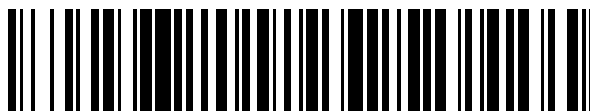


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 454**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2008 E 08785714 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2076243**

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

30 Prioridad:

27.08.2007 EP 07016763
27.08.2007 DE 102007040932

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.12.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HINDERER, WALTER y
LUBENAU, HEINZ

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 524 454 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 G-CSF

5 **[0001]** El objetivo de la presente invención son medicamentos para utilizar en el tratamiento del cáncer, neutropenia crónica severa (SCN), infección por VIH, daño del sistema nervioso central o de los efectos secundarios adversos debido a quimioterapia citotóxica que comprende una formulación líquida acuosa de G-CSF, que consiste sustancialmente en G-CSF y un alcohol de azúcar, polisorbato 80, a una concentración de 0,05-0,06 mg/ml, acetato a 10 una concentración de 5-20 mM como sustancia tampón a pH de 4,15-4,3, y opcionalmente, aminoácidos y/o glicerina y/o carbohidratos y/o conservantes, en la que se añade acetato en forma de su ácido acético y el pH se ajusta con NaOH.

15 **[0002]** Muchas de las formas farmacéuticas conocidas hasta ahora para agentes de proteínas tienen inconvenientes. Por ejemplo, algunas preparaciones contienen aditivos o excipientes farmacéuticos que desde un punto de vista médico no pueden clasificarse fácilmente como inocuos. Debido a su origen y sus propiedades físico-químicas, los polímeros y proteínas tienen un cierto potencial de riesgo con respecto a su idoneidad como aditivos farmacéuticos. Las proteínas de origen humano o animal, así como las proteínas obtenidas de cultivos de células, tienen un potencial riesgo residual de contaminación viral. Debido a sus propiedades antigénicas, otras contaminaciones similares a las proteínas, que son difíciles de detectar analíticamente, también pueden desencadenar reacciones inmunológicas en humanos. Además, las 20 proteínas de origen animal pueden desencadenar reacciones inmunológicas en humanos debido, en general, a sus propiedades específicas de especie. También son posibles reacciones a largo plazo tras la reaplicación de dichas proteínas en un punto de tiempo posterior.

25 **[0003]** La mezcla de compuestos con un peso molecular elevado también puede ser problemático. Los polímeros se pueden acumular en el cuerpo debido a su masa molecular elevada y pueden, por lo tanto, permanecer en el cuerpo durante mucho tiempo si no se produce la biodegradación. En particular, esto es un riesgo en caso de administración subcutánea, ya que la eliminación y la distribución por el torrente sanguíneo son mucho más lentas en comparación con la administración intravenosa. Dependiendo de la masa molar, los polímeros también pueden tener propiedades antigénicas. Además, la pureza de los polímeros es difícil de asegurar debido a los catalizadores utilizados para la producción o debido a la presencia de monómeros y otros fragmentos de polímero. De este modo, el uso de polímeros en formas de dosificación farmacéuticas líquidas debe evitarse en la medida de lo posible, en particular con formas de 30 medicamentos administrables por vía subcutánea.

35 **[0004]** Además, se sabe de la bibliografía que particularmente las formas no glicosiladas de G-CSF, en comparación con las G-CSF glicosiladas obtenidas de células CHO, son extremadamente inestables debido a la oxidación y/o agregación. Por lo tanto, es extremadamente difícil estabilizar formas no glicosiladas de G-CSF y se requieren medidas especialmente seleccionadas con el fin de formular dicha molécula en una forma estable de medicamento.

40 **[0005]** El uso de tensioactivos para estabilizar G-CSF se debe evitar principalmente desde un punto de vista médico, ya que dichos tensioactivos pueden desencadenar irritaciones locales. Las formulaciones con un valor de pH muy bajo, en particular en el caso de administración subcutánea, pueden conducir también a incompatibilidades locales en pacientes, tales como dolor e irritación del tejido local, ya que dicho valor de pH se encuentra por debajo del intervalo fisiológico desde pH 7,0 a 7,5 que está presente en el tejido.

