

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 915**

51 Int. Cl.:

C07K 17/08 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2008 E 08787525 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2197919**

54 Título: **Formulación líquida de conjugado de G-CSF**

30 Prioridad:

27.08.2007 EP 07115047

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

15.07.2014

73 Titular/es:

**RATIOPHARM GMBH (100.0%)
Graf-Arco-Strasse 3
89079 Ulm , DE**

72 Inventor/es:

**HINDERER, WALTER y
SCHECKERMANN, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 476 915 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

Formulación líquida de conjugado de G-CSF

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida que comprende un polipéptido factor estimulante de colonias de granulocitos conjugado con un polímero, teniendo la composición un valor de pH en el intervalo de 4,5 a 5,5. La composición comprende además un tensioactivo y opcionalmente uno o más de otros excipientes farmacéuticamente aceptables. Además, la composición de la invención está libre de ácido tartárico o sales del mismo y de ácido succínico y sales del mismo como agentes tamponantes y no contiene aminoácidos como estabilizantes. La composición presenta una buena estabilidad durante el almacenaje y es especialmente útil para la profilaxis y tratamiento de trastornos e indicaciones médicas en las que las preparaciones del factor estimulante de colonias de granulocitos se consideran remedios útiles.

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es un factor de crecimiento hematopoyético que estimula la proliferación y la diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas y la activación de los neutrófilos maduros. El G-CSF es capaz de reforzar la proliferación de los neutrófilos *in vitro* e *in vivo*. La forma humana de G-CSF fue clonada por grupos de Japón y Estados Unidos en 1986 (véase, p.ej., Nagata *et al.* (1986) Nature 319: 415 - 418). La glucoproteína humana natural existe en dos formas, una que tiene 174 aminoácidos y la otra que tiene 177 aminoácidos. La forma de 174 aminoácidos, más abundante y más activa, ha sido utilizada en el desarrollo de productos farmacéuticos por tecnología de ADN recombinante.

Se han producido grandes cantidades de G-CSF recombinante mediante ingeniería genética en *Escherichia coli* y han sido utilizadas satisfactoriamente en aplicaciones clínicas para tratar a pacientes de cáncer que padecen neutropenia inducida por la quimioterapia. El G-CSF producido por *Escherichia coli* es una cadena polipeptídica de 175 aminoácidos que contiene una metionina extra en su N terminal. Esta proteína ha sido producida mediante la expresión de un gen G-CSF en *E. coli* y la purificación del producto proteico hasta homogeneidad. Es una proteína hidrófoba que tiene cinco residuos de cisteína, cuatro de los cuales están implicados en enlaces disulfuro. El residuo de cisteína libre está generalmente implicado en la formación de agregados de peso molecular más alto después de almacenaje en solución. Los agregados de las proteínas se pueden formar también a partir de formas oxidadas de la proteína que surgen por oxidación de los residuos internos de metionina en la secuencia primaria de la proteína. De los cuatro residuos de metionina, uno está en el N terminal y los otros tres son internos. Las formas oxidadas de la proteína que contienen metionina oxidada en la posición 122 se pueden separar de las formas que contienen metioninas oxidadas en las posiciones 127 o 138 y de la proteína nativa por procedimientos regulares de separación por HPLC de fase inversa (las posiciones se calculan para el metionil-G-CSF que consta de 175 aminoácidos).

El G-CSF humano recombinante sintetizado en un sistema de expresión de *E. coli* se denomina filgrastim (denominación común internacional, INN). La estructura de filgrastim difiere ligeramente de la glucoproteína natural. La otra forma de G-CSF humano recombinante se denomina lenograstim (INN) y se sintetiza en células de ovario de hámster chino (CHO). Filgrastim y lenograstim están comercializados en Europa con los nombres de fábrica Neupogen® y Granocyte, respectivamente.

Sin embargo, las formas disponibles comercialmente de G-CSF humano recombinante tienen un efecto farmacológico de vida corta y a menudo se deben administrar más de una vez al día durante la duración del estado leucopénico. Una molécula con una semivida de circulación más larga reduciría el número de administraciones necesarias para aliviar la leucopenia y evitaría las consiguientes infecciones. Otro problema con los productos de G-CSF humano recombinante actualmente disponibles es la aparición de dolor óseo dependiente de la dosis. Puesto que el dolor óseo es experimentado por los pacientes como un importante efecto secundario del tratamiento con G-CSF humano recombinante, sería deseable proporcionar un producto de G-CSF humano recombinante que no cause dolor óseo, ya sea por medio de un producto que inherentemente no tenga este efecto o que sea eficaz en una dosis que sea suficientemente pequeña para que no se produzca dolor óseo o al menos se reduzca. Por lo tanto, existe claramente la necesidad de mejorar las moléculas de G-CSF recombinante y las preparaciones farmacéuticas que contienen moléculas de G-CSF recombinante como preparaciones estables listas para su uso.

Se han presentado informes de variantes de G-CSF humano obtenidas con técnicas de ingeniería genética de proteínas, p.ej. se describen variantes de G-CSF en los documentos WO 01/87925, EP 0 456 200 A, US 6.166.183, US 6.004.548, US 5.580.755, US 5.582.823, US 5.675.941, US 5.416.195, US 5.399.345, WO 2005/055946 y WO 2006/074467.

Se ha descrito también la modificación de G-CSF humano y otros polipéptidos para de este modo introducir al menos una cadena de carbohidratos adicional en comparación con el polipéptido nativo (documento US 5.218.092). Además, se han descrito y estudiado modificaciones poliméricas del G-CSF humano nativo, incluyendo la unión de grupos poli(etilenglicol) (PEG) (documentos US 5.824.778, US 5.824.784, WO 96/11953, WO 95/21629 y WO 94/20069).

Se acepta generalmente que se puede mejorar la estabilidad de las proteínas y que se puede reducir la respuesta inmunitaria frente a estas proteínas cuando estas proteínas se acoplan a moléculas poliméricas. El documento WO 94/28024 describe que proteínas fisiológicamente activas modificadas con PEG presentan inmunogenicidad y antigenicidad reducidas y circulan en el torrente sanguíneo durante un tiempo considerablemente más largo que las proteínas no conjugadas, esto es, tienen una velocidad de aclaramiento reducida.

Es conocida en la técnica la unión de polímeros sintéticos a la cadena principal peptídica en un intento de mejorar las propiedades farmacocinéticas de los productos terapéuticos de glucoproteína. Un ejemplo de polímero que ha sido conjugado con péptidos es el PEG. Se ha demostrado que el uso de PEG para derivatizar productos terapéuticos peptídicos reduce la inmunogenicidad de los péptidos. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 4.79.337 describe polipéptidos no inmunogénicos tales como enzimas y hormonas peptídicas acopladas al PEG o al poli(propilenglicol) (PPG). En adición a la reducción de la inmunogenicidad, se prolonga el tiempo de aclaramiento en circulación debido al aumento de tamaño del conjugado con PEG de los polipéptidos en cuestión.

El pegfilgrastim (INN) es un conjugado covalente de G-CSF humano recombinante metionilado (filgrastim) y una única molécula de monometoxi-PEG de 20 kDa. La molécula de monometoxi-PEG está unida covalentemente al residuo metionilo en N terminal de filgrastim. El pegfilgrastim se comercializa en Europa con el nombre de fábrica Neulasta®.

