

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 928**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2012 E 12744410 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2672985**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas exentas de citrato que comprenden anakinra**

30 Prioridad:

11.02.2011 SE 1150109

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

16.09.2016

73 Titular/es:

SWEDISH ORPHAN BIOVITRUM AB (PUBL)
(100.0%)
112 76 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

FRANSSON, JONAS y
FLORIN-ROBERTSSON, EBBA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 582 928 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

Composiciones farmacéuticas exentas de citrato que comprenden anakinra

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anakinra como compuesto activo en ausencia de citrato de sodio. Dichas composiciones farmacéuticas son útiles para el tratamiento de trastornos mediados por IL-1 y para disminuir el dolor nociceptivo durante tal tratamiento.

Técnica anterior

10 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral comprenden típicamente (a) una molécula activa; (b) un agente tamponador con suficiente capacidad tamponadora para controlar el pH de la solución; y (c) un agente de tonicidad para proporcionar isotonicidad a la formulación. Además, se pueden añadir otros componentes tales como antioxidantes, estabilizantes específicos, agentes tensioactivos, conservantes, etc., según sea necesario dependiendo de la molécula activa específica y de su uso previsto.

15 La selección de los componentes de una formulación se tiene que basar en estudios rigurosos que evalúan diferentes componentes con respecto a su función en la formulación y la capacidad estabilizante óptima. Además, se tienen que realizar otros estudios de la formulación para identificar otros parámetros de la solución, como el pH óptimo y la fuerza iónica de la molécula activa específica y su uso previsto. También se realizan estudios para optimizar las concentraciones de los componentes respectivos de la formulación. En muchos casos, se tienen que considerar aspectos adicionales de la formulación final y de su uso clínico, tales como el volumen de inyección apropiado, la compatibilidad con fluidos fisiológicos o tejidos, la viscosidad, la tolerancia local, etc.

20 Un ejemplo de tolerancia local se refiere a la selección de los tipos de tampón. Se conoce que tipos de tampones específicos pueden provocar intolerancia local o dolor por inyección. Se ha descrito que el citrato de sodio causa dolor después de una inyección subcutánea, en algunos casos (Frenken, 1993, Laursen, 2006). Además, la concentración del tampón se debe reducir al mínimo para que sea óptima con respecto no solo a la estabilidad del pH en la formulación del fármaco durante un almacenamiento a largo plazo, sino también para tener un impacto mínimo sobre las condiciones fisiológicas en el lugar de la inyección (por ejemplo, Fransson y Espander-Jansson, 1996). La lista de componentes que se pueden añadir a una formulación para administración parenteral es limitado (Wang y Kowall, 1980; Nema, 2006). Se tiene que considerar una variedad de aspectos; la seguridad, la experiencia previa en seres humanos, la disponibilidad desde los proveedores, etc. La estabilidad de los fármacos proteicos *in vivo* e *in vitro* es un asunto complejo, en el que múltiples reacciones de degradación tienen lugar en paralelo, tales como oxidación, desamidación, agregación etc. Una reacción importante que tiene lugar es la formación de agregados. Los agregados de proteínas se pueden formar a través de vías covalentes o no covalentes, y pueden ser de naturaleza soluble o insoluble. La presencia de agregados de proteínas es un motivo de preocupación desde la perspectiva de la seguridad, ya que puede afectar a la estructura secundaria y terciaria de la proteína. La presencia de estructuras proteicas no naturales específicas se ha asociado con un aumento de la inmunogenicidad de proteínas, lo que causa potencialmente una reducción de la eficacia o incluso reacciones inmunológicas *in vivo* frente a proteínas naturales, dando como resultado afecciones potencialmente mortales.

40 Las enfermedades mediadas por la interleucina-1 incluyen artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), septicemia, síndrome séptico, osteoporosis, lesión isquémica, enfermedad de injerto contra huésped, lesión por reperfusión, asma, diabetes por insulina, leucemia mieloide y otras leucemias, psoriasis y caquexia. Estas y otras enfermedades inflamatorias se caracterizan por la producción de citocinas, incluyendo la interleucina-1.

45 Para los síndromes en los que se ha establecido una función de la IL-1 en la patología de la enfermedad, las manifestaciones clínicas de la enfermedad se pueden aliviar rápidamente mediante el tratamiento con medicamentos anti-IL-1. Uno de estos medicamentos es Kineret[®], cuyo componente activo, anakinra, es una versión recombinante del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) presente en la naturaleza. La anakinra se da a conocer, por ejemplo, en el documento US 5.075.222.

50 Kineret[®] (anakinra para inyección) se formula a 150 mg/ml con un tampón de citrato de sodio 10 mM (pH 6-7) y cloruro sódico (140 mM) como agente de tonicidad. Además, EDTA 0,5 mM y 0,1% (p/p) de polisorbato 80 se utilizan como estabilizantes. La selección de citrato de sodio como componente del tampón para anakinra se basó en estudios detallados que evaluaban la estabilidad a corto y largo plazo de anakinra, en condiciones de tiempo real. Se evaluaron varios componentes potenciales del tampón, siendo uno el fosfato de sodio, y el citrato de sodio se identificó como el que proporcionaba una estabilidad óptima con respecto a la agregación de anakinra (Raibekas et al., 2005). La agregación de anakinra era un problema importante para la selección del componente tamponador. La concentración de citrato de sodio se redujo al máximo posible, teniendo en cuenta la tolerabilidad local.

