

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 989**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 5/00 (2006.01)

A61P 3/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2014** **PCT/US2014/044622**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014** **WO14210489**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2014** **E 14742093 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 3013318**

54 Título: **Formulación líquida estable de amg 416 (velcalcetida)**

30 Prioridad:

28.06.2013 US 201361840618 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2017

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA93120-1789, US

72 Inventor/es:

MACLEAN, DEREK y
YIN, QUN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 633 989 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 estable de amg 416 (velcalcetida)

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

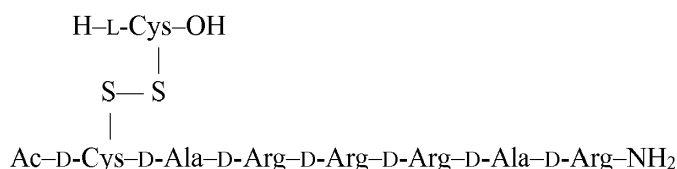
Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. nº 61/840.618, presentada el 28 de junio de 2013, cuyos contenidos se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

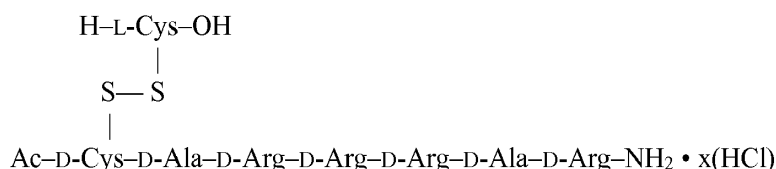
La presente divulgación se refiere a una formulación líquida que comprende un péptido agonista del receptor sensor de calcio, particularmente a una formulación tal que permanece estable después de almacenamiento durante un periodo prolongado. La divulgación está también dirigida a procedimientos de preparación y uso de la formulación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Se han descrito una variedad de compuestos que tienen actividad para rebajar los niveles de hormona paratiroidea. Véase la publicación internacional nº WO 2011/014707. En una realización, el compuesto puede representarse como sigue:



La cadena principal tiene 7 aminoácidos, todos en configuración D, y el residuo de cisteína de cadena lateral está en configuración L. El extremo amino está acetilado y el extremo carboxilo está amidado. Este compuesto ("AMG-416") tiene utilidad para el tratamiento de hiperparatiroidismo secundario (SHPT) en pacientes de hemodiálisis. Puede administrarse una formulación líquida que comprende AMG-416 a un sujeto por vía intravenosa. La sal clorhidrato de AMG-416 puede representarse como sigue:



Los péptidos terapéuticos plantean una serie de retos con respecto a su formulación. Los péptidos en general, y particularmente aquellos que contienen un enlace disulfuro, tienen típicamente solo una estabilidad moderada o mala en solución acuosa. Los péptidos tienden a la hidrólisis del enlace amida tanto a alto como a bajo pH. Los enlaces disulfuro pueden ser inestables incluso en condiciones bastante suaves (cercasas a pH neutro). Además, los péptidos que contienen disulfuro que no son cíclicos tienden particularmente a la formación de dímero. Por consiguiente, los péptidos terapéuticos se proporcionan a menudo en forma liofilizada, como polvo seco o torta, para reconstitución posterior. Una formulación liofilizada de un péptido terapéutico tiene la ventaja de proporcionar estabilidad durante largos periodos de tiempo, pero es menos conveniente de usar ya que requiere la adición de uno o más diluyentes y existe el riesgo potencial de errores debido al uso de un tipo o cantidad inapropiados de diluyente, así como riesgo de contaminación. Además, el proceso de liofilización lleva tiempo y es costoso.

Por consiguiente, existe la necesidad de una formulación líquida acuosa que comprenda un péptido agonista del receptor sensor de calcio, tal como AMG 416. Sería deseable que la formulación líquida permaneciera estable durante un periodo de tiempo relevante en condiciones de almacenamiento adecuadas y que fuera adecuada para administración por vía intravenosa u otras parenterales.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se proporciona una formulación líquida que comprende un agonista peptídico del receptor sensor de calcio, tal como AMG-416.

En una realización, la formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 5,0. En otra realización, la formulación tiene un pH de 2,5 a 4,5. En otra realización, la formulación tiene un pH de 2,5 a 4,0. En otra realización, la formulación tiene un pH de 3,0 a 3,5. En otra realización, la formulación tiene un pH de 3,0 a 4,0. En otra realización, la formulación tiene un pH de 2,8 a 3,8.

En otra realización, el pH de la formulación se mantiene mediante un tampón farmacéuticamente aceptable. Tales tampones incluyen, sin limitación, tampones succinato, tampones acetato, tampones citrato y tampones fosfato. En otra realización, el tampón es tampón succinato. El pH de la formulación puede ajustarse según sea necesario con un ácido o base tal como HCl o NaOH.

