

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 334**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/08** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2011 E 11726819 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2585044**

54 Título: **Almacenamiento a largo plazo de G-CSF humano recombinante no glicosilado**

30 Prioridad:

**01.07.2010 US 360562 P**

**22.06.2010 EP 10166915**

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

**21.04.2015**

73 Titular/es:

**SANDOZ AG (100.0%)**

**Lichtstrasse 35**

**4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**GRAUMANN, KLAUS;**

**LERCH, HELMUT y**

**LAUBER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 534 334 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

Almacenamiento a largo plazo de G-CSF humano recombinante no glicosilado

La presente invención se refiere a un método para el almacenamiento a largo plazo de G-CSF humano recombinante no glicosilado.

5 El G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos, por sus siglas en inglés) es un factor de crecimiento natural que pertenece a la familia de las citocinas. El G-CSF representa un papel crucial en la hematopoyesis y mejora la maduración, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de los neutrófilos y las células sucesoras neutrofilicas. Clínicamente, el G-CSF se usa principalmente para controlar tumores y, en particular, para el tratamiento de la neutropenia después de la quimioterapia, y también se aplica para trasplantes de médula ósea y en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

10 El G-CSF humano en su forma natural es una glicoproteína de aproximadamente 20 kDa que tiene cinco residuos de cisteína. Cuatro de estos residuos forman dos puentes de disulfuro intramoleculares que son cruciales para la actividad de la proteína. Como el G-CSF se obtiene sólo en pequeñas cantidades de fuentes naturales, se usan principalmente formas recombinantes de G-CSF en los medicamentos, en particular los que se han producido expresando la proteína en huéspedes procarióticos. Las proteínas expresadas en huéspedes procarióticos tales como *E. coli* difieren del G-CSF natural en que no están glicosiladas. Las proteínas expresadas en *E. coli* tienen un residuo de metionina N-terminal adicional necesario para la expresión en este organismo huésped.

15 Debido a la alta hidrofobia de la proteína, el G-CSF recombinante no glicosilado es relativamente inestable. La molécula se adsorbe fácilmente a la superficie interna de los recipientes de almacenamiento, los viales, las jeringas o similares y forma dímeros y agregados superiores. Las formulaciones de G-CSF líquidas convencionales también son sensibles al estrés mecánico, por ejemplo como resultado de la agitación durante el transporte, y a la congelación y descongelación accidentales, que también pueden dar como resultado niveles superiores de agregados y una pérdida de actividad biológica. Por otra parte, el G-CSF está sometido a modificaciones químicas tales como desamidación, oxidación, escisión de puentes de disulfuro o proteólisis. La desamidación, que se produce más rápidamente que otras rutas de degradación, es un problema particular debido al alto contenido de glutamina del G-CSF. En conjunto, esto puede dar como resultado un contenido reducido de G-CSF monómero biológicamente disponible y activo, particularmente durante el almacenamiento prolongado de la proteína. Esto no sólo es costoso sino que también es indeseable por razones terapéuticas, por ejemplo si el G-CSF se va a administrar a lo largo de un período de tiempo prolongado con una dosificación constante. Por otra parte, los productos formados mediante multimerización o desamidación pueden dar como resultado una respuesta inmunitaria no deseada.

20 La estabilización de formulaciones de G-CSF es objeto de diversa bibliografía de patentes y no relacionada con las patentes.

25 El documento DE-A-37 23 7S1 describe formulaciones acuosas de G-CSF tamponadas con fosfato que contienen tensioactivos farmacéuticamente aceptables tales como ésteres de polioxietilensorbitán que se usan en combinación con albúmina de suero humano y manitol para estabilizar el ingrediente activo. Estas formulaciones son estables a 4°C a lo largo de un período de tiempo prolongado. Sin embargo, debido a sus propiedades antigénicas, las proteínas y los péptidos de origen humano y animal pueden provocar reacciones inmunológicas no deseadas.

30 El documento EP-A-0 373 679 divulga formulaciones de G-CSF que tienen un valor del pH de 2,75 a 4,0 y baja conductividad, que se pueden almacenar a lo largo de períodos de tiempo prolongados sin formación de agregados. Si existe, el tampón se usa en estas formulaciones en cantidades pequeñas de menos de 2 mM a fin de evitar la agregación del G-CSF.

35 El documento EP-A-1 197 221 divulga formulaciones de G-CSF estables a largo plazo a un pH de 5 a 7, que contienen uno o más aminoácidos del grupo de lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, treonina y asparagina, así como uno o más aminoácidos hidrófobos. La metionina se añade para prevenir la oxidación de los residuos de metionina de la molécula de G-CSF.

40 El documento WO-A-2007/034509 divulga formulaciones acuosas estables que contienen G-CSF humano recombinante y un aminoácido que es un supresor de la oxidación para los residuos de metionina de la proteína.

45 El documento WO-A-2005/042024 divulga composiciones farmacéuticas que comprenden G-CSF y un ácido tal como ácido acético o ácido glutámico, que está libre de tensioactivos.

50 El documento WO-A-2005/039620 divulga composiciones tamponadas con succinato y tartrato estables a lo largo de un amplio intervalo de pH.

55 Herman, A.C. et al. ("Characterisation, Formulation, and Stability of Neupogen® (Filgrastim), a Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor". En: Formulation Characterisation and Stability of Protein Drugs, pp. 303-32S, R. Pearlman y Y.J. Wang, Eds., Plenum Press, Nueva York, 1996) describen composiciones estabilizadas de

5 G-CSF recombinante no glicosilado que contienen 10 mM de acetato sódico, pH 4,0, 5% de manitol y 0,004% de polisorbato 80. Tales composiciones son estables durante más de 24 meses a 2-8°C. Se encontró que sustituir el manitol por sorbitol en una formulación de filgrastim eliminaba la sensibilidad de la proteína a la agregación durante la congelación y la descongelación accidentales. Sin embargo, el almacenamiento en un congelador se debe evitar según las instrucciones del fabricante.