El principal modo de unión de PEG, y sus derivados, a los péptidos es una unión no específica a través de un residuo de aminoácido peptídico (véase p.ej. los documentos US 4.088.538, US 4.496.689, US 4.414.147, US 4.055.635 y WO 87/00056). Otro modo de unión del PEG a los péptidos es a través de la oxidación no específica de residuos glucosilo de un glucopéptido (véase p.ej. el documento WO 94/05332).

En estos métodos no específicos, se añade el PEG de una manera aleatoria, no específica a los residuos reactivos de una cadena principal peptídica. La adición aleatoria de moléculas de PEG tiene sus inconvenientes, incluida una falta de homogeneidad del producto final, y la posibilidad de que se reduzca la actividad biológica o enzimática del péptido. Por lo tanto, durante los últimos años se han realizado esfuerzos para desarrollar métodos más específicos del sitio para unir un polímero sintético u otra marca a un péptido y se ha encontrado que se pueden producir *in vitro* productos terapéuticos peptídicos homogéneos, conjugados específicamente, a través de la acción de enzimas. Estas conjugaciones a base de enzimas tienen las ventajas de regioselectividad y estereoselectividad. Dos clases principales de enzimas para uso en la síntesis de péptidos conjugados son las glucosiltransferasas (p.ej. sialiltransferasas, oligosacariiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas) y las glucosidasas. Estas enzimas se pueden utilizar para la unión específica de azúcares que se pueden modificar posteriormente para comprender un resto terapéutico. Alternativamente, las glucosiltransferasas y las glucosidasas modificadas se pueden utilizar para transferir directamente azúcares modificados a la cadena principal del péptido (véase p.ej. los documentos US 6.399.336 y US 2003/0040037, US 2004/0132640, US 2004/0137557, US 2004/0126838 y US 2004/0142856). También son conocidos métodos que combinan elementos sintéticos tanto químicos como enzimáticos (véase p.ej. el documento US 2004/137557).

Los diferentes métodos para conjugar polipéptidos como G-CSF con restos poliméricos como PEG son bien conocidos y están ampliamente descritos en la técnica anterior. La preparación de G-CSF glucopEGilado está descrita, por ejemplo, en el documento WO 2005/055946. Otra solicitud de patente que se dirige a la preparación de conjugados entre G-CSF y restos PEG es el documento WO 2006/074467. En este método los conjugados se ligan mediante un grupo de enlace glucosilo intacto que se interpone entre el polipéptido G-CSF y el grupo modificador y se une covalentemente a ellos. Se forman los conjugados a partir de polipéptidos G-CSF tanto glucosilados como no glucosilados por la acción de la glucosiltransferasa. La glucosiltransferasa liga un resto de azúcar modificado sobre un residuo de aminoácido o un residuo glucosilo del polipéptido. La descripción de los documentos WO 2005/055946 y WO 2006/074467 es explícitamente mencionada en el contexto de la presente invención.

Aparte del PEG, también han sido descritos otros restos poliméricos como conjugados útiles con G-CSF y otras proteínas terapéuticas. El documento WO 02/09766 describe, entre otros, compuestos de proteína-polímeros biocompatibles producidos por la conjugación de proteínas biológicamente activas con un derivado polimérico biocompatible. Los polímeros biocompatibles utilizados son polímeros ramificados altamente reactivos, y los conjugados resultantes contienen un enlazador largo entre el derivado polimérico y la proteína. Ejemplos de polímeros biocompatibles según el documento WO 02/09766 son PEG, PPG, polioxitileno (POE), politrimetilenglicol, poli(ácido láctico) y sus derivados, poli(ácido acrílico) y sus derivados, poliaminoácidos, poliuretano, polifosfazeno, poli(L-lisina), poli(óxido de alquileño) (PAO), polímeros solubles en agua tales como polisacáridos, dextrano, y polímeros no inmunogénicos tales como poli(alcohol vinílico) y poli(acrilamida).

El documento WO 94/01483 describe conjugados de polímeros biocompatibles que se forman uniendo covalentemente un polímero o derivado de polímero biológicamente inactivo con un polímero hidrófilo sintético, farmacéuticamente puro, mediante tipos específicos de enlaces químicos. Como polímeros presentes en la naturaleza y derivados de los mismos, se describen polisacáridos tales como ácido hialurónico, proteoglicanos tales

como sulfatos de condroitina A, B y C, quitina, heparina, sulfato de heparina, dextranos tales como ciclodextrano, hidroxietilcelulosa, éter de celulosa y almidón, lípidos tales como triglicéridos y fosfolípidos.

El documento WO 96/11953 describe compuestos de proteínas modificadas químicamente en el N terminal y métodos para su producción. Específicamente, se describen composiciones de G-CSF que resultan del acoplamiento de un polímero soluble en agua al N terminal de G-CSF. Los ejemplos de polímeros solubles en agua listados en el documento WO 96/11953 son copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de PPG, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno o polioles polioxiethylados.

El documento WO 97/30148 describe conjugados de polipéptidos con alergenicidad reducida, que comprenden una molécula portadora polimérica que tiene dos o más moléculas de polipéptidos acopladas a la misma. Estos conjugados se producen activando una molécula portadora polimérica, haciendo reaccionar dos o más moléculas de polipéptidos con la molécula portadora polimérica activada y bloqueando los grupos residuales activos del conjugado. El documento WO 97/30148 lista una variedad de moléculas portadoras poliméricas, incluyendo homopolímeros de tipo natural o sintético tales como polioles, poliaminas, ácidos policarboxílicos y heteropolímeros que comprenden al menos dos grupos diferentes de unión. Se dan ejemplos, que comprenden PEG de tipo estrella, PEG ramificados, poli(alcoholes vinílicos), policarboxilatos, polivinilpirrolidonas y poli-D,L-aminoácidos. Los conjugados del documento WO 97/30148 incluyen también aquellos que comprenden dextranos tales como carboximetil-dextrano, celulosas tales como hidroxietilcelulosa o hidroxipropilcelulosa, hidrolizados de quitosano, almidones tales como hidroxietilalmidones o hidroxipropilalmidones, glucógeno, agarosa, goma guar, inulina, pululano, goma xantano, carragenina, pectina, ácido alginico etc.

El documento WO 03/074087 se refiere a un método de acoplamiento de proteínas con un polisacárido modificado derivado de almidón. La acción de unión entre la proteína y el polisacárido, hidroxi-alkil-almidón, es un enlace covalente que se forma entre el grupo aldehído terminal o un grupo funcional que resulta de la modificación química de dicho grupo aldehído terminal de la molécula de hidroxi-alkil-almidón, y un grupo funcional de la proteína. Como grupo reactivo de la proteína, se describen grupos amino, grupos tio y grupos carboxi.

El documento WO 2005/014050 describe las preparaciones de conjugados de hidroxi-alkil-almidón (HAS) y una proteína G-CSF, en donde al menos un grupo funcional del polímero o del derivado del mismo se hace reaccionar con al menos un grupo funcional de la proteína, formando de este modo un enlace covalente. Otros documentos de la técnica anterior que se refieren a la HASilación, preferiblemente HESilación, de polipéptidos, son los documentos WO 2005/014655, WO 2005/092390, WO 2007/031266, WO 2005/092928 y WO 2005/092391.