En otra realización, está presente el péptido agonista del receptor sensor de calcio a una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En otra realización, está presente el péptido a una concentración de 1 mg/ml a 15 mg/ml. En otra realización, está presente el péptido a una concentración de 2,5 mg/ml a 10 mg/ml. En otra realización, está presente el péptido a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml o aproximadamente 10 mg/ml.

En otra realización, está presente AMG 416 a una concentración de aproximadamente 0,1 g/ml a aproximadamente 20 mg/ml. En una realización, está presente AMG 416 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml. En otra realización, está presente AMG 416 a una concentración de aproximadamente 2,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml. En otra realización, está presente AMG 416 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2,5 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml o aproximadamente 10 mg/ml.

En otra realización, está presente AMG 416 a una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En una realización, está presente AMG 416 a una concentración de 1 mg/ml a 15 mg/ml. En otra realización, está presente AMG 416 a una concentración de 2,5 mg/ml a 10 mg/ml. En otra realización, está presente AMG 416 a una concentración de 1 mg/ml a 5 mg/ml. En otra realización, está presente AMG 416 a una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En otra realización, está presente AMG 416 a una concentración de 0,5 a 1,5 mg/ml, 2,0 a 3,0 mg/ml, 4,5 a 5,5 mg/ml o 9,5 a aproximadamente 10,5 mg/ml.

En otra realización, la formulación comprende además un modificador de la tonicidad farmacéuticamente aceptable o una mezcla de modificadores de la tonicidad farmacéuticamente aceptables. En otra realización, está presente el modificador de la tonicidad (o mezcla de modificadores de la tonicidad) a una concentración suficiente para que la formulación sea aproximadamente isotónica con fluidos corporales (p.ej., sangre humana). En otro aspecto, el modificador de la tonicidad es NaCl.

En otra realización, la formulación comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido agonista del receptor sensor de calcio. En una realización preferida, la formulación comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de AMG 416.

En otra realización, la formulación tiene menos de un 10 % de degradación cuando se almacena a 2-8 °C durante hasta 2 años. En otra realización, la formulación tiene menos de un 10 % de degradación cuando se almacena a 2-8 °C durante hasta 3 años. En otra realización, la formulación tiene menos de un 10 % de degradación cuando se almacena a 2-8 °C durante hasta 4 años.

En otra realización, la formulación tiene menos de un 8 % de degradación cuando se almacena a 2-8 °C durante hasta 2 años. En otra realización, la formulación tiene menos de un 8 % de degradación cuando se almacena a 2-8 °C durante hasta 3 años. En otra realización, la formulación tiene menos de un 8 % de degradación cuando se almacena a 2-8 °C durante hasta 4 años.

En otra realización, la formulación tiene menos de un 10 % de degradación cuando se almacena a temperatura ambiente durante 3 meses. En otra realización, la formulación tiene menos de un 10 % de degradación cuando se almacena a temperatura ambiente durante hasta 6 meses. En otra realización, la formulación tiene menos de un 10 % de degradación cuando se almacena a temperatura ambiente durante hasta 1 año.

En otra realización, se proporciona una formulación que comprende de 0,5 mg/ml a 20 mg/ml de un péptido agonista del receptor sensor de calcio (p.ej., AMG 416) en solución acuosa, un tampón succinato que mantiene la formulación a un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,5 y una concentración suficiente de cloruro de sodio para