El documento WO-A-2007/099145 divulga formulaciones líquidas de G-CSF tamponadas con acetato que comprenden polisorbato 20 y/o polisorbato 80 como un tensioactivo y que tienen un valor del pH entre 4,1 y 4,4

10 El documento WO-A-2008/122415 divulga formulaciones líquidas acuosas de G-CSF tamponadas con glutamato que tienen un pH de 3,5 a 4,8 y que son estables bajo las condiciones de estrés mecánico encontradas, por ejemplo, al congelar y descongelar.

El documento WO-A-2009/027076 divulga formulaciones de G-CSF tamponadas con acetato que comprenden un alcohol sacárico tal como sorbitol y un tensioactivo. La estabilidad al almacenamiento de estas formulaciones se prueba a 5°C y 40°C.

15 El documento US 6.956.023 B1 divulga un método para reducir la intolerancia alimentaria en un lactante administrando enteralmente G-CSF al lactante. La formulación acuosa de G-CSF descrita comprende filgrastim, cloruro sódico, acetato sódico, cloruro potásico y albúmina humana. El sorbitol se menciona como un excipiente opcional. La formulación líquida es estable cuando se almacena durante tres semanas a -80°C.

20 Piedmonte et al. (Pharmaceutical Research, Vol. 24, N° 1, enero de 2007, pp: 136-146) describen el efecto del sorbitol sobre la agregación de proteínas en formulaciones de proteínas congeladas. Piedmonte y Treuheit (Advanced Drug Delivery Reviews 60, 2008, 50-58) menciona la importancia del sorbitol y un pH adecuado para la estabilidad de formulaciones acuosas de pegfilgrastim.

25 El objetivo de la presente invención era proporcionar un método para el almacenamiento estable a largo plazo de G-CSF humano recombinante no glicosilado biológicamente activo, en donde se reduce la degradación, en particular la desamidación, y la pérdida de G-CSF durante el almacenamiento debido a fenómenos de adsorción a las paredes de los recipientes.

Este objetivo se consigue mediante el método de la presente invención para el almacenamiento estable a largo plazo de G-CSF humano recombinante no glicosilado, comprendiendo dicho método las etapas de:

30 (a) proporcionar una composición acuosa de G-CSF tamponada con acetato o glutamato que contiene un G-CSF humano recombinante no glicosilado y sorbitol, en donde la cantidad de G-CSF está en el intervalo de 0,1 mg/ml a 8,0 mg/ml y en donde dicha composición tiene un volumen de 100 ml a 8 l;

(b) enfriar la composición de G-CSF proporcionada en la etapa (a) hasta una temperatura de -15°C o menos para obtener una composición de G-CSF congelada;

(c) almacenar la composición de G-CSF obtenida en la etapa (b) en estado congelado a lo largo de un período de al menos un mes; y

35 (d) incrementar la temperatura de la composición de G-CSF congelada de la etapa (c) hasta una temperatura dentro del intervalo de 2°C a 8°C a lo largo de un período de tiempo ajustado para permitir que la composición se descongele y para obtener una composición líquida que tenga un contenido de G-CSF de al menos 95% del contenido de G-CSF de la composición proporcionada en la etapa (a).

40 La presente invención se refiere además a un método para proporcionar una composición farmacéutica de G-CSF humano recombinante no glicosilado, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) formular G-CSF humano recombinante no glicosilado con un tampón de acetato o glutamato y sorbitol para obtener una composición acuosa tamponada de G-CSF, en donde la cantidad de G-CSF está en el intervalo de 0,1 mg/ml a 8,0 mg/ml y en donde dicha composición tiene un volumen de 100 ml a 8 l;

45 (b) enfriar la composición de G-CSF de la etapa (a) hasta una temperatura de -15°C o menos para obtener una composición de G-CSF congelada;

(c) almacenar la composición de G-CSF obtenida en la etapa (b) en estado congelado a lo largo de un período de al menos un mes;

50 (d) incrementar la temperatura de la composición de G-CSF congelada de la etapa (c) hasta una temperatura dentro del intervalo de 2°C a 8°C a lo largo de un período de tiempo ajustado para permitir que la composición se descongele y para obtener una composición líquida que tenga un contenido de G-CSF de al menos 95% del contenido de G-CSF de la composición proporcionada en la etapa (a); y

(e) cargar la composición líquida obtenida en la etapa (d) en envases primarios para uso parenteral.

En el curso de la invención se ha encontrado que mediante el método de la invención la desamidación y la pérdida de G-CSF humano recombinante no glicosilado se pueden reducir considerablemente o incluso evitar, aunque el G-CSF se proporcione en altas concentraciones y en grandes volúmenes y sin el uso de tensioactivos. De este modo, la actividad se mantiene incluso con un almacenamiento prolongado. Por otra parte, como las composiciones de G-CSF se pueden almacenar en estado congelado, no son sensibles al estrés mecánico que pueden experimentar, por ejemplo, durante el transporte.

La Fig. 1 muestra una comparación de productos de desamidación observados con muestras de filgrastim sometidas al método de la invención (carriles 1 y 2) y muestras de filgrastim almacenadas a una temperatura de 25°C (carriles 3 y 4) según se determinaba mediante enfoque isoelectrico (IEF, por sus siglas en inglés).