55 Durante el uso clínico de anakinra en citrato de sodio 10 mM, se constató que la formulación causaba problemas con la tolerancia local en el sitio de la inyección subcutánea (Thaler, 2009). Reacciones en el sitio de la inyección no son infrecuentes en la administración subcutánea de fármacos proteicos y son un problema general (Haller, 2008) y están asociadas con el uso clínico de un gran número de fármacos proteicos. Más del 50% de los pacientes que

utilizan anakinra para inyección, experimenta reacciones en el lugar de inyección en cierta medida en las primeras inyecciones. La naturaleza y el mecanismo de la reacción local se han investigado y se ha llegado a varias conclusiones (Bendele, 1995). Se ha llegado a la conclusión de que la reacción en el lugar de la inyección tiene múltiples causas incluyendo la propia molécula de anakinra y los componentes de la formulación, teniendo un efecto muy considerable el citrato de sodio.

En consecuencia, existe una necesidad de composiciones de anakinra, adecuadas para inyección, que sean estables y que eviten los inconvenientes de las composiciones de anakinra que comprenden citrato de sodio.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el número de partículas subvisibles (con un tamaño mayor que 5, 7,5 y 10 μm) por ml de varias composiciones de anakinra (denominadas E, G, H, O, R, S, T y U).

La Figura 2 muestra el número de partículas como en la Figura 1, después de que dichas composiciones de anakinra se hubieran almacenado durante 1 mes a +25°C.

La Figura 3 muestra el número de partículas como en la Figura 1, después de que dichas composiciones de anakinra se hubieran almacenado durante 3 meses a +5°C.

La Figura 4 indica inflamación, tal y como se indica por el aumento del volumen de la pata, en ratas macho Sprague-Dawley, después de la administración de varias composiciones de anakinra.

Descripción de la invención

De acuerdo con la invención, se ha mostrado sorprendentemente que anakinra adecuada para inyección, se puede estabilizar suficientemente sin el uso de citrato de sodio. En contraste con los hallazgos de Raibekas et al. (2005), anakinra se puede formular en solución acuosa con un agente de tonicidad adecuado y estabilizantes adicionales, pero sin citrato de sodio como tampón. En condiciones adecuadas de preparación, anakinra controlará de forma inherente el pH de la solución. Incluso una solución sin tampón añadido puede ser suficientemente estable.

En consecuencia, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de anakinra, en donde dicha formulación farmacéutica no contiene citrato.

De acuerdo con la invención, dicha formulación es estable en ausencia de citrato, en donde el término "estable" implica, por ejemplo, que la ausencia de agregación y/o la estabilidad del pH es, por lo menos, aproximadamente igual a la de una formulación de anakinra similar que comprende citrato de sodio 10 mM (pH 6-7).

El término "anakinra" significa, en particular, el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) que tiene la secuencia de 152 aminoácidos mostrada como las posiciones 26-177 en la Secuencia de Referencia del NCBI, NP_776214.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov). Además, el término "anakinra" se debe entender como que incluye formas modificadas de anakinra, por ejemplo, variantes de aminoácidos que tienen al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de anakinra. El experto en la técnica entenderá que se pueden realizar muchas combinaciones de deleciones, inserciones, inversiones y sustituciones dentro de la secuencia de aminoácidos de anakinra, siempre que la molécula resultante ("la variante de anakinra") sea biológicamente activa, por ejemplo, posea la capacidad de inhibir IL-1. Variantes particulares de anakinra se describen, por ejemplo, en los documentos de patente de EE.UU. n° 5.075.222; 6.858.409 y 6.599.873.

El término "anakinra" incluye, además, proteínas de fusión que comprenden anakinra. Anakinra se puede preparar de modo que tenga un tamaño hidrodinámico mayor, por ejemplo, mediante la fijación de un grupo de polialquilenglicol (por ejemplo, un grupo de polietilenglicol (PEG)), seroalbúmina, transferrina, receptor de transferrina o al menos la porción del mismo que se une a transferrina, una región Fc de anticuerpo, o mediante conjugación con un dominio de anticuerpo.

La expresión "una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que confiere un efecto terapéutico al sujeto tratado. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible con alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación de un efecto o de cómo siente un efecto).

Preferiblemente, la anakinra se administra en una dosis de 0,1 a 100 mg/kg por día, preferiblemente de 0,1 a 1 mg/kg por día. Una dosificación preferida para el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-1, debe producir concentraciones de anakinra en sangre entre 1 y 1000 ng/ml. Por consiguiente, se prefiere que en un principio, las dosis se administren para que los niveles circulantes de anakinra se sitúen por encima de 5 ng por ml de plasma.

La formulación farmacéutica de acuerdo con la invención comprende preferiblemente anakinra en una cantidad entre 100 y 200 mg/ml, tal como 150 mg/ml.