45 **[0006]** La solicitud internacional recientemente publicada WO2005/042024, de manera similar a las enseñanzas de EP373679, muestra una manera para obtener composiciones farmacéuticas estables de G-CSF mediante el mantenimiento de dichas composiciones, entre otras cosas, libre de tensioactivos, y de acuerdo con las composiciones descritas en los ejemplos, mediante la disposición del tampón a una concentración muy baja. No se proporcionan 50 indicaciones con respecto a la aceptabilidad de los medicamentos descritos en la misma.

[0007] En la solicitud de patente europea EP 1129720, se describen preparaciones de G-CSF que tienen un valor de pH en el intervalo de 5 a 8, en las que se supone que el sulfato estabiliza la G-CSF contenida en la preparación. De nuevo, no se proporcionan indicaciones con respecto a la aceptabilidad de las preparaciones de G-CSF descritas en la misma.

55 **[0008]** En "Formulation, Characterisation, and Stability of Protein Drugs: Case Histories", Pearlman, Rodney, Wang, Y. John (Eds.), páginas 303-308, se describe la composición de una formulación de G-CSF disponible comercialmente (Neupogen®).

60 **[0009]** El problema subyacente de la presente invención es proporcionar un medicamento líquido para G-CSF que no muestre las desventajas descritas anteriormente de las formas farmacológicas conocidas hasta ahora. En particular, la preparación farmacéutica debe ser estable durante un periodo largo de tiempo, así como aceptable fisiológicamente. En particular, debe ser adecuado para la autoaplicación por los pacientes y debe caracterizarse por la capacidad de evitar irritaciones y dolor indeseados en el punto de inyección de la piel que tiene lugar a menudo junto en la autoaplicación de medicamentos mediante una inyección o infusión.

65

5 [0010] Este problema se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y se ilustra en las siguientes realizaciones. En particular, la presente invención se refiere a medicamentos para el uso en el tratamiento del cáncer, neutropenia crónica severa (SCN), infección por VIH, daño del sistema nervioso central o de los efectos secundarios adversos debido a quimioterapia citotóxica que comprende una formulación líquida acuosa de G-CSF, que consiste sustancialmente de G-CSF y un alcohol de azúcar, polisorbato 80 a una concentración de 0,05-0,06 mg/ml, acetato a una concentración de 5-20 mM como sustancia tampón a pH de 4,15-4,3, y opcionalmente, aminoácidos y/o glicerina y/o carbohidratos y/o conservantes, en la que se añade acetato en forma de su ácido acético y el pH se ajusta con NaOH. Además, la formulación líquida, según la presente invención, puede contener excipientes farmacéuticamente convencionales adicionales. Sin embargo, se prefiere la ausencia de dichos excipientes y/u otros excipientes.

10 [0011] En la solicitud internacional WO 94/14466, en general, se reivindican preparaciones farmacéuticas acuosas de G-CSF estables en el almacenamiento que se supone que son estables a un valor de pH en el intervalo de 3,5 a 5 y 7 a 8 con el uso de diferentes sistemas tampón. Sin embargo, sólo se ensayan preparaciones líquidas de G-CSF con tampón fosfato por su estabilidad en el almacenamiento, mientras que se ensayaron preparaciones experimentales individuales con otros tampones sólo después de un estrés mecánico corto, es decir, turbidez para la aparición de opacidad en las muestras.

20 [0012] En el proceso de los experimentos realizados dentro del alcance de la presente invención, se tuvo que evaluar que las soluciones de G-CSF que se habían indicado con tampón acetato en los ejemplos de WO 94/14466, en particular la formulación 4 con acetato 10 mM y un valor de pH de 4,5, no presentan la estabilidad deseada porque se habían determinado valores críticos para la presencia de agregados y formas oxidadas de G-CSF. Por consiguiente, se supuso primeramente que, tal como ya se muestra en el documento EP 0373679, un valor de pH de más 4,0 daría lugar a la formación de agregados y que una formulación líquida de G-CSF con un valor de pH de aceptabilidad fisiológica mejorada no podría conseguirse utilizando el sistema tampón de acetato de otro modo preferido.