Aunque se han descrito varios métodos en la técnica anterior para modificar los polipéptidos terapéuticos tales como G-CSF por restos poliméricos con el fin de prolongar su tiempo de aclaramiento y reducir la inmunogenicidad, parece que se ha realizado poco trabajo para desarrollar formulaciones ventajosas para dichos conjugados de polímero y G-CSF.

El producto Neulasta[®] mencionado antes es una composición líquida destinada para inyección subcutánea. La preparación comprende pegfilgrastim, acetato de sodio, sorbitol, polisorbato 20 y agua para inyección y tiene un pH de 4,0 (véase <http://www.neulasta.com>, y ROTE LISTE 2007). Los productos Neulasta[®] y Neupogen[®], comercializados ambos por Amgen, son casi idénticos en lo que respecta al agente tampón, excipientes y valor de pH de la solución: el Neupogen[®] comprende filgrastim (en lugar de pegfilgrastim), acetato de sodio, sorbitol, polisorbato 80 y agua para inyección y tiene también un pH de 4,0 (véase <http://www.neupogen.com>, y ROTE LISTE 2007).

La presente invención se dirige a composiciones farmacéuticas líquidas que comprenden un conjugado de polímero y G-CSF, en donde las composiciones han sido desarrolladas específicamente para tener en cuenta las características de los conjugados de polímero y G-CSF. Aunque se han descrito varios métodos en la técnica anterior con respecto a formulaciones que comprenden G-CSF no conjugado, se conoce muy poco acerca de preparaciones útiles de conjugados de polímero y G-CSF.

Aunque algunas composiciones farmacéuticas desarrolladas para el G-CSF no conjugado se presentan en la bibliografía de patentes de tal modo que engloban las preparaciones en las que el G-CSF no conjugado es reemplazado por un conjugado PEG-G-CSF, es obvio que las composiciones se preparan y se analizan solamente para el G-CSF no conjugado.

Por ejemplo, el documento WO 2005/042024 describe composiciones farmacéuticas estables que comprenden G-CSF en donde la composición tiene un valor de pH superior a 4,0 y comprende además un ácido, pero está libre de tensioactivos. Aunque la composición farmacéutica descrita en el documento WO 2005/042024 se ha desarrollado

claramente para el G-CSF no conjugado, en la memoria descriptiva se menciona que incluye también el G-CSF modificado químicamente con PEG o similares, que presenta la misma o mejor actividad biológica.

5 Otro ejemplo es el documento WO 2005/039620 que se dirige también a una composición acuosa estable que contiene G-CSF. La composición contiene ácido succínico o ácido tartárico o sales de los mismos como agentes tampón y tiene un pH preferido en el intervalo de 4,0 y 5,8. Según la memoria descriptiva, la proteína G-CSF se puede modificar también sintéticamente, p.ej. por glucosilación enzimática o PEGilación química.

10 El documento EP 1 260 230 A1 describe formulaciones de proteína estables que contienen triptófano como estabilizante. La lista de proteínas incluye también el G-CSF, y el G-CSF modificado químicamente con PEG o similares. Las formulaciones de G-CSF que se mencionan tienen preferiblemente un pH de 5-7, más preferiblemente 6,0-6,7.

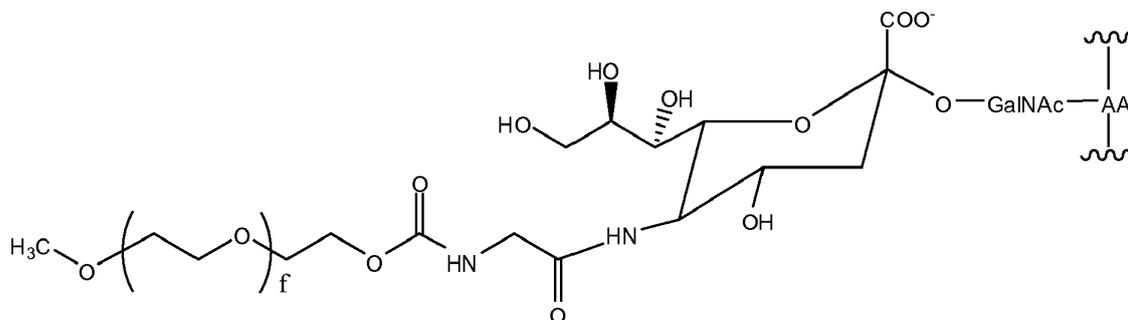
Otro ejemplo es el documento EP 1 336 410 A1, que describe formulaciones farmacéuticas inyectables que contienen una proteína fisiológicamente activa como ingrediente activo y al menos un azúcar como agente calmante y que tiene un pH de 6,5-7,4. De nuevo en este caso, se menciona que el G-CSF modificado químicamente con PEG o similares también está incluido.

15 El documento EP 1 329 224 A1 describe una formulación de solución de G-CSF que contiene al menos un aminoácido o una sal del mismo, preferiblemente metionina, como estabilizante. Las formulaciones de solución de G-CSF tienen preferiblemente un pH de 5-7, más preferiblemente de 5,5-6,8. De nuevo, se indica que el G-CSF modificado químicamente con PEG o similares también está incluido.

20 Sin embargo, ninguna de las formulaciones descritas en la técnica anterior es una formulación específica de conjugado de polímero y G-CSF. Mejor dicho, las soluciones descritas en la bibliografía de patentes han sido desarrolladas y analizadas únicamente para G-CSF no conjugado.

25 El problema esencial en la presente invención es proporcionar una composición de conjugado polímero-G-CSF que se adapta a dichos conjugados y que es estable a temperaturas elevadas, esto es, por encima de la temperatura del refrigerador que usualmente está entre 2 y 8 °C. Además, es un objeto de la invención proporcionar una composición farmacéutica que no necesita reconstitución en ninguna etapa de su preparación y que causa la menor irritación posible cuando se administra a un paciente.

Estos problemas se resuelven según la presente invención proporcionando una preparación farmacéutica acuosa que comprende como agente activo, un conjugado polímero-G-CSF que tiene la siguiente fórmula:



en donde AA es treonina 133 o treonina 134 si está presente una metionina en el N terminal de G-CSF; y en donde f es un número entero seleccionado de 1 a 2500, polisorbato 20 y/o polisorbato 80 como tensoactivo, sorbitol y/o manitol como modificador de la tonicidad, acetato como tampón y sodio, y ningún otro excipiente, en donde la preparación tiene un pH en el intervalo de 4,5 a 5,5.

35 Se ha encontrado sorprendentemente que la formulación de un conjugado polímero-G-CSF en una composición que tiene un valor de pH en el intervalo de 4,5 a 5,5, preferiblemente de 5,0, evita la hidrólisis ácida del enlace del conjugado. Este intervalo de pH mejora la estabilidad de la solución a temperaturas por encima de la temperatura del refrigerador (2-8 °C), especialmente a temperatura ambiente (esto es por debajo de 25 °C) e incluso a temperaturas más altas, p.ej. 40 °C. Esto significa que la composición se puede almacenar sin enfriamiento durante un período de tiempo prolongado, sin una pérdida significativa de actividad ni una degradación significativa.

40 Además, independientemente de la estabilidad durante el almacenaje, las composiciones según la invención tienen ventajas con respecto a una composición comparable que tiene un pH de 4,0, puesto que una composición que es menos ácida causa menos irritación cuando se administra a un paciente.