que la formulación sea aproximadamente isotónica con la sangre humana.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La Figura 1 es una serie de gráficos que representan la pureza (%) en función del tiempo (días) para soluciones de AMG 416 en solución salina tamponada con succinato (pH 4,5) a temperatura ambiente (TA). La Figura 1A muestra la estabilidad de soluciones de AMG 416 que tienen concentraciones de 200, 66, 20, 6,7, 2,2 y 0,67 mg/ml de AMG 416. En la Figura 1B, se aumenta la escala para ilustrar más claramente el patrón de degradación a concentraciones de 20 mg/ml e inferiores.
- 10 La Figura 2 es un gráfico que representa la pureza (%) en función del tiempo (días) para soluciones de AMG 416 en solución salina tamponada con succinato (pH 4,5) a 40 °C que tienen concentraciones en el intervalo de 20, 6,7, 2,2 y 0,67 mg/ml de AMG 416.
- La Figura 3 es una serie de gráficos que representan la pureza (%) en función del tiempo (días) para soluciones de AMG 416 en solución salina tamponada con succinato (pH 2, 3, 4, 5 y 6) a 40 °C. En la Figura 3A, la concentración de AMG 416 es de 10 mg/ml y en la Figura 3B la concentración de AMG 416 es de 2,5 mg/ml.
- 15 La Figura 4 es una serie de gráficos que representan la pureza (%) a los 28 días en función del pH para soluciones de AMG 416 en solución salina tamponada con succinato a 2-8 °C, TA y 40 °C. En la Figura 4A, la concentración de AMG 416 es de 10 mg/ml y en la Figura 4B la concentración de AMG 416 es de 2,5 mg/ml.
- La Figura 5 es una serie de cromatogramas de HPLC. La señal de HPLC en la Figura 5A es para una solución de
- 20 AMG 416 (5 mg/ml, pH 2,25) almacenada durante 27 días a 40 °C (87,8 % de pureza) En la Figura 5B, se aumenta la escala para ilustrar más claramente los picos.
- La Figura 6 es una serie de cromatogramas de HPLC. La señal de HPLC en la Figura 6A es para una solución de AMG 416 (5 mg/ml, pH 3,5) almacenada durante 27 días a 40 °C (91,7 % de pureza). En la Figura 6B, se aumenta la escala para ilustrar más claramente los picos.
- 25 La Figura 7 es un gráfico que representa la pureza (%) en función del tiempo (días) para una serie de soluciones de AMG 416 (5 mg/ml) en solución salina tamponada con succinato (pH 2,25, 2,5, 3,0 y 3,5) a 2-8 °C.
- La Figura 8 es un gráfico que representa la pureza (%) en función del tiempo (días) para una serie de soluciones de AMG 416 (5 mg/ml) en solución salina tamponada con succinato (pH 2,25, 2,5, 3,0 y 3,5) a TA.
- La Figura 9 es un gráfico que representa la pureza (%) en función del tiempo (días) para una serie de soluciones de
- 30 AMG 416 (5 mg/ml) en solución salina tamponada con succinato (pH 2,25, 2,5, 3,0 y 3,5) a 40 °C.
- La Figura 10 es una serie de gráficos que representan el producto de degradación (%) en función del tiempo (días) para una serie de soluciones de AMG 416 (5 mg/ml) en solución salina tamponada con succinato (pH 2,25, 2,5, 3,0 y 3,5). Se muestra el curso temporal de la desamidación C-terminal a 2-8 °C (Figura 10A), TA (Figura 10B) y a 40 °C (Figura 10C). Obsérvese que la escala del eje y es diferente en cada gráfico.
- 35 La Figura 11 es una serie de gráficos que representan el producto de degradación (%) en función del tiempo (días) para una serie de soluciones de AMG 416 (5 mg/ml) en solución salina tamponada con succinato (pH 2,25, 2,5, 3,0 y 3,5). Se muestra el curso temporal de la formación de homodímero a 2-8 °C (Figura 11A), TA (Figura 11B) y a 40 °C (Figura 11C). Obsérvese que la escala del eje y de la Figura 11C es diferente de la de las Figuras 11A y 11B.
- La Figura 12 es una serie de gráficos que representan la pureza (%) en función del pH (2,8-3,8), la concentración de
- 40 AMG 416 (4-6 mg/ml) y NaCl (0,7-1,0 %) para una serie de soluciones en solución salina tamponada con succinato almacenadas a 2-8 °C (Figura 12A), 25 °C (Figura 12B) y 40 °C (Figura 12C).
- La Figura 13 es una serie de gráficos que representan la pureza (%) en función del tiempo (meses) para una serie de soluciones de AMG 416 (3,4 mg/ml) en solución salina tamponada con succinato (pH 2,5, 3,0, 3,5) almacenada a 2-8 °C (Figura 13A), 25 °C (Figura 13B) y 40 °C (Figura 13C).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los encabezados de sección usados en la presente memoria son solo con fines organizativos y no han de considerarse como limitantes de la materia en cuestión descrita.

- 50 A menos que se defina de otro modo en la presente memoria, los términos científicos y técnicos usados con relación a la presente solicitud tendrán los significados que se entienden comúnmente por los especialistas en la materia. Además, a menos que se requiera otra cosa por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular.

- 55 Generalmente, las nomenclaturas usadas con relación a, y las técnicas de, biología molecular y química de proteínas descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en la materia. Los procedimientos y técnicas de la presente solicitud se efectúan generalmente de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la materia y como se describen en diversas referencias generales y más
- 60 específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique otra cosa.

Véanse, p.ej., Laszlo, *Peptide-Based Drug Design: Methods and Protocols*, Humana Press (2008); Benoiton, *Chemistry of Peptide Synthesis*, CRC Press (2005); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), que se incorporan a la presente memoria como referencia con cualquier fin. Las técnicas de purificación se efectúan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se logra comúnmente o como se describe en la presente memoria. Las terminologías usadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en la materia. Pueden usarse técnicas estándares para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro y tratamiento de pacientes.