25 [0013] En la solicitud internacional WO2005/039620, se utilizaron formulaciones líquidas de G-CSF de la composición G-CSF 0,6 mg/ml, tampón acetato 10 mM, Tween 80 al 0,004% (p/v) y D-sorbitol al 5% (p/v) que tenían un valor de pH de 4,0 y 4,2 como formulaciones comparativas bajo el impacto de estrés mecánico y después de congelar y descongelar las formulaciones de G-CSF con tampón succinato con un valor de pH de 5,0 y Tween 20 al 0,02% (p/v). Según estos estudios, las formulaciones de G-CSF con tampón acetato fueron menos estables, de manera que no pareció razonable estudiar adicionalmente dichas composiciones tamponadas con acetato, y mucho menos considerarlas como medicamentos candidatos.

30 [0014] En cambio, en el proceso de los experimentos realizados en el alcance de la presente invención, se hallaron sorprendentemente propiedades ventajosas de las formulaciones de G-CSF tamponadas con acetato con un pH superior a 4,0 con respecto a la estabilidad a las temperaturas de almacenamiento en una nevera y a 40°C, es decir, en el intervalo de la temperatura corporal, así como una aceptabilidad sorprendentemente buena en pacientes, ya que aparecieron menos irritaciones en la piel en comparación con medicamentos disponibles comercialmente.

40 [0015] En particular, se encontró que, en el sentido de la presente invención, mediante la combinación de ácido acético y acetato, respectivamente, como sustancia tampón y un tensoactivo, tal como polisorbato 80, cada uno a una concentración específica y en presencia de un alcohol de azúcar, tal como sorbitol, y mediante el ajuste del valor de pH a aproximadamente $4,2 \pm 0,15$, se obtiene una formulación líquida estable de G-CSF, que trasmite a las moléculas de G-CSF la estabilidad requerida para su idoneidad como medicamento, es tolerable y permite adicionalmente una prevención casi completa de los síntomas que a menudo se pueden observar en el punto de inyección cuando se administra el medicamento. Esto hace que las formulaciones líquidas de G-CSF, según la presente invención, sean adecuadas y ventajosas para el uso en jeringas listas para su uso y kits provistos con las mismas, en particular para el uso doméstico.

50 [0016] Las formulaciones líquidas, según la presente invención, tienen además la ventaja de estar, preferiblemente, libres de excipientes de tipo proteico o polimérico, el uso de los cuales puede ser problemático desde un punto de vista médico. Tal como se muestra mediante los estudios clínicos mostrados en los ejemplos, presentan además la ventaja de ser aceptables y aplicables de una manera sustancialmente libre de dolor. Además, la formulación líquida de G-CSF, según la presente invención, está preferiblemente libre de aminoácidos y/o proteínas adicionales, tales como albúmina de suero. En una realización, la formulación líquida, según la presente invención, está libre de metionina.

60 [0017] Una ventaja adicional que se ha encontrado en los experimentos bioquímicos y estudios clínicos es que, debido a la selección de la sustancia tampón en un intervalo específico de concentración y la presencia de alcohol de azúcar, por un lado, son suficientes cantidades pequeñas de tensoactivo de aproximadamente 0,05 a 0,06 mg/ml para estabilizar el G-CSF y, por otro lado, no desencadenan irritaciones sustanciales de la piel u otras incompatibilidades en el paciente. Esto es particularmente ventajoso en dichas formas de medicamento líquidas que están destinadas a la aplicación subcutánea de G-CSF. Además, mediante las mediciones según la presente invención, las moléculas de G-CSF no glicosiladas particularmente lábiles se estabilizan de manera suficiente para preparaciones farmacéuticas. La selección dirigida de excipientes en general proporciona formas de dosificación líquida que contienen G-CSF muy aceptables que son preparaciones de alta calidad en cuanto a la estabilidad de la proteína y son particularmente adecuadas como soluciones de inyección o infusión listas para usar.

[0018] En las formulaciones líquidas, según la presente invención, se utilizarán cantidades de tensioactivo en el intervalo de 0,05 a 0,06 mg/ml, particularmente preferente 0,06 mg/ml. El tensioactivo a utilizar es polisorbato 80, también conocido como Tween 80®.

[0019] Las formas de medicamento que contienen G-CSF, según la presente invención, contienen el agente en una cantidad que es suficiente para conseguir un efecto terapéutico. Normalmente, se utilizan concentraciones del agente que varían de 0,01 a 5 mg/ml, preferiblemente de 0,1 a 1 mg/ml, 0,3 a 0,8 mg/ml, y se utiliza particularmente de manera preferida una concentración de aproximadamente 0,6 mg/ml. En particular, en el caso de una administración subcutánea, resultan particularmente preferibles dosis de 0,3 mg/0,5 ml y 0,48 mg/0,8 ml.