A menos que se indique otra cosa, las siguientes definiciones se presentan para ilustrar y definir el significado y alcance de los diferentes términos utilizados para describir la invención en esta memoria.

5 El término "conjugado polímero-G-CSF" se refiere a un conjugado entre un polipéptido de G-CSF y un polímero en donde el conjugado se forma mediante un enlace covalente entre un grupo funcional del polímero y un grupo funcional del polipéptido. Los conjugados pueden comprender uno o más restos poliméricos.

10 El término "G-CSF" (o polipéptido G-CSF o proteína G-CSF o péptido G-CSF) se refiere a una proteína que tiene la actividad biológica *in vivo* del G-CSF humano presente en la naturaleza, esto es, una proteína que es capaz de estimular la diferenciación y la proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas. El G-CSF puede ser identificado inequívocamente como G-CSF según el ensayo descrito en Stute, N., *et al.* "Pharmacokinetics of subcutaneous human granulocyte colony-stimulating factor in children" (1992) Blood 79 (11), páginas 2849-2854.

15 En una realización a título de ejemplo, el G-CSF tiene una secuencia de aminoácidos según la siguiente SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, en donde la SEQ ID NO:1 representa la secuencia de aminoácidos de tipo natural de metionil-G-CSF humano producido en *E. coli*, y la SEQ ID NO:2 representa la secuencia de aminoácidos de G-CSF humano producido en células de mamífero, p.ej. en células CHO. La SEQ ID NO:1 es la variante de 175 aminoácidos, en donde el primer aminoácido es metionina y hay un residuo de treonina en Thr 134. La SEQ ID NO:2 es una variante de 174 aminoácidos que tiene la misma secuencia que la variante de 175 aminoácidos excepto que falta la metionina líder, por lo tanto la secuencia empieza con T y hay un residuo de treonina en la posición 133.

SEQ ID NO: 1:

**MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHPPEELV
LLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPE
LGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQ
RRAGGVLVASHLQSFLEVSRYRHLAQP (175 aminoácidos)**

SEQ ID NO: 2

**TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHPPEELVL
LGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPEL
GPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQR
RAGGVLVASHLQSFLEVSRYRHLAQP (174 aminoácidos)**

20 Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que la presente invención no se limita a las secuencias representadas aquí, sino que incluye también variantes de G-CSF. Dichas variantes son bien conocidas en la técnica. Ellas pueden contener deleciones, sustituciones o adiciones de uno o más aminoácidos en las secuencias de aminoácidos representadas antes a la vez que mantienen la actividad biológica del G-CSF presente en la naturaleza. Como ejemplos, pero sin que signifique de ningún modo que limitan la presente invención, las variantes de G-CSF están descritas en los documentos WO 01/87925, EP 0 456 200 A, US 6.166.183, US 6.004.548, US 25 5.580.755, US 5.582.823, US 5.675.941, US 5.416.195, US 5.399.345, WO 2005/055946 y WO 2006/074467.

El polipéptido G-CSF puede ser glucosilado o no glucosilado. En una realización preferida, el polipéptido G-CSF es G-CSF humano recombinante producido en *E. coli*, esto es, con la secuencia de aminoácidos representada antes en la SEQ ID NO:1 o una variante de la misma.

El polímero es PEG.

30 Todas las especificaciones de concentración en mg/mL utilizadas en el texto que sigue con respecto al conjugado se refieren únicamente al resto G-CSF. El resto PEG por definición no se tiene en cuenta para la concentración másica.

Mientras el filgrastim tiene un peso molecular de aproximadamente 18-19 kD, el pegfilgrastim es mucho más grande debido al resto monometoxi-PEG y tiene un peso molecular de aproximadamente 39 kD. Los conjugados de polímero y G-CSF de la presente invención pueden tener un peso molecular en el intervalo de 20 a 60 kD, preferiblemente en el intervalo de 35 a 45.

- 5 En la técnica anterior se describen PEG adecuados, p.ej. en los documentos WO 2005/055946, WO 2006/074467 y WO 01/87329. El resto PEG puede ser lineal o ramificado y tiene un tamaño de 5 a 40 kD. Preferiblemente, el resto PEG tiene un peso molecular de 15 a 25 kD, lo más preferiblemente aproximadamente 20 kD.

También se han descrito en la técnica anterior métodos para producir conjugados de polímero y G-CSF. Los documentos mencionados antes en relación con la preparación de conjugados entre polipéptidos y restos poliméricos se incluyen aquí como referencias.

10 El término "PEG-G-CSF" (G-CSF PEGilado) se refiere a una proteína G-CSF que está unida covalentemente con uno o más restos de polietilenglicol como se describe más adelante. El grupo o grupos PEG y la proteína G-CSF están ligados uno con otro mediante un enlazador, como se define en la fórmula de la reivindicación 1.

Dicho conjugado se denomina G-CSF "glucoPEGilado".

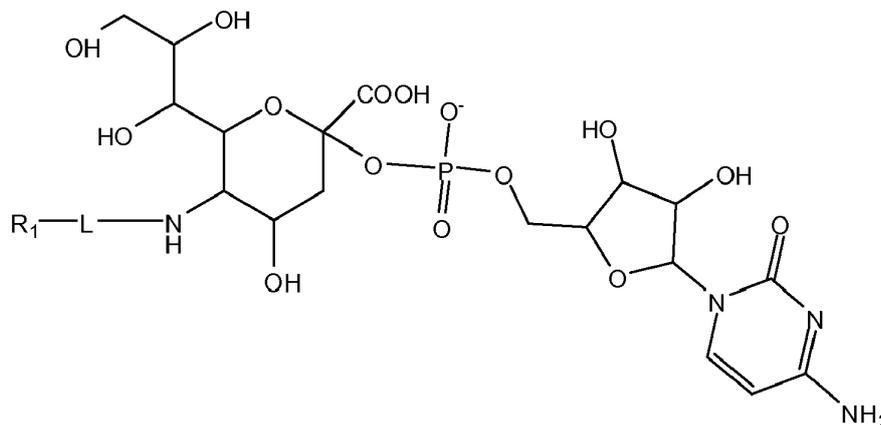
- 15 En una realización a título de ejemplo, las moléculas de G-CSF "glucopegilado" de la invención se producen por la formación mediada por enzimas de un conjugado entre un péptido G-CSF glucosilado o no glucosilado y un resto sacarilo enzimáticamente transferible que incluye un resto poli(etilenglicol) dentro de su estructura. El resto PEG está unido al resto sacarilo directamente (esto es, por medio de un único grupo formado por la reacción de dos grupos reactivos) o a través de un resto enlazador, p.ej., alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, etc. El grupo de enlace glucosilo pueden ser restos de ácido siálico que se derivatizan con PEG.

El enlazador glucosilo se une a la proteína G-CSF mediante O-glucosilación en un residuo de treonina de la proteína G-CSF.

El enlazador glucosilo comprende ácido siálico y N-acetilgalactosamina.