La formulación farmacéutica de acuerdo con la invención está adaptada preferentemente para una inyección subcutánea de anakinra. Preferiblemente, la formulación farmacéutica comprende un agente quelante, tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La cantidad de EDTA en la formulación es preferiblemente de 0,05 a 1 mM, más

preferiblemente aproximadamente 0,5 mM. Un emulsionante, preferiblemente un tensioactivo no iónico, tal como polisorbato 80 (también conocido como monooleato de polioxietileno sorbitano o Tween 80[®]), se puede añadir a la formulación para reducir la agregación y la desnaturalización, además de para aumentar la solubilidad. La cantidad de polisorbato 80 es preferiblemente de 0,01 a 1%, más preferiblemente aproximadamente 0,1%. En consecuencia, una forma preferida de la formulación farmacéutica de acuerdo con la invención comprende 150 mg/ml de anakinra, EDTA 0,5 mM y 0,1% de polisorbato 80.

Además, la formulación farmacéutica puede comprender un agente de tonicidad, por ejemplo, NaCl, en una cantidad suficiente para proporcionar isotonicidad a la formulación. Un agente de tonicidad preferido es NaCl en una concentración entre aproximadamente 120-180 mM, tal como aproximadamente 120-150 mM o más preferiblemente aproximadamente 140 mM.

Alternativamente, dicho agente de tonicidad puede ser una mezcla de NaCl y un segundo agente de tonicidad, seleccionado a partir del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y alcoholes de azúcar. Preferiblemente, el segundo agente de tonicidad se selecciona a partir del grupo que consiste en sacarosa, manitol, sorbitol, glicerol, inositol y trehalosa. Más preferiblemente, el segundo agente de tonicidad es manitol, sorbitol o glicerol. Más preferiblemente, el segundo agente de tonicidad es manitol en una cantidad de 5 a 50 mg/ml.

La invención incluye formulaciones farmacéuticas en las que la proteína activa, es decir, anakinra, es suficiente como sustancia tamponadora y es capaz de mantener el pH a un nivel deseado, preferiblemente aproximadamente pH 6,5. En consecuencia, no se tiene que añadir ninguna sustancia tamponadora adicional a la formulación de acuerdo con la invención. Sin embargo, en la invención también se incluyen formulaciones farmacéuticas que comprenden anakinra y al menos una sustancia tamponadora adicional, siempre que dicha sustancia tamponadora adicional no sea tampón citrato. Dicha sustancia tamponadora adicional puede ser, por ejemplo, un tampón fosfato o histidina. Más específicamente, dicho tampón adicional podría ser fosfato de sodio en una cantidad de 1 a 50 mM, preferiblemente aproximadamente 10 mM, o histidina en una cantidad de 5 a 50 mM, preferiblemente aproximadamente 10 mM.

Las formulaciones particularmente preferidas son las que comprenden un tampón fosfato en combinación con manitol. En tales formulaciones, la concentración de fosfato, tal como fosfato de sodio, es preferiblemente de 1 a 50 mM (más preferiblemente aproximadamente 10 mM) y la concentración de manitol es preferiblemente de 5 a 50 mg/ml (más preferiblemente aproximadamente 10 mg/ml). El pH de dicha formulación está preferiblemente entre 6 y 7, tal como entre 6,3 y 6,6, o más preferiblemente aproximadamente 6,5.

En consecuencia, las formulaciones preferidas de acuerdo con la invención incluyen formulaciones que comprenden:

- (a) 100 - 200 mg/ml de anakinra;
- (b) EDTA 0,05 - 1 mM;
- (c) 0,01 a 1% de polisorbato 80;
- (d) NaCl 120 - 180 mM;
- (e) fosfato de sodio 1 - 50 mM, pH 6 - 7; y
- (f) 5 - 50 mg/ml de manitol.

Una formulación particularmente preferida comprende:

- (a) anakinra (150 mg/ml);
- (b) EDTA (0,5 mM);
- (c) 0,1% de polisorbato 80;
- (d) NaCl 120 - 150 mM, preferentemente 140 mM;
- (e) fosfato de sodio 10 mM, pH 6,3 - 6,6, preferentemente pH 6,5; y
- (f) 10 mg/ml de manitol.

La formulación farmacéutica de acuerdo con la invención se puede emplear preferiblemente en el tratamiento de al menos un trastorno mediado por IL-1. También se incluye en la invención un método para el tratamiento de un trastorno mediado por IL-1, que comprende administrar a un mamífero, incluyendo el ser humano, que requiere dicho tratamiento una formulación farmacéutica como se define en esta memoria. El término "tratamiento" incluye la prevención (profilaxis) de trastornos mediados por IL-1, o la mejora o la eliminación de la enfermedad una vez que se ha establecido.