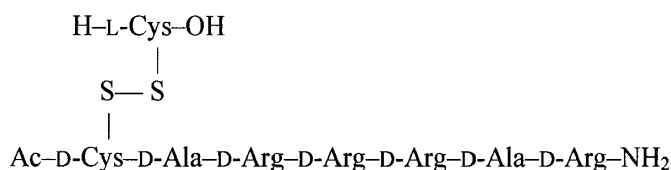
Debería entenderse que esta divulgación no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos, etc. particulares descritos en la presente memoria, y como tales pueden variar. La terminología usada en la presente memoria es con el fin de describir realizaciones particulares solo, y no pretende limitar el alcance de lo divulgado, que se define únicamente por las reivindicaciones.

Como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" en el contexto de un valor o intervalo dado hace referencia a un valor o intervalo que está dentro del 20 %, preferiblemente dentro del 10 % y más preferiblemente dentro del 5 % del valor o intervalo dado.

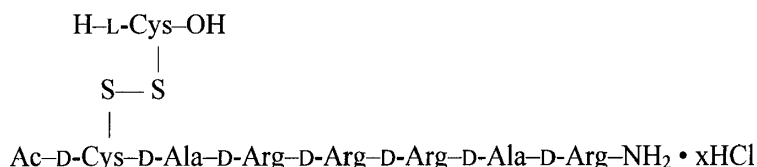
I. Definiciones generales

Según la convención, como se usa en la presente memoria, "un" y "una" significan "uno o más" a menos que se indique específicamente otra cosa.

El término "AMG 416" hace referencia al compuesto que tiene el nombre químico: Disulfuro de *N*-acetil-D-cisteinil-D-alanil-D-arginil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con L-cisteína, que puede representarse como:



Los términos "clorhidrato de AMG 416" o "HCl de AMG 416" son intercambiables y hacen referencia al compuesto que tiene el nombre químico: Disulfuro de *N*-acetil-D-cisteinil-D-alanil-D-arginil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con clorhidrato de L-cisteína, que puede representarse como:



Como se usa en la presente memoria, los términos "aminoácido" y "residuo" son intercambiables y, cuando se usan en el contexto de un péptido o polipéptido, hacen referencia tanto aminoácidos de origen natural como sintético, así como a análogos aminoacídicos, miméticos aminoacídicos y aminoácidos de origen no natural que son químicamente similares a los aminoácidos de origen natural.

El término "tratar" hace referencia a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora de una lesión, patología o afección, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como mitigación; remisión; disminución de los signos o síntomas o hacer la lesión, patología o afección más tolerable al paciente; retardar la tasa de degeneración o declive; hacer el punto final de degeneración menos debilitante o mejorar el bienestar físico o mental de un paciente. El tratamiento o mejora de los signos o síntomas puede estar basado en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen físico, por ejemplo el tratamiento de SHPT disminuyendo los niveles elevados de hormona paratiroidea (PTH).

Los términos "dosis terapéuticamente efectiva" y "cantidad terapéuticamente efectiva", como se usan en la presente memoria, significan una cantidad que desencadena una respuesta biológica o medicinal en un sistema de tejido, animal o ser humano buscada por un investigador, médico u otro facultativo, que incluye el alivio o mejora de los signos de la enfermedad o trastorno que se está tratando, por ejemplo, una cantidad de AMG 416 que provoca una

reducción deseada del nivel elevado de PTH.

El término "temperatura ambiente" como se usa en la presente memoria hace referencia a una temperatura de aproximadamente 25 °C. El almacenamiento en "condiciones refrigeradas" como se usa en la presente memoria hace referencia a almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" son intercambiables y hacen referencia a un polímero de aminoácidos, unidos típicamente entre sí a través de enlaces peptídicos o disulfuro. Los términos se aplican también a polímeros de aminoácidos en que uno o más residuos aminoacídicos son un análogo o mimético de un correspondiente aminoácido de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. Los términos pueden abarcar también polímeros de aminoácidos que se han modificado, *p.ej.*, mediante la adición de residuos de carbohidrato para formular glicoproteínas, o se han fosforilado. Los péptidos, polipéptidos y proteínas pueden producirse mediante una síntesis en fase líquida o síntesis en fase sólida o mediante una célula genomanipulada o recombinante.

Una "variante" de un péptido o polipéptido comprende una secuencia aminoacídica donde uno o más residuos aminoacídicos se insertan, eliminan y/o sustituyen en la secuencia aminoacídica respecto a otra secuencia polipeptídica. Las variantes incluyen proteínas de fusión.

Un "derivado" de un péptido o polipéptido es un péptido o polipéptido que se ha modificado químicamente de alguna manera distinta de las variantes de inserción, delección o sustitución, *p.ej.*, mediante conjugación con otro resto químico. Tal modificación puede incluir la adición covalente de un grupo a las terminaciones amino y/o carboxi del péptido o polipéptido, *p.ej.*, la acetilación del extremo amino y/o la amidación de la terminación carboxi de un péptido o polipéptido.