La proteína de G-CSF humano recombinante no glicosilado usada en las composiciones de la presente invención (en lo siguiente también denominada G-CSF) puede ser cualquier proteína que comprenda la secuencia de aminoácidos no glicosilada del G-CSF humano y que tenga su actividad biológica. El G-CSF humano recombinante no glicosilado se obtiene típicamente expresando el gen de G-CSF humano en un huésped procariótico tal como *E. coli*. El G-CSF humano recombinante no glicosilado expresado en *E. coli* tiene típicamente un residuo de Met N-terminal. En una realización preferida de la invención, el G-CSF humano comprende o tiene la estructura primaria del G-CSF humano más una metionina N-terminal (r-met HU G-CSF) según se indica en el Monográfico 6.3 de la Farmacopea Europea (01/2009:2206; "Filgrastim Concentrated Solution" página 4142) o en Herman, A.C. et al. (supra), es decir, la secuencia de aminoácidos de filgrastim, o es una de sus variantes que tiene esencialmente la actividad biológica del filgrastim, por ejemplo una variante que tiene extensiones N-terminales o C-terminales tales como proteínas de fusión, una variante en la que el residuo de metionina en el extremo N-terminal se ha reemplazado por otro aminoácido tal como glicina, o una variante que tiene mutaciones neutras en la secuencia de aminoácidos. Variantes de G-CSF útiles en las formulaciones de la presente invención se divulgan, p. ej., en el documento EP-A-0 456 200.

El sistema tamponador usado en las composiciones de G-CSF de la presente invención es un tampón de ácido acético/acetato o un tampón de ácido glutámico/glutamato. Preferiblemente, la composición usada en la invención está libre de otros agentes tamponadores. Los tampones usados según la invención se pueden preparar, por ejemplo, partiendo de ácido acético o glutámico y/o una de sus sales y ajustando el pH hasta el valor deseado usando el correspondiente ácido o base u otro ácido inorgánico u orgánico o base inorgánica adecuados tales como ácido clorhídrico o un hidróxido alcalino o hidróxido alcalinotérreo. Se prefieren sales de ácido acético o sales de ácido glutámico fisiológicamente aceptables, p. ej., sales alcalinas, alcalinotérreas o amónicas. Se prefieren las sales alcalinas o amónicas, en particular la sal monosódica. Preferiblemente, el tampón se prepara partiendo de ácido acético o ácido glutámico y el valor del pH se ajusta usando una base inorgánica adecuada, por ejemplo hidróxido sódico.

El valor del pH de la composición proporcionada en la etapa (a) del procedimiento de la invención está típicamente en el intervalo de 3,5 a 5,0, preferiblemente en el intervalo de 3,7 a 4,8. Más preferiblemente, el pH está en el intervalo de 3,7 a 4,6, por ejemplo de 4,0 a 4,6.

La concentración del tampón de acetato o glutamato se ajusta ventajosamente a fin de alcanzar un efecto estabilizador del pH al valor de pH deseado y una capacidad tamponadora suficiente. Habitualmente, el tampón de acetato o glutamato tiene una concentración de al menos 0,5 mM, preferiblemente de 1 a 100 mM y más preferiblemente de 2 a 80 mM. Concentraciones de tampón en el intervalo de 2 a 40 mM, en particular de 2 a 25 mM, por ejemplo de 5 a 15 mM y preferiblemente aproximadamente 10 mM, proporcionarán una estabilidad suficiente y serán suficientemente bajas para evitar reacciones no deseadas con los tejidos al inyectar la composición.

La concentración de G-CSF en la composición proporcionada en la etapa (a) del método de la invención dependerá del uso pretendido. El límite de concentración superior resulta de la solubilidad de G-CSF en el tampón. Según la invención, la concentración de G-CSF está en un intervalo de 0,1 a 8 mg/ml, preferiblemente de 0,25 a 6,5 mg/ml. En muestras analíticas o en composiciones farmacéuticas que se van a administrar sin dilución adicional, el G-CSF está presente en una cantidad que típicamente está en un intervalo de 0,1 a 2,0 mg/ml, preferiblemente hasta 2,5 mg/ml. En composiciones más concentradas, por ejemplo composiciones que contienen G-CSF como un producto intermedio del procedimiento, que se pueden procesar adicionalmente para obtener el producto farmacológico adecuado para la administración a un paciente, la concentración de G-CSF típicamente está en un intervalo de 2,5 mg/ml a 8,0 mg/ml, preferiblemente de 2,5 a 6,5 mg/ml, y más preferiblemente hasta 5,5 mg/ml.

La composición proporcionada en la etapa (a) del método de la invención comprende sorbitol como un modificador de la tonicidad. Preferiblemente, el sorbitol es el único modificador de la tonicidad usado en la composición, excepto por el sistema tamponador. Típicamente, el sorbitol está presente en una cantidad de hasta 200 mg/ml, preferiblemente de 10 a 100 mg/ml, más preferiblemente de 25 a 75 mg/ml, por ejemplo aproximadamente 50 mg/ml.

Las composiciones usadas en el método de la invención pueden o no comprender un tensioactivo. Si está presente un tensioactivo, el tensioactivo típicamente es un tensioactivo no iónico. Preferiblemente, el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en etoxilatos de alcohol graso, alquilpoliglicósidos, polioxialquilenos, polisorbatos

o mezclas de dos o más de los mismos. Se prefieren polioxialquilenos tales como copolímeros de bloques de polioxialquileno, por ejemplo poloxámero 188 (disponible bajo el nombre comercial Pluronic F68) y polisorbatos, es decir, ésteres de polioxietilensorbitán de ácidos grasos alifáticos. Los más preferidos son polisorbatos tales como monolaurato de polioxietilensorbitán (disponible bajo el nombre comercial Tween 20), monopalmitato de polioxietilensorbitán (Tween 40), monoestearato de polioxietilensorbitán (Tween 60), triestearato de polioxietilensorbitán (Tween 65), monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80) y trioleato de polioxietilensorbitán (Tween 85). Los más preferidos son el monolaurato de polioxietilensorbitán y el monooleato de polioxietilensorbitán.

Si se usa un tensioactivo, el tensioactivo está presente preferiblemente en una cantidad de 5 mg/ml o menos, preferiblemente 1 mg/ml o menos. Preferiblemente, los tensioactivos, en particular los polisorbatos, se usan en cantidades de 0,001 a 1,0 mg/ml, más preferiblemente de 0,01 a 0,5 mg/ml.