[0020] Según la presente invención, se utiliza ácido acético como sustancia tampón. En la preparación de la formulación líquida, según la presente invención, la sustancia tampón se dispone en forma de su ácido libre. El valor de pH deseado de la solución se ajusta mediante la adición de bases, tales como, por ejemplo, hidróxidos de metales alcalinos, hidróxidos de metales alcalinotérreos o hidróxido de amonio. Para este objetivo, se prefiere el uso del hidróxido de sodio.

[0021] Las concentraciones de la sustancia tampón de ácido acético en forma de medicamento líquido listo para usar varían de aproximadamente 5 a 20 mmol/l; por simplicidad, en lo sucesivo se hará referencia a las concentraciones de aniones de dicho ácido, es decir, acetato, en el que el término acetato también comprenderá el ácido acético no disociado. Preferiblemente, se utilizan las siguientes concentraciones de tampón y valores de pH: 7,5 a 15 mM, particularmente preferiblemente acetato 10 mM y pH de 4,15 a 4,3; y en particular pH 4,2.

[0022] El G-CSF utilizado en las formulaciones líquidas, según la presente invención, se refiere básicamente a todas las moléculas de G-CSF producidas mediante métodos recombinantes, así como variaciones de los mismos. El término G-CSF o variante de G-CSF, según la presente invención, incluye todas las variantes naturales de G-CSF, así como proteínas de G-CSF derivadas de los mismos y proteínas de G-CSF modificadas mediante tecnología de ADN recombinante, en particular proteínas de fusión que también contienen otras secuencias de proteínas, además de la parte de G-CSF. Particularmente preferida en este sentido es una muteína de G-CSF con un residuo de Met N-terminal en la posición -1, que se genera mediante la expresión en células procariontas. También es adecuada una variante de G-CSF recombinante libre de metionina que se puede producir según el documento WO91/11520. Se entiende que el término "variante de G-CSF" indica dichas moléculas de G-CSF en las que uno o más aminoácidos pueden estar eliminados o sustituidos por otros aminoácidos, en las que se mantienen en gran medida las características sustanciales de G-CSF. Las muteínas de G-CSF adecuadas se describen, por ejemplo, en el documento EP 0456200. De manera particularmente preferida, el G-CSF que está presente en las formulaciones líquidas, según la presente invención, no está glicosilado.

[0023] Para la preparación de formas de medicamentos parenterales aceptables, es apropiada la adición de excipientes isotonzantes, a menos que la isotonicidad se pueda ya conseguir con las propiedades osmóticas del agente y de los excipientes empleados para la estabilización. Para este fin, se utilizan particularmente excipientes aceptables no ionizados, tales como, por ejemplo, manitol, glicerol u otros alcoholes de azúcar. En el caso del G-CSF, se prefiere el uso de sorbitol, que es particularmente ventajoso para la aceptabilidad de las formulaciones líquidas, según la presente invención. Preferiblemente, el alcohol de azúcar está presente en la formulación líquida en una concentración que varía de aproximadamente 2,5 a 7,5% (p/v), de manera particularmente preferida a una concentración de aproximadamente 5% (p/v).

[0024] La adición de sales para ajustar la isotonicidad no es ventajosa, ya que altas concentraciones de sal o iones aumentan la formación de agregados de G-CSF. Por lo tanto, las sales se añaden ventajosamente en pequeñas cantidades. Las concentraciones de tampón se miden de manera que se logra el efecto estabilizante del pH, mientras que la fuerza iónica se mantiene al nivel más bajo posible. Las concentraciones de tampón están preferiblemente en el intervalo de hasta 20 mmol, en particular menos de 15 mmol.

[0025] Además, las soluciones de inyección listas para usar pueden contener excipientes o aditivos convencionales adicionales. Se pueden añadir antioxidantes, tales como, por ejemplo, glutatión, ácido ascórbico o sustancias similares, excipientes caotrópicos, tales como, por ejemplo, urea o aminoácidos, tales como, por ejemplo, metionina, arginina, lisina, ornitina y similares.