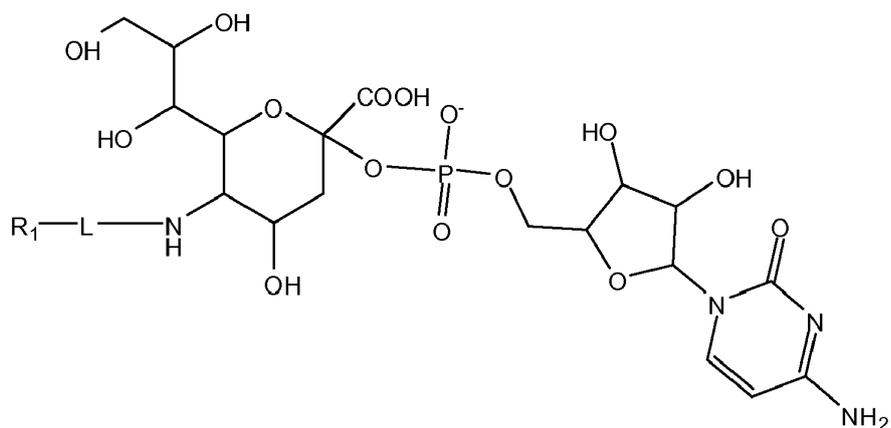
- 25 El péptido G-CSF está glucosilado en un residuo de treonina, preferiblemente en el residuo de treonina de la posición 134 (calculada para el polipéptido metionil-G-CSF, esto es, que tiene una metionina en N terminal y 175 aminoácidos en total).

El conjugado de péptido G-CSF descrito antes se puede producir según un método que comprende (a) poner en contacto un sustrato de péptido G-CSF con un donador de PEG-ácido siálico que tiene la fórmula:



- 30 en donde R₁ y L son como se definen en la fórmula de la reivindicación 1, y una enzima que es capaz de transferir el resto de PEG-ácido siálico desde el donador hasta el residuo glucosilo del sustrato de péptido G-CSF. En una realización preferida, la enzima es una sialiltransferasa, p.ej. ST6GalNAcl, como se describe en el documento WO 2005/055946.

- 35 El conjugado de péptido G-CSF descrito antes se puede producir según un método que comprende (a) poner en contacto un sustrato de péptido G-CSF no glucosilado con un donador de glucosilo y una enzima que es capaz de transferir el resto glucosilo desde el donador hasta el sustrato de péptido G-CSF, y (b) poner en contacto el péptido G-CSF glucosilado con un donador de PEG-ácido siálico que tiene la fórmula:



en donde R_1 y L son como se definen en la fórmula de la reivindicación 1, y una enzima que es capaz de transferir el resto de PEG-ácido siálico desde el donador hasta el residuo glucosilo del sustrato de péptido G-CSF, en donde (a) y (b) son reacciones secuenciales o simultáneas. En una realización preferida el donador de glucosilo es UDP-N-acetilgalactosamina. En una realización preferida la enzima en (a) es una N-acetilgalactosaminiltransferasa y la enzima en (b) es una sialiltransferasa, p.ej. GalNAcT2 en (a) y ST6GalNAcI en (b).

El G-CSF se puede producir por procedimientos químicos sintéticos o puede proceder de cualquier fuente humana o de otro mamífero y se puede obtener por purificación de fuentes naturales tales como placenta humana, sangre humana u orina humana. En adición, muchos carcinomas epiteliales, células de leucemia mieloide aguda y líneas celulares de diversos tumores son capaces de expresar este factor.

Preferiblemente, el G-CSF se produce de forma recombinante. Esto incluye la expresión en hospedantes procariontes o eucariotes de secuencias de ADN exógeno obtenidas mediante genómica o clonación de cADN o mediante síntesis de ADN. Los hospedantes procariontes adecuados incluyen diversas bacterias tales como *E. coli*, que es el hospedante preferido. Los hospedantes eucariotes adecuados incluyen levaduras tales como *S. cerevisiae* y células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO) y células de mono.

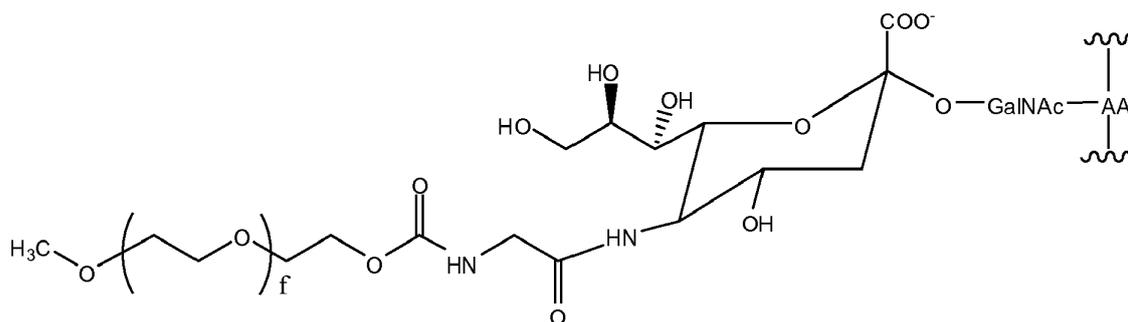
La producción recombinante de una proteína tal como G-CSF es conocida en la técnica. En general, esto incluye la transfección de células hospedantes con un vector de expresión apropiado, el cultivo de las células hospedantes en condiciones que hacen posible la producción de la proteína y la purificación de la proteína a partir de las células hospedantes. Para información detallada véase p.ej. Souza, L.M. *et al.* 1986, Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells, *Science* (1986) 232: 61-65; Nagata, S. *et al.* 1986, Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor, *Nature* (1986) 319: 415-418; Komatsu, Y. *et al.* 1987, Cloning of granulocyte colony-stimulating factor cDNA from human macrophages and its expression in *Escherichia coli*, *Jpn. J. Cancer Res.* (1987) 78: 1179-1181.

En una realización preferida, el G-CSF tiene la secuencia de aminoácidos de G-CSF maduro humano (véase p.ej.; Nagata, S. *et al.* (1986), cita anterior), y puede contener además una metionina en su terminal amino, que da como resultado después una proteína de 175 aminoácidos (véase SEQ ID NO: 1 anterior). Además, en lugar de la metionina, el G-CSF puede contener una serina o un residuo de treonina.

La proteína se purifica entonces según un protocolo convencional de procesamiento aguas abajo. Métodos de purificación adecuados para el G-CSF están descritos en la técnica anterior, p.ej. en los documentos WO 87/01132, EP 0 719 860 A, EP 1 458 757 A, EP 1 527 188 A, WO 03/051922, WO 01s/04154 y WO 2006/097944.

En una realización de la presente invención el conjugado de polímero y péptido G-CSF se prepara como se describe en el Ejemplo 1 proporcionado aquí. Este conjugado se caracteriza por que el polipéptido G-CSF y el resto PEG se unen por medio de un grupo N-acetilgalactosaminilo (GalNAc) y un grupo de ácido siálico (SA).

El conjugado polímero-G-CSF tiene la siguiente fórmula:



en donde AA es treonina 133 (treonina 134 si está presente la metionina en el N terminal) de G-CSF; y f es un número entero seleccionado de 1 a 2500.

5 La preparación farmacéutica de la presente invención es una solución acuosa. Con fines de inyección, se prefiere el uso de agua pura como disolvente. Sin embargo, se pueden emplear también otros disolventes que son adecuados y convencionales para preparaciones farmacéuticas. En una realización preferida de la invención, las composiciones farmacéuticas son soluciones isotónicas.

Además, no es necesaria la reconstitución en ninguna etapa de preparación de la formulación de solución líquida de la invención. La solución es una formulación lista para su uso.