Aunque la composición proporcionada en la etapa (a) del método de la invención puede comprender agentes adicionales tales como aminoácidos, agentes reductores, antioxidantes y proteínas séricas, la composición consiste típicamente en G-CSF, el tampón acuoso de acetato o glutamato, sorbitol y, opcionalmente, un tensioactivo, y así está libre de otros agentes.

Las composiciones proporcionadas en la etapa (a) del método de la invención se pueden preparar de un modo conocido de por sí. Por ejemplo, las sustancias tamponadoras, es decir, ácido acético o ácido glutámico o una de sus sales, el sorbitol y, opcionalmente, otros aditivos tales como tensioactivos se disuelven en una cantidad adecuada de un disolvente acuoso, habitualmente agua. Si es necesario, el valor del pH se ajusta usando un ácido o una base adecuados según se describe anteriormente. Después de la esterilización, por ejemplo mediante filtración a través de un filtro estéril, el G-CSF se añade en la concentración deseada. Alternativamente y preferiblemente, la composición de G-CSF usada en la etapa (a) se obtiene como un lote a partir del procedimiento de producción con o sin retamponamiento.

La composición acuosa de G-CSF proporcionada en la etapa (a) del método de la invención tiene un volumen en el intervalo de 0,1 ml a 8 l, preferiblemente de 5 ml a 4 l, más preferiblemente de 10 ml a 2,0 l, y lo más preferiblemente de 100 ml a 1,5 l. La composición se proporciona en un recipiente adecuado tal como una bolsa de polietileno (PE), una botella de vidrio o una botella hecha de poli(tereftalato de etileno) (PET) con o sin glicol (PETG).

La carga de la composición al recipiente se lleva a cabo típicamente bajo condiciones estériles y preferiblemente usando un gas inerte tal como nitrógeno. Típicamente, los recipientes se cargan solo parcialmente con la composición y preferiblemente hasta un volumen de no más de 90%, rellenándose preferiblemente el espacio libre de los recipientes con el gas inerte.

La composición acuosa líquida de G-CSF de la presente invención proporcionada en el volumen deseado se enfría hasta una temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$  o menos hasta que se congela. Típicamente, las composiciones se enfrían hasta una temperatura de entre  $-15$  y  $-25^{\circ}\text{C}$ , por ejemplo aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$ , o se enfrían hasta una temperatura de entre  $-60^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ . El enfriamiento se puede efectuar, por ejemplo, en un congelador o una cámara frigorífica o sumergiendo en nitrógeno líquido los recipientes con la composición de G-CSF.

La composición de G-CSF congelada obtenida en la etapa (b) se almacena en estado fundido a la temperatura deseada de  $-15^{\circ}\text{C}$  o menos. Típicamente, la composición se almacena a la temperatura a la que se ha enfriado la composición, es decir, según se describe anteriormente, preferiblemente a una temperatura de entre  $-15$  y  $-25^{\circ}\text{C}$  o entre  $-60$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ , que es la temperatura estándar que se define para cámaras frigoríficas o congeladores de baja temperatura estándar. La composición de G-CSF congelada se almacena a lo largo de un período de al menos un mes, por ejemplo durante al menos tres meses o al menos seis meses. Se ha encontrado que la desamidación se reduce considerablemente durante el período de tiempo en el que la composición de G-CSF está almacenada en estado congelado (véanse el Ejemplo 4 y la Fig. 1).

Después del almacenamiento de la composición de G-CSF congelada en la etapa (c), la temperatura de la composición congelada se incrementa hasta una temperatura dentro del intervalo de  $2^{\circ}\text{C}$  a  $8^{\circ}\text{C}$  a lo largo de un período de tiempo ajustado para permitir que la composición se descongele y para obtener una composición líquida que tenga un contenido de G-CSF de al menos 95% del contenido de G-CSF de la composición proporcionada en la etapa (a).

El término "incrementar la temperatura hasta una temperatura dentro del intervalo de  $2^{\circ}\text{C}$  a  $8^{\circ}\text{C}$ " significa que la composición no se expone a una temperatura por encima de  $8^{\circ}\text{C}$ . Específicamente, según una realización de la invención, las composiciones congeladas se pueden calentar hasta una temperatura de entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$  incrementando gradualmente o linealmente la temperatura a lo largo de un período de tiempo prolongado. El período de tiempo prolongado necesario para descongelar la composición congelada y para obtener una composición líquida que tenga un contenido de G-CSF que sea al menos 95% del contenido de G-CSF de la composición originalmente proporcionada es típicamente al menos 6 h. Por ejemplo, en caso de que una composición se mantenga en estado congelado a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , la composición se puede calentar desde  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta  $+4^{\circ}\text{C}$  a lo largo de un período de 6 h con un incremento de temperatura por hora gradual o lineal de  $4^{\circ}\text{C}$ . Un gradiente de temperatura lineal se puede poner en práctica, por ejemplo, usando el sistema CryoPilot™ de Integrated Biosystems.