[0026] En una realización particularmente preferida, la formulación líquida acuosa de G-CSF, según la presente invención, se prepara en forma de una solución para inyección o infusión, y consiste esencialmente de metionil-G-CSF no glicosilado humano en una concentración de aproximadamente 0,6 mg/ml y sorbitol en una concentración de aproximadamente el 5% (p/v), polisorbato 80 en una concentración de aproximadamente 0,06 mg/ml, y acetato en una concentración de aproximadamente 10 mM como sustancia tampón a un valor de pH de aproximadamente 4,2.

[0027] En otros aspectos y con la misma intensidad de dosificación, las formulaciones líquidas de G-CSF, según la presente invención, se pueden usar de acuerdo con la información del producto Neupogen®, en particular con respecto a la dosificación, administración e indicaciones médicas, ya que el uso de proteína de G-CSF no glicosilada altamente

purificada, tal como filgrastim, que se produce en una cepa de laboratorio de *E. coli* K12, también es preferido en formulaciones líquidas según la presente invención.

[0028] Las formulaciones líquidas, según la presente invención, se utilizan como medicamento para el tratamiento de enfermedades para las que se sabe que son tratables mediante la administración de G-CSF, tales como el cáncer, efectos secundarios adversos causados por quimioterapia citotóxica, terapia acompañante de enfermedades, en la que se requiere una movilización de células precursoras de sangre periférica, neutropenia crónica severa (SCN), infección por VIH, y similares. Por consiguiente, la presente invención se refiere a medicamentos que comprenden una de las formulaciones líquidas de G-CSF descritas anteriormente.

[0029] En una realización, la composición de G-CSF, según la presente invención, está destinada a la preparación de un medicamento para el tratamiento de indicaciones neurológicas, tales como daños en el sistema nervioso central, por ejemplo, posteriormente a un accidente cerebrovascular agudo, en el que los daños secundarios severos se pueden aliviar o prevenir mediante la administración temprana, por ejemplo, en forma de bolo. En otros aspectos, las formulaciones líquidas, según la presente invención, se proporcionan como medicamento, preferiblemente para la administración subcutánea o intravenosa, por ejemplo, mediante inyección con jeringas precargadas o mediante infusión, en el caso que sea deseable una administración continua a largo plazo de G-CSF.

[0030] Tal como ya se ha explicado anteriormente, la formulación líquida G-CSF, según la presente invención, es estable durante un largo periodo de tiempo y se puede almacenar básicamente en cualquier receptáculo adecuado. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un receptáculo que contiene una de las formulaciones líquidas de G-CSF descritas anteriormente o en los ejemplos. Preferiblemente, al menos una superficie del receptáculo que está en contacto con la formulación líquida está recubierta con un material que consiste en silicona, politetrafluoroetileno o etileno-tetrafluoroetileno (ETFE). Habitualmente, el receptáculo es un recipiente que normalmente está destinado al almacenamiento y/o administración de un medicamento líquido, tal como un vial, jeringa, ampolla, carpule o recipiente de infusión, en el que la formulación líquida de G-CSF, según la presente invención, es particularmente ventajosa para el uso en jeringas y ampollas listas para usar. En una realización preferida, la formulación líquida está presente en la jeringa o en la ampolla en una concentración, en términos de concentración de G-CSF, de 0,3 mg en 0,5 ml ó 0,48 mg en 0,8 ml.

[0031] Dado que se pueden omitir de manera ventajosa excipientes adicionales de mezcla o la realización de medidas preparatorias adicionales, tales como filtración, mezcla, etc., antes de la administración de la formulación líquida de G-CSF, según la presente invención, el medicamento líquido de G-CSF, según la presente invención, se puede preparar para la administración inmediata, por ejemplo, en un kit.

[0032] En una realización que es particularmente ventajosa para médicos, farmacéuticos y especialmente pacientes, la presente invención se refiere también, por tanto, a un kit para la administración parenteral de G-CSF, que comprende uno o más de los receptáculos descritos anteriormente, preferiblemente junto con instrucciones para el almacenamiento y/o administración. Normalmente, se proporcionará la administración de G-CSF en una dosis de 5 a 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, en la que se pueden indicar dosis superiores o inferiores, aunque dependiendo de la indicación médica y la fase de la enfermedad.

[0033] Preferiblemente, se disponen 5 jeringas o ampollas en el kit, según la presente invención, opcionalmente más, tales como 7 jeringas o ampollas, por ejemplo en el caso de que la administración diaria pretenda durar una semana.