10 La composición farmacéutica de la invención tiene un pH en el intervalo de 4,5 a 5,5. En una realización preferida, el valor de pH está entre 4,7 y 5,3, más preferiblemente entre 4,8 y 5,2 y lo más preferiblemente entre 4,9 y 5,1.

15 Si se requiere un ajuste para alcanzar el intervalo de pH deseado, el valor de pH se ajusta por medio de soluciones adecuadas; con soluciones ácidas en el caso en que esté indicada una reducción del valor de pH y con soluciones alcalinas en el caso en que esté indicado un aumento del valor de pH. Las soluciones ácidas adecuadas son p.ej. ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido cítrico e hidrogenofosfato de sodio o de potasio. Las soluciones alcalinas adecuadas son hidróxidos alcalinos y alcalino-térreos, carbonatos alcalinos, acetatos alcalinos, citratos alcalinos e hidrogenofosfatos dialcalinos, p.ej. hidróxido de sodio, acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato de sodio, hidrogenofosfato de disodio o dipotasio o amoníaco.

20 Preferiblemente, se ajusta el pH de la solución utilizando hidróxido de sodio. El sodio usualmente está presente en una concentración inferior a 10 mmol/L, típicamente inferior a 6 mmol/L.

La preparación farmacéutica de la invención comprende uno o más tensioactivos, polisorbatos 20 y 80.

La concentración del detergente en la formulación está típicamente en el intervalo de 0,0005 % (p/v) a 0,05 % (p/v), preferiblemente de 0,001 % (p/v) a 0,01 % (p/v), más preferiblemente de 0,002 % (p/v) a 0,006 % (p/v) y lo más preferiblemente de 0,003 % (p/v) a 0,004 % (p/v), en base al volumen total de la formulación de solución.

25 Usualmente las formulaciones de la invención contienen el tensioactivo polisorbato 20 u 80 en una concentración de 0,003 % (p/v), 0,0033 % (p/v) o 0,004 % (p/v). Se prefiere el polisorbato 20.

La formulación según la invención comprende un agente tampón fisiológicamente aceptable, concretamente se prefiere un tampón acetato, esto es un ácido o una de sus sales, p.ej. sales alcalinas o sales de amonio.

30 El tampón acetato usualmente está presente en la formulación en una concentración de 1 a 100 mmol/L, preferiblemente 2 a 50 mmol/L y lo más preferiblemente 5 a 20 mmol/L. En una realización preferida el tampón está presente a 10 mmol/L, lo más preferiblemente es acetato presente a 10 mmol/L.

La concentración del acetato se elige de tal modo que se proporcione la acción de estabilizar el pH así como suficiente capacidad tamponante. Sin embargo, simultáneamente la concentración iónica y por tanto la conductividad de la solución se mantienen tan bajas como sea posible con el fin de evitar la formación de agregados.

35 En una realización de la invención la conductividad de la formulación de la solución final es inferior a 1,0 mS/cm, preferiblemente inferior a 0,8 mS/cm y más preferiblemente inferior a 0,5 mS/cm.

40 En una realización de la invención, la formulación comprende además manitol y/o sorbitol como un agente modificador de la tonicidad. El sorbitol es especialmente preferido. La cantidad de sorbitol o manitol es usualmente hasta 10,0 % (p/v), basado en el volumen total de la solución. Preferiblemente, la concentración es hasta 8,0 % (p/v), más preferiblemente hasta 6,0 % (p/v) y lo más preferiblemente 5,0 % (p/v). En una realización preferida, el sorbitol está presente en una cantidad de 5,0 % (p/v).

Las formulaciones de la presente invención que contienen el conjugado polímero-G-CSF se administran normalmente por vías parenterales tales como inyección (subcutánea, intravenosa o inyección intramuscular) o administración percutánea, mucosal, nasal o pulmonar, pero también se pueden administrar oralmente.

5 El conjugado polímero-G-CSF está usualmente presente en la formulación en una concentración de 1,0 a 30,0 mg/mL, preferiblemente de 5,0 a 20,0 mg/mL y lo más preferiblemente de 8,0 a 12,0 mg/mL. En una realización preferida, el conjugado polímero-G-CSF está presente en una cantidad de 10,0 mg/mL.

La preparación acuosa según la invención contiene un G-CSF glucoPEGilado como se define en la reivindicación 1, como agente activo, polisorbato 20 y/o polisorbato 80 como tensioactivo, sorbitol y/o manitol como modificador de la tonicidad, acetato como tampón y sodio, y ningún otro excipiente.

10 En otro aspecto de la invención la preparación acuosa de la invención como se ha descrito antes, se diluye para obtener una preparación de dilución acuosa que es adecuada para uso pediátrico. Las diluciones apropiadas para el tratamiento de los niños se obtienen diluyendo la solución de la invención descrita antes de 1:2 a 1:8.

15 La invención se refiere también a un recipiente farmacéutico que contiene la preparación acuosa de la invención o una solución de dilución obtenida de la misma por dilución. Los recipientes farmacéuticos adecuados son conocidos de la técnica anterior. El recipiente puede ser, por ejemplo, una jeringa, vial, botella de perfusión, ampolla o cartucho (carpoule). En una realización preferida, cuando el recipiente es una jeringa, la jeringa está equipada con un sistema de protección de la aguja. Dichos sistemas de protección de la aguja que son bien conocidos de la técnica anterior ayudan a reducir el riesgo de lesiones. En otra realización, el recipiente es un cartucho dentro de una pluma de inyección.

20 La presente invención se refiere también a un método para preparar una preparación acuosa de la invención, en donde el conjugado polímero-G-CSF como agente activo, se formula en una preparación acuosa que tiene un pH en el intervalo de 4,5 a 5,5 y que comprende un tensioactivo y otros excipientes farmacéuticos.

25 En otro aspecto la invención se refiere a una preparación acuosa de la invención para uso en el tratamiento o prevención de la neutropenia. Además, la preparación acuosa de la invención se puede utilizar con ventaja en el tratamiento o prevención de trastornos neurológicos o en relación con el trasplante de médula ósea. En general, las soluciones farmacéuticas de la invención son útiles para la movilización de células madre.

30 La formulación farmacéutica líquida según la invención se encontró que presentaba muy buena estabilidad en el almacenaje. Dentro del alcance de la presente invención, el término "estable en el almacenaje" se entiende que significa que el contenido del conjugado activo de polímero y G-CSF representa todavía el 80 % o más de la concentración inicial después de tres meses de almacenaje de la formulación a 25 °C. Preferiblemente, después de almacenaje durante tres meses a 25 °C, el contenido restante de actividad de G-CSF representa todavía al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, y lo más preferiblemente al menos el 95 % de la actividad original.

35 La actividad del conjugado polímero-G-CSF se puede determinar por medio de ensayos de actividad convencionales, como están descritos en la técnica anterior para G-CSF; véase p.ej. Draft Monographie "Filgrastim Concentrated Solution" PharmEur. Vol.19, No.1, Jan. 2007, o Stute, N., *et al.* "Pharmacokinetics of subcutaneous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children 1" (1992) Blood 79 (11), páginas 2849-2854.