Una enfermedad o una afección médica se considera que es un "trastorno mediado por IL-1" si la enfermedad o la

- afección médica espontánea o experimental está asociada con niveles elevados de IL-1 en fluidos o tejidos corporales, o si las células o los tejidos tomados del organismo producen niveles elevados de IL-1 en cultivo. En muchos casos, este tipo de enfermedades mediadas por interleucina-1 también son reconocidas por las dos condiciones adicionales siguientes: (1) los hallazgos patológicos asociados con la enfermedad o la afección médica se pueden imitar experimentalmente en animales mediante la administración de IL-1; y (2) la patología inducida en modelos animales experimentales de la enfermedad o la afección médica se puede inhibir o suprimir mediante un tratamiento con agentes que inhiben la acción de IL-1. En la mayoría de las enfermedades mediadas por interleucina-1 se cumplen al menos dos de las tres condiciones, y en muchas enfermedades mediadas por interleucina-1 se cumplen las tres condiciones.
- 5
- 10 Los trastornos mediados por IL-1 incluyen:
- Amiloidosis de amiloide A
 - Enfermedad de Still de inicio en el adulto (AOSD)
 - Asma
 - Enfermedad de Behçet
- 15
- Síndrome de Blau
 - Caquexia
 - Enfermedad de dihidrato de pirofosfato cálcico (CPPD)
 - Enfermedad de Castleman
 - Síndromes periódicos asociados a la criopirina (CAPS)
- 20
- Deficiencia del antagonista del receptor de la interleucina-1 (DIRA)
 - Dermatomiositis
 - Enfermedad de Erdheim-Chester
 - Osteoartritis erosiva
 - Fiebre mediterránea familiar
- 25
- Psoriasis pustulosa generalizada
 - Gota y pseudogota
 - Enfermedad de injerto contra huésped
 - Hidradenitis supurativa
 - Síndrome de hiper IgD (HIDS)
- 30
- Urticaria idiopática por frío
 - Miositis por cuerpos de inclusión
 - Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)
 - Lesión isquémica
 - Síndrome de activación de macrófagos
- 35
- Síndrome de Majeed
 - Deficiencia de mevalonato quinasa
 - Leucemia mielógena y otras leucemias
 - Paniculitis neutrofílica

- Osteoporosis
 - Fiebres periódicas con estomatitis aftosa, faringitis y adenitis (PFAPA)
 - Polimiositis
 - Psoriasis
- 5
- Pioderma gangrenoso, acné conglobata y artritis aséptica (PAPA)
 - Pericarditis idiopática recurrente
 - Policondritis recidivante
 - Lesión por reperfusión
 - Artritis reumatoide (AR)
- 10
- Síndrome de Schnitzler
 - Septicemia; síndrome séptico
 - Mieloma latente
 - Síndrome de sinovitis, acné, pustulosis, hiperostosis, osteítis (SAPHO)
 - Artritis idiopática juvenil de inicio sistémico (SoIJA)
- 15
- Síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAPS)
 - Diabetes de tipo 1
 - Diabetes de tipo 2
 - Vasculitis urticarial
 - Uveítis
- 20
- La formulación farmacéutica se administra preferiblemente mediante inyección subcutánea a un mamífero, incluyendo el ser humano, que tiene necesidad de la misma. De acuerdo con la invención, se evita o se reduce el dolor nociceptivo en el sitio de la inyección subcutánea. La expresión "dolor nociceptivo" implica una actividad neuronal iniciada por nociceptores (receptores del dolor).

Ejemplos

- 25 EJEMPLO 1: Estabilidad con respecto a la agregación visible

Una solución a granel de anakinra congelada en citrato de sodio 10 mM, NaCl 140 mM y EDTA 0,5 mM, obtenida de Amgen Manufacturing, se descongeló y se diafiltró usando un sistema Millipore ProFlux[®] M12, que incluía una mini casete de 0,1 m² de Millipore Pellicon 2[®], que tenía una membrana de celulosa regenerada compuesta PLC10[®] de 10 kDa (www.millipore.com). Las soluciones obtenidas se concentraron por ultrafiltración de acuerdo con métodos convencionales.

Las composiciones descritas en la Tabla I se prepararon a partir de las soluciones anteriores obtenidas, diafiltradas y concentradas. Además de los ingredientes mostrados en la Tabla I, todas las composiciones contenían 150 mg/ml de anakinra, EDTA 0,5 mM y 0,1% de polisorbato 80. Las soluciones se cargaron en jeringas de vidrio siliconizado (1 ml) que se almacenaron durante 1 mes (+5°C o +25°C) o durante 3 meses (+5°C).

35 **Tabla I:** Composiciones de anakinra investigadas

Composición	NaCl (mM)	Tampón (10 mM)	pH
E	120	Citrato de sodio	6,2
G	120	Fosfato de sodio	6,2
H	120	Histidina	6,2

Composición	NaCl (mM)	Tampón (10 mM)	pH
O	120	-	6,5
R	120	Citrato de sodio	6,5
S	240	Citrato de sodio	6,5
T	120	Fosfato de sodio	6,5
U	120	Fosfato de sodio	6,8

5 Las soluciones de la Tabla I se sometieron a ensayo para analizar las partículas subvisibles a través de una técnica de bloqueo de la luz, de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos - Formulario Nacional (USP-NF), capítulo 905 (www.usp.org) pero ajustada a un volumen de muestra pequeño. En cada punto temporal se agruparon y se analizaron muestras procedentes de 3 jeringas. En cada grupo, se determinó el número de partículas con un tamaño mayor que 5, 7,5 y 10 μm . Los resultados se muestran en la Tabla II y las Figuras 1-3. Los resultados típicos para las partículas subvisibles en productos parenterales están en el intervalo de menos de 6000 partículas mayores de 10 μm .