Según una realización preferida de la invención, la composición congelada se llevará inmediatamente hasta la temperatura deseada entre 2°C y 8°C y se mantendrá a continuación a esa temperatura durante un período de tiempo prolongado para permitir que la composición congelada se descongele y para obtener una composición líquida que tenga el contenido de G-CSF requerido. Típicamente, la composición congelada se transfiere hasta una cámara de refrigeración o un baño de agua ajustado hasta este intervalo de temperatura. En este caso, el período de tiempo durante el cual se mantiene esa temperatura depende, p. ej., del volumen de la composición de G-CSF congelada y la concentración de G-CSF en la composición. Como norma, el período de tiempo requerido para que una composición tenga un gran volumen, p. ej., 100 ml o más, y una alta concentración de G-CSF es mayor que para que una composición tenga un volumen pequeño, p. ej., por debajo de 100 ml, y una concentración baja de G-CSF. Asimismo, el período de tiempo requerido en una cámara de refrigeración es mayor que en un baño de agua. Generalmente, el período de tiempo requerido para obtener el alto contenido de G-CSF deseado es al menos 12 horas y típicamente el período de tiempo está en el intervalo de 12 a 72 horas. Por ejemplo, el tiempo requerido para que una composición tenga un volumen pequeño de menos de 100 ml generalmente está en el intervalo de 12 a 24 horas, mientras que el tiempo requerido para que una composición tenga un volumen grande de 100 ml o más, por ejemplo de 100 ml a 8 l, tal como 0,8 l, y/o una concentración de G-CSF alta, por ejemplo de 2,5 a 8 mg/ml, es típicamente 18 horas o más, por ejemplo de 24 a 48 horas en un baño de agua y 36 horas o más, por ejemplo de 36 a 72 horas, en una cámara de refrigeración. Volúmenes aún mayores pueden requerir tiempos proporcionalmente mayores.

En las composiciones líquidas obtenidas, el contenido de G-CSF es al menos 95%, preferiblemente al menos 97% y lo más preferiblemente al menos 99%, del contenido de G-CSF de la composición proporcionada en la etapa (a). Se entiende que el término "contenido de G-CSF" abarca G-CSF monomérico y sus multímeros así como proteínas relacionadas derivadas de los mismos tales como variantes desamidadas y oxidadas. El contenido de G-CSF se puede determinar, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) o mediante HPLC en fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés) según se describe en el Monográfico 6.3 de la Farmacopea Europea (01/2009:2206; "Filgrastim Concentrated Solution" páginas 4143-4144, en particular la página 4143: "Impurities with molecular masses higher than that of filgrastim. Size-exclusion chromatography (2.2.30)" y "Related proteins. Liquid chromatography (2.2.29)"). Aunque ambos métodos dan los mismos resultados, típicamente se usa RP-HPLC.

Usando el método de la invención, se mantiene esencialmente la potencia biológica del G-CSF recombinante obtenido en la etapa (d). Específicamente, la potencia biológica es al menos 90%, preferiblemente al menos 95% y más preferiblemente al menos 97%, 98% o 99% con relación a la potencia biológica del G-CSF proporcionado en la etapa (a). La actividad biológica se determina según se describe para el filgrastim en el Monográfico 6.3 de la Farmacopea Europea (01/2009:2206; "Filgrastim Concentrated Solution"; páginas 4142-4144, en particular la página 4144: ASSAY - "Potency"). En resumen, la potencia biológica de la composición obtenida en la etapa (d) se determina midiendo su capacidad para estimular la proliferación de células NFS-60 en comparación con la composición proporcionada en la etapa (a) calibrada en unidades internacionales como referencia. Para determinar el número de células viables, se puede cuantificar el ATP intracelular usando un sistema quimioluminiscente de luciferasa. La señal luminiscente medida es proporcional a la cantidad de ATP, que es directamente proporcional al número de células presente. La potencia relativa se puede calcular usando un método estadístico adecuado, por ejemplo el ensayo de líneas paralelas según el Monográfico 5.3 de la Farmacopea Europea, y se expresa en porcentaje de la composición obtenida en la etapa (d) en comparación con la composición de la etapa (a).

Después de la etapa (d), en particular en el método para proporcionar una composición farmacéutica de G-CSF humano recombinante no glicosilado, la composición líquida obtenida se puede cargar en envases primarios para uso parenteral tales como viales o jeringas. Ventajosamente, la composición líquidas se puede dividir en partes alícuotas adecuadas para la administración a un paciente, por ejemplo, mediante inyección o infusión, antes de la carga. Las soluciones concentradas de G-CSF se pueden diluir antes de la carga y, opcionalmente, el tampón de dilución también puede contener un tensioactivo y otros aditivos.

Las formulaciones de G-CSF obtenidas después del almacenamiento y la descongelación en las etapas (c) y (d) del método de la invención no muestran pérdida, o sólo muestran una pérdida menor, de proteína de G-CSF debida a adsorción, desamidación o agregación de la proteína. Según se describe anteriormente, la composición de G-CSF finalmente obtenida según el método de la invención tiene un contenido de G-CSF global de al menos 95% del contenido inicial de G-CSF. Estas composiciones, opcionalmente después de la dilución, se pueden usar como productos farmacéuticos en diversas formas de aplicación, por ejemplo preparaciones para inyección o infusión, en particular para la administración intravenosa, intramuscular o subcutánea. Los productos farmacéuticos obtenidos se pueden usar para cualquier indicación para la que se pueda emplear el G-CSF, tal como para el tratamiento de la neutropenia, para trasplantes de médula ósea y en el tratamiento de enfermedades infecciosas y de enfermedades tumorales.

La presente invención se ilustrará ahora con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos y a la Figura 1, que no están destinados a limitar la invención.

## Ejemplos

### Métodos

#### 1. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

5 El análisis de agregación por SEC se realizó según el método descrito en el Monográfico 6.3 de la Farmacopea Europea (01/2009:2206; "Filgrastim Concentrated Solution" página 4143: "Impurities with molecular masses higher than that of filgrastim. Size-exclusion chromatography (2,2.30)" ) excepto que se usó detección de fluorescencia. En resumen, se usó gel de sílice hidrófilo como una fase estacionaria a una temperatura de 30°C. La elución se llevó a cabo usando una solución de hidrogenocarbonato amónico tamponada con fosfato como una fase móvil a un caudal de 0,5 ml/min. La detección de la fluorescencia era a 345 nm y la excitación era a 280 nm. Los cromatogramas se  
10 cuantificaron, diferenciando los monómeros de G-CSF de agregados superiores como impurezas. Los resultados de los experimentos se expresan como porcentaje del área del pico (%).