[0034] Por razones de seguridad en la manipulación, el kit, según la presente invención, tiene ventajosamente compartimentos de seguridad para jeringas y para agujas de inyección y/o infusión, respectivamente. Aquí, también deben considerarse ayudantes de descarga para las cánulas y tapones de sellado preparados o preajustados.

[0035] Tal como se describe en los ejemplos, las formulaciones líquidas de G-CSF, según la presente invención, son estables durante un largo periodo de tiempo, en particular a aproximadamente 5°C, preferiblemente durante un periodo de al menos 4 semanas. Por lo tanto, las formulaciones líquidas, receptáculos y kits, según la presente invención, se pueden almacenar ventajosamente en un frigorífico convencional.

[0036] Las técnicas para realizar la presente invención son conocidas por el experto en la materia y se describen en la bibliografía relevante, véase por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed, ed por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds, Academic Press, London, 1987.); *Handbook of Experimental Immunology*, volúmenes I-IV (DM Weir y CC Blackwell, eds., 1986).

Ejemplo

[0037] A continuación, se ilustra adicionalmente la presente invención mediante una realización preferida, que, sin embargo, no pretende limitar de ningún modo el objetivo de la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de las formulaciones líquidas de G-CSF

[0038] Las soluciones de G-CSF utilizadas en los ejemplos se prepararon mediante la disolución de los excipientes descritos anteriormente en agua para inyección, la adición de las cantidades indicadas de G-CSF y, si es necesario, el ajuste exacto del valor del pH hasta el valor deseado usando una pequeña cantidad de componente tampón.

5

[0039] En la preparación de la formulación de G-CSF, según la presente invención, debe indicarse que para ajustar el tampón de acetato es necesario proporcionar inicialmente ácido acético y ajustar posteriormente el valor de pH con una solución de NaOH, como resulta en el proceso de experimentos realizados previamente de que el uso de acetato de sodio con el posterior ajuste del valor de pH utilizando HCl podría dar lugar a la formación de agregados de proteínas, posiblemente debido a una concentración de iones incrementada.

10

Notación	Descripción de la composición	Valor inicial +5°C	1ª semana a +40°C	2ª semana a +40°C	4ª semana a +40°C	4ª semana a +5°C
		pH	pH	pH	pH	pH
I	ácido acético 10 mM, pH 4,1; sorbitol al 5%, polisorbato 80 al 0,004%	4,05	4,08	4,10	4,12	4,07
IIa	ácido acético 10 mM, pH 4,2; sorbitol al 5%, polisorbato 80 al 0,004%	4,23	4,24	4,24	4,25	4,23
IIb	ácido acético 10 mM, pH 4,3; sorbitol al 5%, polisorbato 80 al 0,004%	4,33	4,35	4,34	4,36	4,33
IIc	ácido acético 10 mM, pH 4,4; sorbitol al 5%, polisorbato 80 al 0,004%	4,43	4,45	4,43	4,47	4,43
IIIa	ácido acético 10 mM, pH 4,2; sorbitol al 5%, polisorbato 80 al 0,006%	4,24	4,24	4,24	4,27	4,23
IIIb	ácido acético 10 mM, pH 4,3; sorbitol al 5%, polisorbato 80 al 0,006%	4,34	4,35	4,35	4,37	4,33
IIIc	ácido acético 10 mM, pH 4,4; sorbitol al 5%, polisorbato 80 al 0,006%	4,43	4,43	4,43	4,47	4,43

IVa	ácido acético 10 mM, pH 4,2; sorbitol al 5%, polisorbato 80 al 0,008%	4,21	4,24	4,22	4,25	4,21
IVb	ácido acético 10 mM, pH 4,3; sorbitol al 5%, polisorbato 80 al 0,008%	4,33	4,33	4,34	4,36	4,31
IVc	ácido acético 10 mM, pH 4,4; sorbitol al 5%, polisorbato 80 al 0,008%	4,43	4,45	4,43	4,45	4,41

Tabla 1: Valores de pH en formulaciones líquidas que tienen una intensidad de dosis de 30 MIU, 0,6 mg/ml, 0,5 ml/ampolla durante el almacenamiento durante 4 semanas a +40°C y +5°C.