Tabla II: Partículas subvisibles en formulaciones de anakinra

Composición	Inicio	1 mes +5°C	1 mes +25°C	3 meses +5°C
	Partículas (>5 μm)/ml			
E	221	282	562	477
G	229	113	270	324
H	162	323	418	476
O	223	249	386	584
R	270	528	771	373
S	136	266	524	421
T	272	451	517	533
U	154	456	468	549

10

La cantidad medida de partículas subvisibles indica que la agregación visible de anakinra es relativamente baja, aumenta ligeramente con el tiempo y no depende de la presencia de tampón. Los datos muestran que anakinra se puede formular sin citrato de sodio y con una estabilidad equivalente.

EJEMPLO 2: Estabilidad de la agregación

15 Las composiciones de anakinra se prepararon y se almacenaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. El contenido en monómeros se midió por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Cada muestra se diluyó con citrato de sodio 10 mM, NaCl 140 mM, EDTA 0,5 mM hasta una concentración de anakinra de 5 mg/mL. La muestra diluida se cargó en una columna de TSK-Gel G2000 SWXL, de 7,8 mm x 30 cm (Tosoh Biosciences 08450) y se eluyó con citrato de sodio 10 mM, NaCl 140 mM y EDTA 0,5 mM, con un caudal de 0,5 ml/min. Se registró la absorbancia a 280 nm y se calculó el % de monómeros a partir del área del pico respectivo.

20

Los resultados (Tabla III) muestran que el nivel de monómeros de anakinra se mantuvo estable durante 3 meses en todas las composiciones de anakinra estudiadas.

Tabla III: Estabilidad de diversas formulaciones de anakinra

Composición	Inicio	1 mes +5°C	1 mes +25°C	3 meses +5°C
	% de monómeros mediante SEC			
E	99,8	99,8	99,2	99,7
G	99,9	99,8	99,1	99,7
H	99,8	99,8	99,1	99,7
O	99,9	99,8	99,0	99,7

Composición	Inicio	1 mes +5°C	1 mes +25°C	3 meses +5°C
	% de monómeros mediante SEC			
R	99,8	99,8	99,0	99,7
S	99,9	99,8	99,2	99,7
T	99,9	99,8	98,7	99,7
U	99,8	99,8	98,6	99,6

EJEMPLO 3: Estabilidad del pH

Las composiciones de anakinra se prepararon y se almacenaron tal como se describe en el Ejemplo 1. El pH se midió de acuerdo con procedimientos convencionales. Los resultados (Tabla IV) muestran que el pH se mantuvo estable durante 3 meses en todas las composiciones de anakinra estudiadas.

Tabla IV: Estabilidad del pH de diversas formulaciones de anakinra

Composición	Inicio	1 mes +5°C	1 mes +25°C	3 meses +5°C
	pH			
E	6,1	6,1	6,1	6,1
G	6,1	6,0	6,0	6,1
H	6,1	6,1	6,1	6,2
O	6,1	6,0	6,0	6,1
R	6,2	6,2	6,2	6,2
S	6,1	6,0	6,0	6,1
T	6,4	6,4	6,4	6,5
U	6,7	6,7	6,7	6,7

EJEMPLO 4: Estabilidad de composiciones de anakinra que comprenden fosfato y manitol

Una solución a granel de anakinra congelada en citrato de sodio 10 mM, NaCl 140 mM y EDTA 0,5 mM, de fabricación propia, se descongeló y se diafiltró usando un sistema Millipore ProFlux[®] M12, que incluía una mini casete de 0,1 m² de Millipore Pellicon 2[®], que tenía una membrana de celulosa regenerada compuesta PLC10[®] de 10 kDa (www.millipore.com). Las soluciones obtenidas se concentraron por ultrafiltración de acuerdo con métodos convencionales.

Las composiciones descritas en la Tabla V se prepararon a partir de las soluciones anteriores obtenidas, diafiltradas y concentradas. Además de los ingredientes mostrados en la Tabla V, todas las composiciones contenían 150 mg/ml de anakinra. Las soluciones se cargaron en jeringas de vidrio siliconizado (1 ml) que se almacenaron a diferentes temperaturas para someter a ensayo la estabilidad de anakinra en estas formulaciones. Las muestras se almacenaron durante 1 mes a +30°C, 2 y 4 meses a +25°C.

Tabla V: Composiciones de anakinra investigadas

Composición	NaCl (mM)	Tampón	Manitol	Polisorbato 80	EDTA	pH
A	145	citrato de sodio 10 mM	0	(0,1%)	0,5 mM	6,3
C	145	fosfato de sodio 10 mM	10 mg/mL	(0,1%)	0,5 mM	6,3
D	145	fosfato de sodio 10 mM	0	(0,1%)	0,5 mM	6,3
D2	145	fosfato de sodio 10 mM	10 mg/mL	(0,01%)	0,1 mM	6,3

El contenido en monómeros se midió por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) después de un almacenamiento a cada temperatura. Cada muestra se diluyó con citrato de sodio 10 mM, NaCl 140 mM, EDTA 0,5 mM hasta una concentración de anakinra de 5 mg/mL. La muestra diluida se cargó en una columna de TSK-Gel G2000 SWXL, de 7,8 mm x 30 cm (Tosoh Biosciences 08450) y se eluyó con citrato de sodio 10 mM, NaCl 140 mM y EDTA 0,5 mM

con un caudal de 0,5 ml/min. La absorbancia a 280 nm se registró y el % de monómero se calculó a partir del área del pico respectivo. Los resultados del análisis de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) presentados en la Tabla VI, muestran que el nivel de monómeros de anakinra se mantenía estable durante un periodo de hasta 4 meses en todas las composiciones de anakinra estudiadas.