#### 2. HPLC en fase inversa (RP)

15 Se determinaron el contenido de G-CSF y las impurezas (variantes desamidadas y oxidadas) en las muestras después de un almacenamiento a largo plazo usando RP-HPLC según el método descrito en el Monográfico 6.3 de la Farmacopea Europea (01/2009:2206; "Filgrastim Concentrated Solution", página 4143: "Related proteins. Liquid chromatography (2,2.29)" ) excepto que se usó detección de fluorescencia para la determinación de la pureza según se describe anteriormente. El contenido de proteína se determinó frente a un patrón de referencia de G-CSF mediante detección UV a 215 nm. Los resultados de los experimentos se expresan como porcentaje del área del pico (%).

#### 3. Enfoque isoeléctrico (IEF)

20 El análisis de las muestras después de congelar y descongelar con respecto a las impurezas con cargas diferentes a las del filgrastim se llevó a cabo mediante IEF según el método descrito en el Monográfico 6.3 de la Farmacopea Europea (01/2009:2206; "Filgrastim Concentrated Solution", página 4143: "Impurities with charges differing from that of filgrastim. Isoelectric focusing (2,2.54)" ) excepto que se usaron soluciones de referencia con una concentración inferior y tinción con plata para conseguir una sensibilidad superior.

### Ejemplo 1

Las siguientes composiciones acuosas, tamponadas con acetato o glutamato, de filgrastim como un G-CSF humano recombinante no glicosilado se prepararon como se muestra en la Tabla 1 posteriormente y se usaron en los siguientes experimentos:

30

Tabla 1

Composición	G-CSF (mg/ml)	Tampón (10 mM)	Sorbitol	pH
1	2,26	Acetato	50 mM	4,1
2	1,90	Glutamato	50 mM	4,4
3	3,10	Acetato	50 mM	4,5
4	3,30	Acetato	50 mM	4,5
5	1,98	Glutamato	50 mM	4,4
6	1,86	Glutamato	50 mM	4,4
7	1,70	Glutamato	50 mM	4,4
8	1,79	Glutamato	50 mM	4,4

Se definió que el contenido de G-CSF en mg/ml de cada composición era el valor de 100% en todos los experimentos siguientes.

### Ejemplo 2

35 Las composiciones 1 y 2 (30 ml en una bolsa de polietileno (PE)) se sometieron a congelación y descongelación bajo diversas condiciones usando el sistema CryoPilo™ de Integrated Biosystems. Se determinaron los porcentajes de agregados, oligómeros, dímeros y monómeros de G-CSF así como el contenido de G-CSF global usando SEC

según se describe en el Monográfico 6.3 de la Farmacopea Europea (01/2009:2206; "Filgrastim Concentrated Solution", página 4143: "Impurities with molecular masses higher than that of filgrastim. Size-exclusion chromatography (2.2.30)"). Todos los valores se determinaron antes de congelar (T0) y después de congelar y descongelar siguiendo las condiciones A, B y C. Los resultados y las condiciones de congelación/descongelación (C/D) se indican en la Tabla 2 posteriormente.

Tabla 2

Composición	Condiciones de C/D	Agregado (%)	Oligómeros (%)	Dímeros (%)	Monómeros (%)	Contenido de G-CSF (%)
1	T0	<0,1	<0,1	0,3	99,7	100,2
	A	<0,1	<0,1	0,4	99,6	85,0
	B	<0,1	<0,1	0,4	99,5	98,7
	C	<0,1	<0,1	0,4	99,5	102,9
2	T0	<0,1	<0,1	0,2	99,5	100,0
	A	<0,1	<0,1	0,3	99,7	74,3
	B	<0,1	<0,1	0,4	99,6	100,6
	C	<0,1	<0,1	0,4	99,6	100,8

Condiciones de C/D:

T0: Composiciones antes de la congelación

- 10 A: Las composiciones se enfriaron rápidamente hasta -20°C. Después del almacenamiento de las composiciones a esta temperatura durante 4 h, las composiciones congeladas se transfirieron inmediatamente hasta una temperatura de +20°C. Las composiciones se mantuvieron durante 2 h a esa temperatura y a continuación se llevaron hasta una temperatura de +4°C a la que se mantuvieron durante 12 h adicionales. Las composiciones se habían descongelado completamente después de 2 h a +20°C y 1 h a 4°C.
- 15 B: Las composiciones se enfriaron rápidamente desde +4°C hasta -20°C. Después del almacenamiento durante 4 h a esa temperatura, la temperatura se incrementó lentamente hasta una temperatura de +4°C a lo largo de un período de 7 h usando el gradiente de temperatura lineal CryoPilot™ programado.
- 20 C: Las composiciones se enfriaron desde +4°C hasta -20°C a lo largo de un período de 17 h usando el gradiente de temperatura lineal CryoPilot™ programado. Posteriormente, la temperatura se elevó lentamente hasta una temperatura de +4°C a lo largo de un período de 7 h usando un gradiente de temperatura programado del sistema CryoPilot™.

25 Los resultados muestran que la descongelación rápida bajo la condición A da como resultado una pérdida significativa del contenido de G-CSF, mientras que incrementar lentamente la temperatura de las composiciones congeladas como bajo las condiciones B y C desde -20°C hasta +4°C permite obtener composiciones líquidas que tienen un contenido de G-CSF comparable al contenido de G-CSF de la composición de G-CSF proporcionada originalmente. La velocidad de congelación no tiene efecto sobre el contenido de G-CSF final.

Ejemplo 3

30 Las composiciones 3 y 4 (3,5 ml en botellas de PETG de 5 ml) se sometieron a 5 ciclos de FIT consecutivos. En cada ciclo, las muestras se enfriaron desde +4°C hasta -20°C en un congelador y, después del almacenamiento durante 20 horas a -20°C, se transfirieron directamente hasta una cámara de refrigeración ajustada hasta una temperatura de +4°C. Las muestras se dejaron a esa temperatura durante un período de 16 h para descongelar y se dejó que las composiciones recuperaran su contenido original de G-CSF. El contenido de G-CSF y las impurezas se determinaron al principio del experimento y después del ciclo 1, 3 y 5 usando SEC (multímeros de filgrastim) y RP-HPLC (contenido de G-CSF y variantes de G-CSF desamidadas y oxidadas) según se describe anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 3 posteriormente.