15

[0040] Las soluciones se filtran posteriormente a través de filtros de membrana esterilizada adecuados con un ancho de poro de 0,2 m, se rellenan viales de inyección de vidrio esterilizados de clase I hidrolítica y se sellan con tapones de caucho teflonado esterilizados. El relleno se lleva a cabo preferiblemente en atmósfera de nitrógeno.

Ejemplo 2: Estabilidad bioquímica de las formulaciones de G-CSF de la presente invención

20

5 [0041] Las preparaciones experimentales de G-CSF se almacenan en viales sellados y corrugados bajo ausencia de luz a temperaturas de almacenamiento definidas y posteriormente se analizan la pureza de la proteína y la aparición de formas oxidadas, agregados y dímeros utilizando técnicas estándar, tales como espectroscopía de UV, HPLC de fase inversa con fase estacionaria C4 y C18, o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC HPLC), enfoque isoeléctrico, SDS-PAGE en condiciones reductoras con tiol y condiciones no reductoras con la posterior tinción con plata y análisis de inmunotransferencia Western; para información sobre las técnicas mencionadas, véase, por ejemplo, los ejemplos del documento WO94/14466.

10 [0042] Las formulaciones líquidas de G-CSF tal como se especifican en la tabla 1 de ejemplo 1 se analizaron por su estabilidad a largo plazo, tal como se indica. Para las formulaciones con un contenido de tensioactivo superior a 0,006% sólo se indica la formulación con 0,008% a modo de ejemplo, ya que las formulaciones con un contenido superior de tensioactivo muestran una estabilidad a largo plazo incluso sustancialmente peor. En experimentos con respecto a la estabilidad bioquímica de G-CSF en las composiciones experimentales, resultó que con el uso de concentraciones de tensioactivo superiores de hasta e incluyendo un contenido del 0,008%, se pudo observar una acumulación de la forma oxidada de G-CSF en grandes cantidades. Por lo tanto, se evaluó en los experimentos realizados en el alcance de la presente invención, a diferencia de las enseñanzas de la solicitud internacional WO 94/14466, que ya una concentración de tensioactivo inferior, pero en cualquier caso una concentración de tensioactivo elevada, influye de manera negativa en el perfil de oxidación de G-CSF en solución.

20 [0043] Además, se determinó que las formulaciones de G-CSF de la presente invención, tal como se especifica en la tabla 1, se caracterizan porque el contenido relativo de especies oxidadas está por debajo del 1%, mientras que este valor umbral se superaba en las muestras de control con un contenido de tensioactivo del 0,008% y más, lo cual conduce a la conclusión de que dichas soluciones no se pueden considerar como medicamentos candidatos.

25 [0044] Otros estudios sobre la estabilidad bioquímica de G-CSF en las composiciones experimentales mostraron que las formulaciones según la presente invención son capaces de prevenir sustancialmente la agregación y la oxidación de G-CSF sin la necesidad de añadir adicionalmente excipientes, tales como aminoácidos y/o antioxidantes.

30 Ejemplo 3: Aceptabilidad de las formulaciones de G-CSF

[0045] Una de las formulaciones líquidas según la presente invención se analizó en tres ensayos clínicos de fase III en pacientes con cáncer, en los que, entre otras cosas, se examinaron las reacciones de los pacientes al sitio de inyección. Se realizó un examen de la hinchazón, enrojecimiento, sangrado de la piel, sensibilidad a la presión y otros síntomas que aparecen en el sitio de inyección. Para los ensayos clínicos, se seleccionó la formulación de G-CSF de la presente invención según las indicaciones de preparación IIa (XM02) en la Tabla 1 y se procesó con una dosis de 5 µg/kg de peso corporal por día.

40 [0046] En el transcurso de estos exámenes, resultó, afortunadamente, que, de un total de 356 pacientes, sólo un paciente informó de reacciones adversas, es decir, en sólo el 0,3% de los casos. En los experimentos de control realizados con la formulaciones de C-GSF de Neupogen® disponible comercialmente se pudo demostrar que la formulación de G-CSF de la presente invención muestra una aceptabilidad que se mejora en un factor 4 con respecto a los efectos secundarios en los sitios de inyección en los pacientes. Estos resultados se resumen en la siguiente tabla.