5 **Tabla VI:** Estabilidad de las formulaciones de anakinra investigadas

Composición	Inicio	1 mes +30°C	2 meses +25°C	4 meses +25°C
	% de monómeros mediante SEC			
A	99,8	95,3	96,8	92,9
C	99,8	95,5	96,9	93,1
D	99,8	95,0	96,6	92,3
D2	99,8	95,7	97,0	93,2

Además, proteínas tales como anakinra son normalmente sensibles a los cambios en el pH. Para evaluar cualquier efecto del pH sobre la anakinra en los estudios realizados, se registraron los valores de pH en las formulaciones. Los resultados se muestran en la Tabla VII y muestran un incremento en el pH con el tiempo, pero este cambio es independiente de la formulación y las diferencias expuestas en el contenido de monómero en la Tabla VI no son debidas a una diferencia en el pH.

10 **Tabla VII:** pH de la solución de las formulaciones de anakinra investigadas

Composición	Inicio	1 mes +30°C	2 meses +25°C	6 meses +5°C
	pH			
A	6,3	6,3	6,5	6,5
C	6,3	6,3	6,5	6,4
D	6,3	6,3	6,5	6,5
D2	6,3	6,3	6,5	6,5

EJEMPLO 5: Efecto de composiciones de anakinra en la prueba de Hargreaves

15 El objetivo de estos estudios era comparar el efecto de diferentes formulaciones de anakinra (tampón citrato o tampón fosfato/manitol) sobre el umbral de nocicepción térmica y el volumen de la pata trasera de ratas Sprague-Dawley macho (Hargreaves et al., 1988).

Se realizó una administración intraplantar de histamina (50 µl/pata, 3 mg/ml), tampón citrato (10 mM pH 6,3) o tampón fosfato (10 mM, pH 6,3, más manitol 10 mg/ml) con o sin anakinra (150 mg/ml), en la pata trasera derecha. La formación de edema, medida como un aumento del volumen de la pata después de 2 horas, indicaba que el tampón citrato y la anakinra tamponada con citrato, así como la anakinra tamponada con fosfato/manitol causaban inflamación aguda (Fig 4). El tampón fosfato/manitol no causaba inflamación aguda. Histamina (0,15 mg/pata), utilizada como control positivo, inducía hiperalgesia térmica y formación de edema.

20 En conclusión, existía una clara diferencia en la inflamación de la pata después de 2 h entre el tampón citrato y el tampón fosfato/manitol solo. Además, las mediciones del volumen de la pata 2 h después de la inyección, mostraron una tendencia de la anakinra tamponada con fosfato/manitol a causar menos formación de edema, en comparación con la anakinra tamponada con citrato.

EJEMPLO 6: Efecto de composiciones anakinra sobre la permeabilidad de azul de Evans en ratas

30 Las ratas macho se anestesian con isoflurano, y el pelo de la parte posterior y de los lados se elimina mediante un afeitado cuidadoso con una maquinilla, evitando cuidadosamente una lesión. Se dibuja una rejilla con 8 cuadrados sobre la piel expuesta en la parte posterior y los lados, con un bolígrafo marcador. Se administra solución de azul de Evans (1 mg/kg; Sigma-Aldrich) mediante inyección en la vena lateral de la cola, antes de la inyección subcutánea de las soluciones del ensayo de anakinra (1000 µl), con un patrón aleatorio dentro de los cuadrados de la rejilla. Después de la inyección, los animales se devuelven a sus jaulas y se les permite recuperarse de la anestesia. Seis horas después de la inyección, los animales son sacrificados mediante exposición a dióxido de carbono. La piel de la parte posterior se retira y se limpia de tejido adiposo y conectivo, y se monta sobre una placa con el lado del pelo hacia abajo. El tamaño de la zona con colorante azul de Evans extravasado en milímetros se mide con una regla de centímetros, y se asigna a la reacción de extravasación una puntuación subjetiva que varía de 0 a 4, basándose en

la intensidad de la tinción con colorante.

Se administran varias composiciones de anakinra, incluyendo anakinra en "CSEP" (citrato de sodio 10 mM; EDTA 0,5 mM, 0,1% de polisorbato 80 y NaCl 140 mM, pH 6,5), así como solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control. Los cambios medidos de la permeabilidad indican que la inyección de solo 1 ml de PBS, da como resultado solo pequeñas fugas de colorante azul de Evans en el sitio de la inyección. En contraste, la inyección de anakinra, disuelta hasta 100 mg/ml en CSEP, aumenta fuertemente la permeabilidad.