35

Tabla 3

Composición	Ciclo de C/D	RP-HPLC			SEC
		Contenido de G-CSF (%)	Contenido de G-CSF (mg/ml)	Suma de impurezas (%)	Suma de impurezas (%)
3	0	100	3,1	1,5	1,5
	1	100	3,1	1,5	1,7
	3	100	3,1	1,5	1,8
	5	100	3,1	1,6	1,8
4	0	100	3,3	1,2	2,5
	1	103	3,4	1,3	2,6
	3	103	3,4	1,5	2,7
	5	103	3,4	1,5	2,1

5 Como se puede observar a partir de los resultados anteriores, el contenido de G-CSF así como la suma de impurezas permanecen esencialmente iguales después de cada ciclo, estando todos los valores dentro de los límites del error experimental.

#### Ejemplo 4

10 Las composiciones 5 y 6 (7 ml en botellas de PETG de 10 ml) se enfriaron desde +4°C hasta -20°C en un congelador. Las muestras congeladas se almacenaron durante dos meses a -20°C y a continuación se transfirieron directamente a una cámara de refrigeración ajustada hasta una temperatura de +4°C. Las muestras se dejaron a esa temperatura durante un período de 24 h para descongelar y dejar que las composiciones recuperaran su contenido original de G-CSF. A lo largo del experimento, las muestras y las composiciones 5 y 6 se mantuvieron a 25°C como testigo.

15 Todas las muestras se analizaron con respecto a impurezas con cargas diferentes a las del filgrastim usando enfoque isoeléctrico (IEF) según se describe anteriormente. Los resultados se muestran en la Fig. 1, en la que la banda principal, es decir, la banda más intensa, representa el filgrastim, y las bandas que tienen intensidades inferiores que migran por debajo de la banda más importante representan principalmente sus variantes desamidadas. Como se observará a partir de la Fig. 1, las muestras almacenadas a -20°C (carriles 1 y 2) muestran considerablemente menos variantes desamidadas de filgrastim que las muestras almacenadas a 25°C (carriles 3 y 4).

20 Por otra parte, el contenido de G-CSF global y las impurezas de las muestras almacenadas a -20°C se determinaron usando RP-HPLC (contenido de G-CSF y variantes de G-CSF desamidadas y oxidadas) y SEC (multímeros de G-CSF) según se describe anteriormente antes de la congelación (T0) y después del almacenamiento durante dos meses y la descongelación (T1 / -20°C). Los resultados se muestran en la Tabla 4 posterior junto con los resultados para las muestras testigo almacenadas a 25°C (T1 / +25°C).

25

Tabla 4

Composición	Tiempo de prueba	RP-HPLC			SEC
		Contenido de G-CSF (%)	Contenido de G-CSF (mg/ml)	Suma de impurezas (%)	Suma de impurezas (%)
5	T0	100	1,98	1,5	0,2
	T1 / -20°C	100	1,98	1,5	0,4
	T1 / +25°C	100	1,98	2,9	0,1
6	T0	100	1,86	2,6	0,2
	T1 / -20°C	99	1,85	2,1	0,4
	T1 / +25°C	99	1,84	3,6	0,1

5 Como se puede observar a partir de los resultados anteriores, el contenido de G-CSF permanece esencialmente igual antes y después de la congelación, estando todos los valores dentro de los límites del error experimental. El incremento en las variantes de G-CSF desamidadas y oxidadas que se determinaba mediante RP-HPLC está de acuerdo con los resultados obtenidos usando IEF mostrados en la Fig. 1.

## Ejemplo 5

10 Las composiciones 5, 7 y 8 (800 ml en botellas de PETG de 1.000 ml) se almacenaron durante 36 meses a -20°C. Después del almacenamiento, las composiciones se transfirieron hasta una cámara de refrigeración ajustada hasta una temperatura de +4°C y se dejaron a esa temperatura para que se descongelaran durante un período de 48 horas. Las composiciones líquidas así obtenidas se sometieron a 5 ciclos de FIT consecutivos. En cada ciclo, las muestras se enfriaron desde +4°C hasta -20°C en un congelador y, después del almacenamiento durante al menos 24 horas a -20°C, se transfirieron directamente a una cámara de refrigeración ajustada hasta una temperatura de 15 +4°C. Las muestras se dejaron a esa temperatura durante un período de al menos 48 h para que se descongelaran y se dejó que las composiciones recuperaran su contenido original de G-CSF. El contenido de G-CSF y las impurezas se determinaron al principio del experimento (FIT 0) y después del final del ciclo 5 (FIT 5) usando RP-HPLC (contenido de G-CSF y variantes de G-CSF desamidadas y oxidadas) y SEC (multímeros de G-CSF) según se describe anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 5 posteriormente.