40 La medida de la actividad de G-CSF *in vitro* está descrita p.ej. por Shirafuji, N. *et al.* 1989, A new bioassay for human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) using murine myeloblastic NFS-60 cells as targets and estimation of its levels in sera from normal healthy persons and patients with infectious and hematological disorders, Exp. Hematol. (1989) 17, 116-119. Para la medida de la actividad de G-CSF *in vivo* véase p.ej. Tanaka, H. *et al.* 1991, Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor conjugated to polyethylene glycol in rats, Cancer Research (1991) 51, 3710-3714. Otras publicaciones en las que se describen ensayos para la medida de la actividad de G-CSF son US 6.555.660; Nohynek, G.J. *et al.* 1997, Comparison of the potency of glycosylated and nonglycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factors in neutropenic and non-neutropenic CD rats, Cancer Chemother. Pharmacol. (1997) 39, 259-266.

45 La pureza del conjugado polímero-G-CSF utilizado en la formulación según la invención debería ser al menos del 95 %, preferiblemente al menos del 97 %, más preferiblemente al menos del 99 % y lo más preferiblemente más de 99 %. El grado de pureza se puede determinar por medio de análisis por HPLC. Los materiales y protocolos adecuados para llevar a cabo dichos análisis se pueden obtener de proveedores comerciales tales como Vydac o TOSOH Bioscience (<http://www.tosohbiosep.de>).

50 Los componentes para formular las soluciones según la invención se pueden obtener de fuentes convencionales, por ejemplo de compañías tales como Sigma o Merck.

La producción de la formulación de la invención se puede llevar a cabo según métodos convencionales. Los componentes de la formulación se pueden disolver en un tampón acuoso. Alternativamente, se puede obtener ya el conjugado en un tampón acuoso como resultado del procedimiento de purificación.

5 Finalmente, la formulación líquida terminada se envasa en un recipiente farmacéutico adecuado, en el que se conserva hasta la administración.

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de G-CSF-GalNAc-SA-PEG

10 El siguiente ejemplo ilustra la preparación de G-CSF-GalNAc-SA-PEG en (a) un método de dos etapas secuenciales en el que cada producto intermedio se purifica antes de ser usado en la siguiente etapa, y (b) un método de una etapa que utiliza la adición simultánea de enzimas

a. Método de las dos etapas

Preparación de G-CSF-GalNAc (pH 6,2) a partir de G-CSF y UDP-GalNAc utilizando GalNAc-T2.

15 Se concentró G-CSF (960 µg) en 3,2 mL de tampón empaquetado mediante ultrafiltración utilizando un filtro UF (MWCO 5K) y se reconstituyó después con 1 mL de tampón MES 25 mM (pH 6,2, NaN₃ al 0,005 %). Se añadieron entonces UDP-GalNAc (6 mg, 9,24 mM), GalNAc-T2 (40 µL, 0,04 U), y MnCl₂ 100 mM (40 µL, 4 mM) y la solución resultante se incubó a temperatura ambiente.

20 Después de 24 horas, la técnica MALDI indicó que la reacción era completa. La mezcla de reacción se sometió directamente a purificación por HPLC utilizando SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) (Superdex 75 y Superdex 200) y un tampón de elución que comprende PBS (solución salina fosfatada tampón, pH 4,9 y Tween 80 al 0,005 %). El pico de G-CSF-GalNAc recogido se concentró utilizando un filtro Centricon MWCO 5 KDa hasta aproximadamente 150 µL y se ajustó el volumen a 1 mL utilizando PBS (solución salina fosfatada tampón, pH 4,9 y Tween 80 al 0,005 %). Concentración final de proteína 1 mg/mL (A₂₈₀), rendimiento 100 %. Se conservó la muestra a 4 °C.

25 Preparación de G-CSF-GalNAc-SA-PEG utilizando G-CSF-GalNAc purificado, CMP-SA-PEG (20 KDa) y ST6GalNAc-TI de ratón (pH 6,2).

30 La solución de G-CSF-GalNAc que contenía 1 mg de proteína se sometió a intercambio de tampón en un tampón MES 25 mM (pH 6,2, NaN₃ al 0,005 %) y se añadió CMP-SA-PEG (20 KDa) (5 mg, 0,25 µmol). Después de disolver, se añadieron MnCl₂ (100 µL, solución 100 mM) y ST6GalNAc-I (100 µL, enzima de ratón) y la mezcla de reacción se balanceó lentamente a 32 °C durante tres días. Se concentró la mezcla de reacción por ultrafiltración (MWCO 5K) y se cambió el tampón con NaOAc 25 mM (pH 4,9) una vez y después se concentró a 1 mL de volumen total. Se purificó entonces el producto utilizando SP-Sefarosa (A: NaOAc 25 mM + Tween-80 al 0,005 % pH 4,5; B: NaOAc 25 mM + Tween-80 al 0,005 % pH 4,5 + NaCl 2 M) al tiempo de retención 13-18 min y SEC (Superdex 75; PBS-pH 7,2, Tween 80 al 0,005 %) al tiempo de retención 8,6 min (Superdex 75, caudal 1 mL/min). Se recogieron las fracciones
35 deseadas, se concentraron a 0,5 mL y se conservaron a 4 °C.

b. Método de una etapa

Procedimiento de recipiente único utilizando ST6GalNAc-I de ratón (pH 6, 0).

40 Se concentró G-CSF (960 µg de proteína disueltos en 3,2 mL del tampón de formulación del producto) por ultrafiltración (MWCO 5K) hasta 0,5 mL y se reconstituyó con tampón MES 25 mM (pH 6,0, NaN₃ al 0,005 %) hasta un volumen total de aproximadamente 1 mL o una concentración de proteína de 1 mg/mL. Se añadieron entonces UDP-GalNAc (6 mg, 9,21 µmol), GalNAc-T2 (80 µL, 80 mU), CMP-SA-PEG (20 KDa) (6 mg, 0,3 µmol) y enzima de ratón ST6GalNAc-I (120 µL) y MnCl₂ 100 mM (50 µL). Se balanceó la solución a 32 °C durante 48 horas y se purificó utilizando condiciones de cromatografía estándar sobre SP-Sefarosa. Se obtuvo un total de 0,5 mg de proteína (A₂₈₀) o aproximadamente un rendimiento global del 50 %. Se confirmó la estructura del producto por análisis con ambas
45 técnicas, MALDI y SDS-PAGE.

Procedimiento de recipiente único utilizando ST6GalNAc-I de pollo (pH 6, 0).

50 Se concentraron 14,4 mg de G-CSF hasta un volumen final de 3 mL, se intercambió el tampón con tampón MES 25 mM (pH 6,0, NaN₃ al 0,05 %, Tween 80 al 0,004 %) y se ajustó el volumen a 13 mL. Se añadieron entonces UDP-GalNAc (90 mg, 150 µmol), GalNAc-T2 (0,59 U), CMP-SA-PEG-20 KDa (90 mg), ST6GalNAc-I de pollo (0,44 U), y MnCl₂ 100 mM (600 µL). La mezcla resultante se mantuvo a temperatura ambiente durante 60 horas. Se concentró

- entonces la mezcla de reacción utilizando ultrafiltración (MWCO 5K) y centrifugación. Se disolvió el residuo (aproximadamente 2 mL) en tampón NaOAc 25 mM (pH 4,5) y se concentró de nuevo hasta 5 mL de volumen final. Se purificó esta muestra utilizando SP-Sefarosa durante aproximadamente 10-23 min, SEC (Superdex 75, 17 min, caudal 0,5 mL/min) y una SEC adicional (Superdex 200, 23 min, caudal 0,5 mL/min), para obtener 3,6 mg (rendimiento global del 25 %) de G-CSF-GalNAc-SA-PEG-20 KDa (A_{280} y método BCA).