Medicamento	pH	Número total	Positivo	% Positivos
XM02	4,2	356	1	0,3
Neupogen®	4,0	249	3	1,2
Placebo	7,0	72	0	0,0

45 **Tabla 2:** Frecuencia de las reacciones en el sitio de la inyección en tres estudios clínicos de fase III. Evaluación del primer ciclo de quimioterapia del cáncer de mama, linfoma no de Hodgkin y cáncer de pulmón.

50 [0047] Los exámenes mencionados anteriormente conducen al resultado de que mediante la combinación de ácido acético y acetato, respectivamente, como sustancia tampón y un tensioactivo, tal como polisorbato 80, cada uno a una concentración específica, y en presencia de un alcohol de azúcar, tal como sorbitol y, con el ajuste del valor de pH a aproximadamente $4,2 \pm 0,15$, se obtiene una formulación líquida estable de G-CSF, que transmite a las moléculas de G-CSF la estabilidad requerida para su idoneidad como medicamento, es tolerable y adicionalmente permite una prevención casi completa de los síntomas que se pueden observar a menudo en el sitio de inyección cuando se administra el medicamento. Esto hace que las formulaciones líquidas de G-CSF, según la presente invención, y los kits proporcionados con las mismas, respectivamente, sean particularmente adecuados y ventajosos para utilizar en jeringas listas para usar y kits proporcionados con las mismas, en particular para uso doméstico.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Medicamento para usar en el tratamiento de cáncer, neutropenia crónica severa (SCN), infección por VIH, daño del sistema nervioso central o de los efectos secundarios adversos debido a quimioterapia citotóxica que comprende una formulación líquida acuosa de G-CSF, que consiste sustancialmente en G-CSF y un alcohol de azúcar, polisorbato 80 a una concentración de 0,05-0,06 mg/ml, acetato a una concentración de 5-20 mM como sustancia tampón a pH de 4,15-4,3, y opcionalmente, aminoácidos y/o glicerol y/o carbohidratos y/o conservantes, en la que se añade acetato en forma de su ácido acético y el pH se ajusta con NaOH.
- 10 2. Medicamento, según la reivindicación 1, en el que el G-CSF no está glicosilado.
3. Medicamento, según la reivindicación 1 ó 2, en el que el G-CSF está presente a una concentración de 0,6 mg/ml.
- 15 4. Medicamento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el alcohol de azúcar es sorbitol.
5. Medicamento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el alcohol de azúcar está presente a una concentración del 5% (p/v).
- 20 6. Medicamento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el acetato está presente a una concentración de 10 mM.
7. Medicamento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que está sustancialmente libre de aminoácidos y/o proteína adicional.
- 25 8. Medicamento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es una solución para inyección o infusión.
9. Medicamento, según la reivindicación 1, como solución para inyección o infusión, en el que el G-CSF es metionil-G-CSF no glicosilado humano y está presente a una concentración de 0,6 mg/ml, el alcohol de azúcar es sorbitol y está presente a una concentración del 5% (p/v), el tensioactivo es polisorbato 80 y el acetato está presente como sustancia tampón a una concentración de 10 mM.
- 30 10. Receptáculo para la administración de medicamentos líquidos, que comprende una formulación de medicamento líquido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 35 11. Receptáculo, según la reivindicación 10, en el que al menos una superficie de dicho receptáculo, que está en contacto con la formulación líquida, está recubierta con un material que consiste en silicona o politetrafluoroetileno o un copolímero de etileno-tetrafluoroetileno (EFTE).
- 40 12. Receptáculo, según la reivindicación 10 ó 11, que es una jeringa, una ampolla, un carpule o un recipiente para infusión.
13. Jeringa o ampolla, según la reivindicación 12, en las que la formulación líquida está presente, en relación con la concentración de G-CSF, a una concentración de 0,3 mg en 0,5 ml ó 0,48 mg en 0,8 ml.
- 45 14. Kit para la administración parenteral de G-CSF, que comprende un receptáculo, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, así como las instrucciones para el almacenamiento y/o la administración.
15. Kit, según la reivindicación 14, en el que la administración de G-CSF se dispone en una dosis de 5-30 µg/kg de peso corporal.
- 50 16. Kit, según la reivindicación 14 ó 15, en el que se disponen 5 jeringas o ampollas en dicho kit.
17. Kit, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que se disponen compartimentos de seguridad para jeringas o agujas de inyección y/o infusión.
- 55 18. Kit, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que el almacenamiento está previsto a 5°C.