acuosa de eritropoyetina humana seg3n la reivindicaci3n 3, caracterizada porque el agente tensioactivo no i3nico es polisorbato 20, el alcohol polih3drico es propilenglicol, el amino3cido es glicina, el alcohol de az3car es manitol, el reactivo isot3nico es cloruro de sodio y el reactivo tamp3n es tamp3n fosfato.
- 20 5. Formulaci3n acuosa de eritropoyetina humana seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el contenido de agente tensioactivo no i3nico oscila entre el 0,0001 y el 0,01% (p/v).
6. Formulaci3n acuosa de eritropoyetina humana seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el contenido de alcohol polih3drico oscila entre el 0,001 y el 0,1% (p/v).
- 25 7. Formulaci3n acuosa de eritropoyetina humana seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el contenido de amino3cido neutro oscila entre el 0,001 y el 2% (p/v).
8. Formulaci3n acuosa de eritropoyetina humana seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el contenido de alcohol de az3car oscila entre el 0,1 y el 1,0% (p/v).
9. Formulaci3n acuosa de eritropoyetina humana seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el contenido de dicho reactivo isot3nico oscila entre el 0,001 y el 0,7% (p/v).
- 30 10. Formulaci3n acuosa de eritropoyetina humana seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque la concentraci3n de sal en el reactivo tamp3n oscila entre 1 mM y 50 mM.
11. Formulaci3n acuosa de eritropoyetina humana seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el contenido de eritropoyetina oscila entre 100 IU/ml y 120.000 IU/ml.