El término "aminoácido" incluye su significado normal en la materia. Los 20 aminoácidos de origen natural y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase, Immunology-A Synthesis, 2ª edición, (E. S. Golub and D. R. Green, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, Mass. (1991), que se incorpora a la presente memoria como referencia con cualquier fin. Los estereoisómeros, (*p.ej.*, D-aminoácidos) de los 19 aminoácidos convencionales (excepto la glicina), aminoácidos no naturales tales como aminoácidos [alfa], [alfa]-disustituidos, N-alquilaminoácidos y otros aminoácidos no convencionales pueden ser también componentes adecuados para polipéptidos y se incluyen en la frase "aminoácido". Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: homocisteína, ornitina, 4-hidroxiprolina, [gamma]-carboxiglutamato, [épsilon]-N,N-trimeil-lisina, [épsilon]-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, [sigma]-N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (*p.ej.*, 4-hidroxiprolina) En la notación polipeptídica usada en la presente memoria, la terminación amino está a la izquierda y la terminación carboxilo está a la derecha, de acuerdo con el uso y convención estándares.

Un "sujeto" o "paciente" como se usa en la presente memoria puede ser cualquier mamífero. En una realización típica, el sujeto o paciente es un ser humano.

Un "tampón" como se usa en la presente memoria hace referencia a una composición, donde la composición comprende un ácido débil y su base conjugada (habitualmente como una sal de base conjugada), una base débil y su ácido conjugado o mezclas de los mismos. Los especialistas en la materia reconocerían fácilmente una variedad de tampones que podrían usarse en las formulaciones usadas en la invención. Los tampones típicos incluyen, pero sin limitación, ácidos débiles o bases débiles farmacéuticamente aceptables o mezclas de los mismos. Los tampones farmacéuticamente ejemplares incluyen acetato (*p.ej.*, acetato de sodio) y succinato (*p.ej.*, succinato de sodio).

La frase "ácido débil" es un ácido químico que no se ioniza completamente en solución acuosa; es decir, si el ácido se representa por la fórmula general HA, entonces en solución acuosa se forma A⁻, pero sigue permaneciendo una cantidad significativa de HA no disociado. La constante de disociación de ácido (K_a) de un ácido débil varía entre $1,8 \times 10^{-16}$ y 55,5.

La frase "ácido débil" es una base química que no se ioniza totalmente en solución acuosa; es decir, si la base se representaba por la fórmula general B, entonces en solución acuosa se forma BH⁺, pero sigue permaneciendo una cantidad significativa de B no protonado. La constante de disociación de ácido (K_a) del ácido débil conjugado resultante BH⁺ varía entre $1,8 \times 10^{-16}$ y 55,5.

La frase "ácido conjugado" es el miembro ácido, HX⁺, de un par de dos compuestos (HX⁺, X) que se transforman entre sí mediante ganancia o pérdida de un protón.

La frase "base conjugada" es el miembro básico, X-, de un par de dos compuestos (HX, X-) que se transforman entre sí mediante ganancia o pérdida de un protón.

- 5 La frase "sal básica conjugada" es la sal iónica que comprende una base conjugada X- y un contraión cargado positivamente.

La frase "sistema tampón" significa una mezcla que contiene al menos dos tampones.

- 10 El término "c.s." significa añadir una cantidad suficiente para conseguir la función deseada, p.ej. para llevar la solución al volumen deseado (es *decir*, 100 %).

La frase "modificador de la tonicidad" significa una sustancia inerte farmacéuticamente aceptable que puede añadirse a la formulación para ajustar la tonicidad de la formulación. Los modificadores de la tonicidad adecuados

- 15 para esta invención incluyen, pero sin limitación, cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol o glicerina y otros modificadores de la tonicidad farmacéuticamente aceptables.

II. Realizaciones

- 20 La presente divulgación se refiere a formulaciones líquidas que comprenden un péptido agonista del receptor sensor de calcio, donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 5,0. En una realización preferida, la presente divulgación se refiere a una formulación líquida que comprende AMG 416, donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 5,0. Se describen AMG 416 y su preparación en la pat. internacional nº de publicación WO 2011/014707. Por ejemplo, AMG 416 puede ensamblarse mediante
- 25 síntesis en fase sólida a partir de los correspondientes D-aminoácidos protegidos con Fmoc. Después de la escisión de la resina, el material puede tratarse con Boc-L-Cys(NPyS)-OH para formar el enlace disulfuro. El grupo Boc puede retirarse entonces con ácido trifluoroacético (TFA), purificarse el producto resultante por cromatografía líquida a alta presión en fase inversa (HPLC) y aislarse en forma de sal de TFA por liofilización. La sal de TFA puede convertirse entonces en una sal farmacéuticamente aceptable llevando a cabo un procedimiento de intercambio salino posterior. Tales procedimientos son bien conocidos en la materia e incluyen, *p.ej.*, una técnica de intercambio iónico, seguida opcionalmente de purificación del producto resultante (por ejemplo, por cromatografía líquida en fase inversa u ósmosis inversa).