Ejemplo 2. Formulación líquida de conjugado polímero-G-CSF (PEG-SA-GalNAc-G-CSF)

Se preparó una formulación líquida que comprende G-CSF glucoPEGilado (teniendo el conjugado la estructura: PEG-SA-GalNAc-G-CSF) formulando los siguientes componentes en una solución acuosa de tampón acetato.

Ingrediente	
G-CSF glucoPEGilado	10 mg/mL
Acetato	10 mM
Sorbitol	5,0 % (p/v)
Polisorbato 20	0,0033 % (p/v)
Sodio	4,38 mM
pH	5,0

- 10 Se ajustó el valor de pH de la composición añadiendo NaOH. Todos los ingredientes son de calidad según la Farmacopea Europea (Ph. Eur.).

En adición, se preparó la misma composición con pH 4,5 o pH 5,5 y proporcionalmente menos o más sodio, respectivamente. Se preparó también una formulación comparativa que tiene un pH de 4,0 (como el de la preparación Neulasta®).

Ejemplo 3. Ensayos de estabilidad de las formulaciones según la presente invención

- 15 Las composiciones de pH 4,5, 5,0 y 5,5, se dividieron en alícuotas de 500 μ L/vial y se conservaron a 2-8 °C y a 25 °C). Después de 1, 2, 3, 4,5, 6, 8, 12, y 15 meses, se analizaron las muestras en cuanto a los parámetros de ensayo que se dan en la tabla que sigue.

Las especificaciones esperadas fueron las siguientes para la composición con un pH de 5,0:

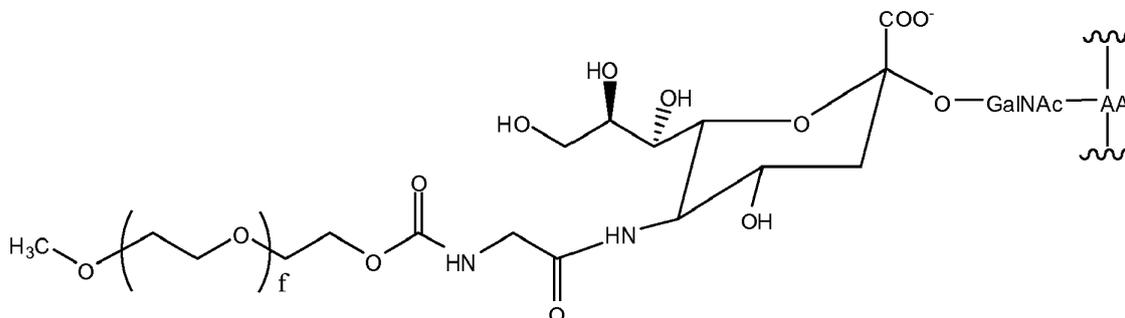
Parámetro de ensayo	Método	Especificación
Aspecto	Inspección visual	Límpida, incolora
Contenido	UV-VIS	10,0 mg/mL \pm 5 %
Contenido	RP-HPLC (30 °C)	10,0 mg/mL \pm 5 %
Potencia	Bioensayo	54-156 %
Identidad	SDS-PAGE	Conforme al estándar de referencia
Pureza	Transferencia Western	Conforme al estándar de referencia
Pureza	RP-HPLC (60 °C)	Oxidación < 2,0 %
Pureza	RP-HPLC (30 °C)	G-CSF no pegilado 2,0 %
Pureza	SEC	Dímeros y agregados < 2,0 %
Desamidación	IEF	Sin bandas adicionales detectables
pH	Según la Ph. Eur. 5 y USP 28	5,0 \pm 0,2
Endotoxinas	Ensayo de endotoxinas bacterianas según Ph. Eur. 5	< 5 EU/mg
Esterilidad	Según la Ph. Eur. 5	Estéril
Partículas sub-visibles	Contaminación de partículas: partículas sub-visibles según Ph. Eur. 5	< 6000 partículas \geq 10 μ m por vial; < 600 partículas \geq 25 μ m por vial

Todas las muestras analizadas a T = 0, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4,5 meses, 6 meses, 8 meses, 12 meses y 15 meses cumplieron las especificaciones esperadas. Esto fue así para todas las composiciones ensayadas que comprendían G-CSF glucoPEGilado y que tenían un pH de 4,5, 5,0 o 5,5.

- 5 Se compararon las composiciones de la invención con dos formulaciones comparativas: Neulasta® (pH 4,0) y una composición de G-CSF glucoPEGilado (PEG-SA-GalNAc-G-CSF) que tenía un pH de 4,0. Los resultados demuestran que en comparación con la solución comparativa que comprende G-CSF glucoPEGilado y que tiene un pH de 4,0, las formulaciones que tienen valores de pH más altos de 4,5, 5,0 y 5,5 presentan mejor estabilidad al almacenaje. Los datos recogidos permiten llegar a la conclusión de que los valores más altos de pH evitan la hidrólisis ácida del enlace de glucoPEG. Además, se observó que las formulaciones de la presente invención tienen una estabilidad que es comparable a la estabilidad del conjugado PEG-G-CSF conocido como Neulasta®.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Una preparación acuosa que comprende como agente activo, un conjugado polímero-G-CSF que tiene la siguiente fórmula:



- 5 en donde AA es treonina 133 o treonina 134 si está presente una metionina en el N terminal de G-CSF; y en donde f es un número entero seleccionado de 1 a 2500, polisorbato 20 y/o polisorbato 80 como tensioactivo, sorbitol y/o manitol como modificador de la tonicidad, acetato como tampón y sodio, y ningún otro excipiente, en donde la preparación tiene un pH en el intervalo de 4,5 a 5,5.
- 10 2. La preparación acuosa según la reivindicación 1, en donde el tensioactivo está presente en una concentración de 0,0001 % (p/v) - 0,05 % (p/v).
3. La preparación acuosa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el pH está en el intervalo de 4,7 a 5,3.
4. La preparación acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el pH está en el intervalo de 4,9 a 5,1.
- 15 5. La preparación acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el conjugado polímero-G-CSF está presente en una concentración de 1-20 mg/mL, preferiblemente de 8 -12 mg/mL.
6. Un recipiente farmacéutico que contiene una preparación acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 20 7. El recipiente farmacéutico según la reivindicación 6, en donde el recipiente es una jeringa, vial, botella de perfusión, ampolla, cartucho (carpoule), jeringa equipada con un sistema de protección de la aguja, o un cartucho dentro de una pluma de inyección.
- 25 8. El procedimiento para preparar una preparación acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el conjugado polímero-G-CSF como agente activo, se formula en una preparación acuosa que tiene un pH en el intervalo de 4,5 a 5,5 y que comprende polisorbato 20 y/o polisorbato 80 como tensioactivo, sorbitol y/o manitol como modificador de la tonicidad, acetato como tampón y sodio.
9. El procedimiento para preparar una preparación acuosa según la reivindicación 8, en donde la preparación acuosa se diluye de 1:2 a 1:8.
- 30 10. La preparación acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento o prevención de la neutropenia, en el tratamiento o prevención de trastornos neurológicos, en relación con el trasplante de médula ósea, o para la movilización de células madre.
11. La preparación acuosa obtenible por el procedimiento según la reivindicación 9, para uso pediátrico.