EJEMPLO 7: Efecto de composiciones de anakinra sobre el comportamiento nociceptivo en ratón

Con el fin de evaluar la acción algesiogénica de diferentes composiciones de anakinra en el sitio de la inyección, se emplea el modelo de ratón que se lame la pata trasera (Piovezan et al., 1998). Los animales se colocan individualmente en cámaras (cilindros de vidrio transparente) y se aclimatan durante al menos 20 min antes de la inyección subplantar de varias composiciones de anakinra del ensayo, incluyendo anakinra en CSEP (véase el Ejemplo 6), así como PBS como control. Después del estímulo, los ratones se observan individualmente durante 15-30 min. La cantidad de tiempo que pasan lamiendo la pata inyectada se mide con un cronómetro y se considera indicativa de un comportamiento nociceptivo.

EJEMPLO 8: Efecto de las composiciones de anakinra en la prueba de placa caliente

Con el fin de evaluar las acciones algesiogénicas de diferentes composiciones de anakinra en el sitio de la inyección, se emplea el modelo de hiperalgesia térmica en ratón (Kanaan et al., 1996). Los animales se aclimatan a un instrumento de placa caliente (Ugo Basil, Italia), precalentada a 30°C, 1-2 días antes de la prueba. El día del ensayo, los animales reciben una inyección subplantar de varias composiciones de anakinra del ensayo, incluyendo anakinra en CSEP (véase el Ejemplo 6), así como PBS como control. Empleando un procedimiento ciego del experimentador para el tratamiento, los ratones se someten al ensayo en la placa caliente ajustada a +52°C. Una latencia de la respuesta se determina como el tiempo necesario para lamer una pata trasera o para saltar.

EJEMPLO 9: Efecto de diferentes formulaciones de anakinra sobre la desgranulación de mastocitos, *in vitro*

A23187 (un ionóforo de calcio) y la dosis-respuesta de IgE-anti-IgE sirven como controles positivos para la activación de mastocitos. Se aíslan los mastocitos procedentes de 10 individuos diferentes (5 procedentes de sangre del cordón umbilical y 5 de individuos adultos). Los mastocitos se aíslan mediante selección con CD34 (citometría de flujo) de células hematopoyéticas, que se cultivan posteriormente a 37°C, 5% de CO₂ en condiciones de privación de suero, en presencia de factor de células madre humanas recombinantes (Stemgen®) e IL-6 durante 6-8 semanas (Gulliksson, M. et al., 2010). El grado de desgranulación de los mastocitos, después de someter las células a las diferentes formulaciones de anakinra, se evalúa mediante mediciones de la histamina y PGD₂. Un cambio en la desgranulación de los mastocitos es una medida de una alteración en los niveles de activación de los mastocitos, que es un marcador de los mecanismos del dolor inflamatorio agudo.

EJEMPLO 10: Efecto de composiciones de anakinra subcutáneas sobre la liberación de mediadores extracelulares del dolor en el sitio de la inyección usando el método de microdiálisis

Para investigar el efecto agudo de la inyección de varias composiciones de anakinra, incluyendo anakinra en CSEP (véase el Ejemplo 6), así como PBS como control, se emplea un método de microdiálisis bien conocido, para la determinación de concentraciones extracelulares de mediadores bioquímicos del dolor (por ejemplo, neurotransmisores, neuromoduladores y citocina y quimiocina inflamatoria aguda). Los animales se anestesian mediante inhalación de isoflourano durante el experimento. La sonda de microdiálisis se inserta en la dermis de la piel en la parte superior del cuello de cada animal. El tubo de entrada de la sonda de microdiálisis se conecta a una bomba de microinfusión y se puede bombear una solución de Krebs-Ringer con un caudal de 1-10 ml/min. Las muestras se recogen y se analiza el mediador del dolor (por ejemplo, mediante ELISA) para cada experimento individual (Weidner C., et al., 2000 y Yoshitake T. et al., 2012).

Referencias

- 45 • Bedele A., Colloton M., Vrkljan M., Morris J y Sabados K. (1995): Cutaneous mast cell degranulation in rats receiving injections of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (rhIL-1ra) and/or its vehicle: Possible clinical implications. *J. Lab. Clin. Med.* 125: 493-500.
- Fransson J. y Espander-Jansson A. (1996): Local tolerance of subcutaneous injections. *J. Pharm. Pharmacol.* 48: 1012-1015.
- 50 • Frenken, L.A., van Lier, H.J., Jordans, J.G., Leunissen, K.M., van Leusen, R., Verstappen, V.M., Koene, R.A. (1993): Identification of the component part in an epoetin alfa preparation that causes pain after subcutaneous injection. *Am. J. Kidney Dis.* 22: 553-556.
- Gulliksson, M. et al. (2010) Mast cell survival and mediator secretion in response to hypoxia. *PLoS One* 5(8):e12360.