- Las formulaciones divulgadas en la presente memoria se describen principalmente en términos del péptido terapéutico, AMG 416, como ingrediente activo. Sin embargo, como apreciará fácilmente el especialista en la materia, la presente divulgación se extiende también a variantes y derivados de AMG 416.

- Por ejemplo, en una realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-D-cisteinil-D-alanil-D-arginil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con D-cisteína. En otra realización, la formulación
- 40 divulgada puede usarse también con disulfuro de *N*-acetil-D-cisteinil-D-alanil-D-arginil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con *N*-acetil-D-cisteína. En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-D-cisteinil-D-alanil-D-arginil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con *N*-acetil-L-cisteína.

- En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-L-cisteinil-L-alanil-L-arginil-L-arginil-L-arginil-L-alanil-L-arginamida con D-cisteína. En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-L-cisteinil-L-alanil-L-arginil-L-arginil-L-arginil-L-alanil-L-arginamida con L-cisteína. En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-L-cisteinil-L-alanil-L-arginil-L-arginil-L-arginil-L-alanil-L-arginamida con *N*-acetil-D-cisteína. En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-L-cisteinil-L-alanil-L-arginil-L-arginil-L-arginil-L-alanil-L-arginamida con *N*-acetil-L-cisteína.

- En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-D-cisteinil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con D-cisteína. En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-D-cisteinil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con L-cisteína. En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-D-cisteinil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con *N*-acetil-D-cisteína. En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-D-cisteinil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con *N*-acetil-L-cisteína.

- 60 En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-L-cisteinil-L-

arginil-L-arginil-L-alanil-L-arginil-L-alanil-L-arginamida con D-cisteína. En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-L-cisteinil-L-arginil-L-arginil-L-alanil-L-arginil-L-alanil-L-arginamida con L-cisteína. En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-L-cisteinil-L-arginil-L-arginil-L-alanil-L-arginil-L-alanil-L-arginamida con *N*-acetil-D-cisteína. En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con: Disulfuro de *N*-acetil-L-cisteinil-L-arginil-L-arginil-L-alanil-L-arginil-L-alanil-L-arginamida con *N*-acetil-L-cisteína.

En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con uno o más de los compuestos proporcionados en la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 8, Tabla 9 y/o Tabla 10 de la pat. internacional nº de publicación WO 2011/014707. En otra realización, las formulaciones divulgadas pueden usarse también con uno o más de los compuestos descritos en la pat. internacional nº de publicación WO 2011/014707.

En algunas realizaciones, la formulación contiene una cantidad terapéuticamente efectiva del ingrediente activo (*p.ej.*, AMG 416). Una cantidad terapéuticamente efectiva del ingrediente activo en cualquier realización dada de la formulación de la presente divulgación dependerá del volumen de la formulación para suministrar a un sujeto dado, así como de la edad y el peso del sujeto, y de la naturaleza de la dolencia o trastorno que se esté tratando. Dependiendo de la forma de dosificación, en algunos casos puede proporcionarse una cantidad terapéuticamente efectiva al paciente en una administración, mientras que en otros casos puede requerirse una pluralidad de administraciones.

La formulación líquida de la presente divulgación es una composición farmacéutica adecuada para administración intravenosa, intraarterial, intramuscular y subcutánea. En una realización preferida, la formulación líquida es adecuada para administración por vía intravenosa u otras parenterales. Preferiblemente, la formulación líquida es una solución estéril acuosa. Típicamente, el disolvente es agua de grado inyectable o una mezcla de agua y uno o más de otros disolventes miscibles con agua, tales como propilenglicol, polietilenglicol, y etanol. Se prefiere el uso de agua estéril desionizada como disolvente. Sin embargo, pueden emplearse otros disolventes que sean adecuados y convencionales para preparaciones farmacéuticas.

La formulación contiene típicamente de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml del ingrediente activo (*p.ej.*, AMG 416), de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml del ingrediente activo, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml del ingrediente activo, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml del ingrediente activo o de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml del ingrediente activo. En algunas realizaciones, la formulación contiene aproximadamente 1 mg/ml del ingrediente activo, aproximadamente 2 mg/ml del ingrediente activo, aproximadamente 2,5 mg/ml del ingrediente activo, aproximadamente 5 mg/ml del ingrediente activo, aproximadamente 10 mg/ml del ingrediente activo o aproximadamente 20 mg/ml del ingrediente activo. En otra realización, la formulación contiene de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml del ingrediente activo, de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml del ingrediente activo, de 0,5 mg/ml a 15 mg/ml del ingrediente activo, de 1 mg/ml a 10 mg/ml del ingrediente activo o de 2 mg/ml a 5 mg/ml del ingrediente activo. En una realización preferida, la formulación contiene de 1 mg/ml a 10 mg/ml del ingrediente activo. En otra realización preferida, la formulación contiene de 2 mg/ml a 5 mg/ml del ingrediente activo.