20

Tabla 5

Composición	Ciclo de FIT	RP-HPLC			SEC
		Contenido de G-CSF (%)	Contenido de G-CSF (mg/ml)	Suma de impurezas (%)	Suma de impurezas (%)
5	0	100	1,98	1,5	0,3
	5	99	1,96	1,2	0,3
7	0	100	1,7	2,7	0,3
	5	102	1,73	2,5	0,3
8	0	100	1,79	2,6	0,3
	5	102	1,82	2,3	0,3

25 Como se puede observar a partir de los resultados anteriores, el contenido de G-CSF así como la suma de impurezas antes de la congelación y después del final del ciclo 5 siguen siendo esencialmente iguales, estando todos los valores dentro de los límites del error experimental.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para el almacenamiento estable a largo plazo de G-CSF humano recombinante no glicosilado, comprendiendo dicho método las etapas de:
  - 5 (a) proporcionar una composición acuosa de G-CSF tamponada con acetato o glutamato que contiene un G-CSF humano recombinante no glicosilado y sorbitol, en donde la cantidad de G-CSF está en el intervalo de 0,1 mg/ml a 8,0 mg/ml y en donde dicha composición tiene un volumen de 100 ml a 8 l;
  - (b) enfriar la composición de G-CSF proporcionada en la etapa (a) hasta una temperatura de -15°C o menos para obtener una formulación de G-CSF congelada;
  - 10 (c) almacenar la composición de G-CSF obtenida en la etapa (b) en estado congelado a lo largo de un período de al menos un mes; y
  - (d) incrementar la temperatura de la composición de G-CSF congelada de la etapa (c) hasta una temperatura dentro del intervalo de 2°C a 8°C a lo largo de un período de tiempo ajustado para permitir que la composición se descongele y para obtener una composición líquida que tenga un contenido de G-CSF de al menos 95% del contenido de G-CSF de la composición proporcionada en la etapa (a).
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que la cantidad de G-CSF en la composición de G-CSF tamponada de la etapa (a) está en el intervalo de 0,25 mg/ml a 6,5 mg/ml.
3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la composición de G-CSF tamponada tiene un pH de 3,5 a 5, preferiblemente de 3,7 a 4,8.
- 20 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración de acetato o glutamato de la composición de G-CSF tamponada está en el intervalo de 0,5 mM a 100 mM, preferiblemente de 2 mM a 80 mM.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cantidad de sorbitol en la composición de G-CSF está en el intervalo de 10 a 100 mg/ml, preferiblemente de 25 a 75 mg/ml.
- 25 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la composición acuosa de G-CSF tamponada con acetato o glutamato proporcionada en la etapa (a) tiene un volumen de 100 ml a 4 l y más preferiblemente de 100 ml a 1,5 l.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición de G-CSF se enfría en la etapa (b) hasta una temperatura de entre -15°C y -25°C o una temperatura de entre -60°C y -80°C.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la composición de G-CSF congelada se almacena en la etapa (c) a lo largo de un período de al menos tres meses.
- 30 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el incremento de temperatura de la composición de G-CSF congelada hasta una temperatura dentro del intervalo de 2°C a 8°C se efectúa en la etapa (d) incrementando gradualmente o linealmente la temperatura a lo largo de un período de tiempo de al menos 6 horas.
- 35 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el incremento de temperatura de la composición de G-CSF congelada hasta una temperatura se efectúa en la etapa (d) llevando la composición congelada hasta una temperatura dentro del intervalo de 2°C a 8°C y manteniendo la composición a dicha temperatura durante un período de tiempo de al menos 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas y más preferiblemente al menos 36 horas.
- 40 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la composición de G-CSF está libre de tensioactivo.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la composición de G-CSF comprende un tensioactivo.
- 45 13. Un método para proporcionar una composición farmacéutica de G-CSF humano recombinante no glicosilado, comprendiendo dicho método las etapas de:
  - (a) formular G-CSF humano recombinante no glicosilado con un tampón de acetato o glutamato y sorbitol para obtener una composición acuosa tamponada de G-CSF, en donde la cantidad de G-CSF está en el intervalo de 0,1 mg/ml a 8,0 mg/ml y en donde dicha composición tiene un volumen de 100 ml a 8 l;
  - (b) enfriar la composición de G-CSF de la etapa (a) hasta una temperatura de -15°C o menos para obtener una composición de G-CSF congelada;

## ES 2 534 334 T3

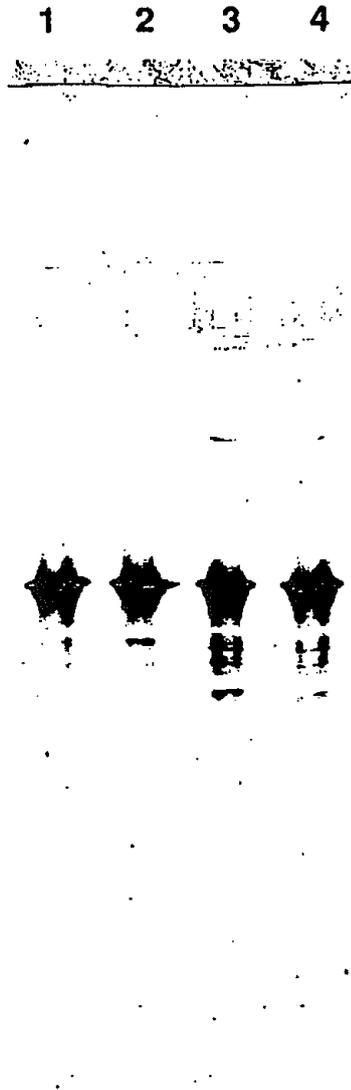
(c) almacenar la composición de G-CSF obtenida en la etapa (b) en estado congelado a lo largo de un período de al menos un mes;

5 (d) incrementar la temperatura de la composición de G-CSF congelada de la etapa (c) hasta una temperatura dentro del intervalo de 2°C a 8°C a lo largo de un período de tiempo ajustado para permitir que la composición se descongele y para obtener una composición líquida que tenga un contenido de G-CSF de al menos 95% del contenido de G-CSF de la composición proporcionada en la etapa (a); y

(e) cargar la composición líquida obtenida en la etapa (d) en envases primarios para uso parenteral.

Fig. 1

Enfoque Isoeléctrico de Composiciones de G-CSF Tamponadas con Glutamato después del Almacenamiento durante 2 Meses a -20°C y 25°C



Carril 1: Composición 5 a -20°C

Carril 2: Composición 6 a -20°C

Carril 3: Composición 5 a +25°C

Carril 4: Composición 6 a +25°C