- Haller C., Cosenza M. y Sullivan J. (2008): Safety Issues Specific to Clinical Development of Protein Therapeutics. *Clin Pharmacol Ther.* 84(5): 624-627.
 - Hargreaves K. et al. (1988): A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32: 77-88.
- 5
- Kanaan S.A. et al: (1996): Endotoxin-induced local inflammation and hyperalgesia in rats and mice: a new model for inflammatory pain. *Pain* 66: 373-379.
 - Laursen T., Hansen B y Fisker S. (2006): Pain Perception after Subcutaneous Injections of Media Containing Different Buffers. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 98: 218-221.
- 10
- Nema S., Brendel R. y Washkuhn R.: Excipients: Parenteral Dosage Forms and Their Role. En: Swarbrick, J. (compilador) *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, tercera edición. Informa Healthcare, 2006.
 - Piovezan A.P. et al. (1998): Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. *European Journal of Pharmacology* 351: 15-22
 - Raibekas A, Bures E., Siska C., Kohno T., Latypov R. y Kerwin B. (2005): Anion Binding and Controlled Aggregation of Human Interleukin-1 Receptor Antagonist. *Biochemistry* 44: 9871-9879.
- 15
- Thaler K., Chandiramani D., Hansen R. y Gartlehner G. (2009): Efficacy and safety of anakinra for the treatment of rheumatoid arthritis: an update of the Oregon Drug Effectiveness Review Project. *Biologics* 3: 485-498.
- Wang J., Kowall R. (1980): Review of excipients and pH's for parenteral products used in the United States. *Journal of Parenteral Drugs* 34: 452-462.
- 20
- Winder C., et al. (2000): Acute effect of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin - A microdialysis study. *The Journal of Investigative Dermatology.* 115: 1015-1020.
 - Yoshitake T., et al. (2012): Determination of histamine in microdialysis samples from Guinea pig skin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Skin Pharmacology Physiology* 25:65-72.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica adecuada para inyección, en donde formulación está exenta de citrato, que comprende
- 5 (a) 100 - 200 mg/ml de anakinra;
- (b) EDTA 0,05 - 1 mM;
- (c) 0,01 a 1% de polisorbato 80;
- (d) NaCl 120 - 180 mM;
- (e) fosfato de sodio 1 - 50 mM, pH 6 - 7; y
- 10 (f) 5 - 50 mg/ml de manitol.
2. La formulación farmacéutica según la reivindicación 1, que está adaptada para la inyección subcutánea de anakinra.
3. La formulación farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, que comprende:
- (a) 150 mg/ml de anakinra;
- 15 (b) EDTA 0,5 mM;
- (c) 0,1% de polisorbato 80;
- (d) NaCl 145 mM;
- (e) fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5; y
- (f) 10 mg/ml de manitol.
- 20 4. La formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

Fig. 1

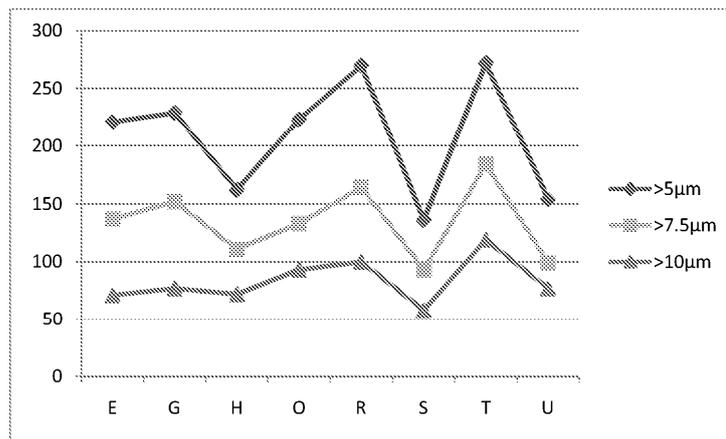


Fig. 2

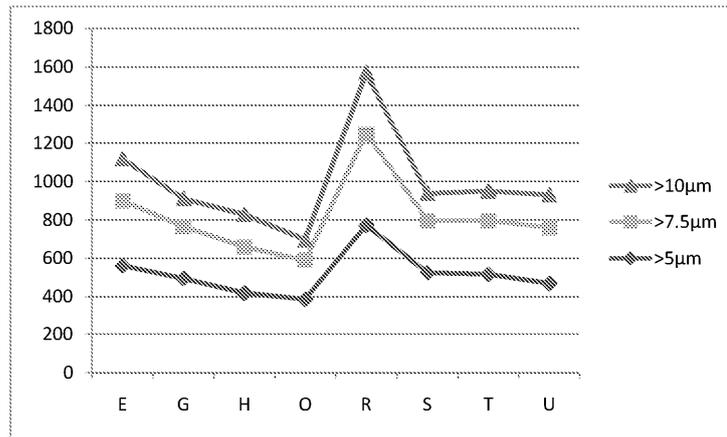


Fig. 3

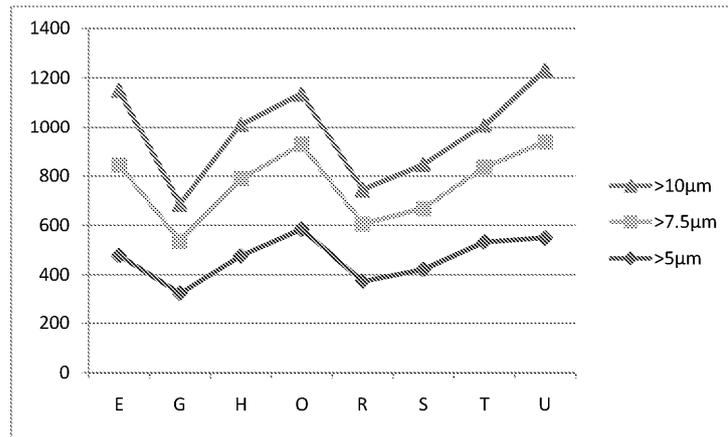


Fig. 4