La formulación tiene típicamente un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 5,0, un pH de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,5, un pH de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,0, un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,5 o un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,6. En algunas realizaciones, la formulación tiene un pH de aproximadamente 2, un pH de aproximadamente 2,5, un pH de aproximadamente 3,0, un pH de aproximadamente 3,3, un pH de aproximadamente 3,5 o un pH de aproximadamente 4,0. En algunas realizaciones, la formulación tiene un pH de 2,0 a 5,0, un pH de 2,5 a 4,5, un pH de 2,5 a aproximadamente 4,0, un pH de 3,0 a 3,5 o un pH de 3,0 a 3,6.

Como se describe más completamente en los ejemplos, la estabilidad de AMG 416 depende del pH de la solución. Los presentes inventores han encontrado que los dos productos de degradación principales son el resultado de la desamidación C-terminal y la formación de homodímero. Además, los presentes inventores han encontrado que el curso temporal de degradación por estas rutas es función del pH. Véase el Ejemplo 6. A bajo pH, predomina la degradación por desamidación C-terminal (véase la Figura 10), mientras que a pH superior predomina la degradación por formación de homodímero (véase la Figura 11). Por tanto, la formación de los dos productos de degradación principales tienen la relación opuesta entre pH y extensión de la degradación. Estas tendencias opuestas son la base de los datos de estabilidad global en el intervalo de valores de pH y apoyan la identificación de aproximadamente pH 3,0 a 3,5 como el pH de estabilidad máxima de las soluciones de AMG 416.

- Típicamente, la formulación contiene un agente de tamponación fisiológicamente aceptable que mantiene el pH de la formulación en el intervalo deseado. En una formulación, el tampón mantiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 5,0, un pH de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,5, un pH de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,0, un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,5 o un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,6. En algunas realizaciones, el tampón mantiene un pH de aproximadamente 2, un pH de aproximadamente 2,5, un pH de aproximadamente 3,0, un pH de aproximadamente 3,3, un pH de aproximadamente 3,5 o un pH de aproximadamente 4,0. En algunas realizaciones, el tampón mantiene un pH de 2,0 a 5,0, un pH de 2,5 a 4,5, un pH de 2,5 a aproximadamente 4,0, un pH de 3,0 a 3,5 o un pH de 3,0 a 3,6.
- 10 Cualquier tampón que sea capaz de mantener el pH de la formulación a cualquier pH o dentro de cualquier intervalo de pH proporcionado anteriormente es adecuado para uso en las formulaciones de la presente divulgación, a condición de que no reaccione con otros componentes de la formulación, cause la formación de precipitados visibles o cause de otro modo que el ingrediente activo se desestabilice químicamente. El tampón usado en la presente formulación comprende típicamente un componente seleccionado del grupo consistente en succinato, citrato, malato, edetato, histidina, acetato, adipato, aconitato, ascorbato, benzoato, carbonato, bicarbonato, maleato, glutamato, lactato, fosfato y tartrato o una mezcla de estos tampones. En una realización preferida, el tampón comprende succinato, *p.ej.*, succinato de sodio.
- 15 La concentración del tampón se selecciona de modo que proporcione una estabilización del pH así como suficiente capacidad de tamponación. En una realización, está presente el tampón en la formulación a una concentración de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mmol/l, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 50 mmol/l, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mmol/l o de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mmol/l. En otras realizaciones, está presente el tampón a aproximadamente 5 mmol/l, a aproximadamente 10 mmol/l, a aproximadamente 15 mmol/l o aproximadamente 20 mmol/l. En otras realizaciones, está presente el tampón en la formulación a una concentración de 0,5 a 100 mmol/l, de 0,75 a 50 mmol/l, de 1 a 20 mmol/l o de 10 a 20 mmol/l. En una realización preferida, está presente el tampón a aproximadamente 10 mmol/l. En otra realización preferida, el tampón es succinato presente a aproximadamente 10 mmol/l.
- Desde el punto de vista de la compatibilidad de la formulación líquida con la administración intravenosa, sería deseable que el pH de la formación líquida fuera lo más cercano posible al pH fisiológico. Las formulaciones líquidas que tienen un pH que es lejano al pH fisiológico o que están fuertemente tamponadas pueden causar dolor o incomodidad en la administración. Como se ha discutido, las formulaciones de AMG 416 a pH fisiológico o mayor no permanecerían estables durante un periodo prolongado de tiempo. Por lo tanto, en una realización preferida, la formulación líquida de la presente divulgación se tampona débilmente de modo que la cantidad inyectada se neutralice rápidamente por los fluidos fisiológicos del cuerpo del sujeto. Es sorprendente que se mantenga una buena estabilidad y buen control del pH con la baja concentración de tampón. En una realización preferida, se usa la sal HCl de AMG 416 en la preparación de la formulación líquida para minimizar la capacidad tamponadora. Debido a que el HCl es un ácido fuerte, no actúa como tampón. Esto proporciona una ventaja frente al uso de un ácido más débil tal como un ácido acético. Usar la sal acetato de AMG 416, por ejemplo, proporcionaría por sí misma cierta capacidad tamponadora y permitiría menos flexibilidad para fijar la capacidad tamponadora de la formulación y puede dar como resultado una formulación que es más resistente a la neutralización en el cuerpo y por lo tanto peor tolerada. Debido a que AMG 416 es un péptido policatiónico, el efecto se potenciaría en comparación con la mayoría de péptidos que tienen un carácter más neutro.
- 45 Es generalmente deseable que una formulación que se administra por vía intravenosa o parenteral sea isotónica con los fluidos corporales. En algunas realizaciones, la formulación de la presente divulgación contiene un modificador de la tonicidad fisiológicamente aceptable. Los modificadores de la tonicidad útiles en la presente divulgación pueden incluir cloruro de sodio, manitol, sacarosa, dextrosa, sorbitol, cloruro de potasio o mezclas de los mismos. En una realización preferida, el tonificante es cloruro de sodio.
- 50 Cuando está presente un agente tonificante, está preferiblemente presente en una cantidad suficiente para hacer la formulación líquida aproximadamente isótonica con los fluidos corporales (*es decir*, aproximadamente 270 a aproximadamente 300 mOsm/l) y adecuada para inyección parenteral a un mamífero, tal como un sujeto humano, en tejidos dérmicos, subcutáneos o intramusculares o IV. La isotonicidad puede medirse, por ejemplo, usando un osmómetro de presión de vapor o de tipo congelación de hielo. Dependiendo de las concentraciones de los demás componentes en la formulación, el cloruro de sodio está presente en la formulación a una concentración de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9,5 mg/ml o de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 9,0 mg/ml. En una realización, está presente cloruro de sodio en la formulación a una concentración de aproximadamente 8,5 mg/ml. En otras realizaciones, está presente cloruro de sodio en la formulación a una concentración de 7,0 a 10 mg/ml, de 7,5 a 9,5 mg/ml o de 8,0 a 9,0 mg/ml.

Las formulaciones de la presente divulgación pueden incluir otros vehículos, excipientes o adyuvantes farmacéuticos convencionales. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención pueden incluir agentes estabilizantes (p.ej., EDTA y/o tiosulfato de sodio) o conservantes (p.ej., alcohol bencílico). Además, las formulaciones de la presente divulgación pueden incluir agentes medicinales y/o farmacéuticos adicionales. Por ejemplo, en procedimientos de tratamiento de SHPT en pacientes de hemodiálisis con CKD-MBD, puede administrarse AMG 416 con uno o más agentes activos en osteodistrofia renal, tal como terapia de vitamina D (p.ej., paricalcitol), que es un tratamiento establecido para SHPT.

- 10 En una realización, la formulación tiene menos de un 5 % de degradación cuando se almacena a aproximadamente 2-8 °C durante 1 año. En otra realización, la formulación tiene menos de un 5 % de degradación cuando se almacena a temperatura ambiente durante hasta 1 año. En otra realización, la formulación tiene menos de un 10 % de degradación cuando se almacena a aproximadamente 2-8 °C durante 1 años. En otra realización, la formulación tiene menos de un 10 % de degradación cuando se almacena a temperatura ambiente durante 1 año. En otra realización, la formulación tiene menos de un 5 % de degradación cuando se almacena a aproximadamente 2-8 °C durante 2 años. En otra realización, la formulación tiene menos de un 5 % de degradación cuando se almacena a temperatura ambiente durante 2 años. En otra realización, la formulación tiene menos de un 10 % de degradación cuando se almacena a aproximadamente 2-8 °C durante 2 años. En otra realización, la formulación tiene menos de un 10 % de degradación cuando se almacena a temperatura ambiente durante 2 años.

- 20 En una realización, la formulación líquida comprende de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml del péptido terapéutico, un tampón que mantiene la formulación a un pH de 2,0 a 5,0 y suficiente concentración de cloruro de sodio para proporcionar una formulación aproximadamente isotónica. En otra realización, la formulación líquida comprende de 1 mg/ml a 15 mg/ml del péptido terapéutico, un tampón que mantiene la formulación a un pH de 2,5 a 4,5 y suficiente concentración de cloruro de sodio para proporcionar una formulación aproximadamente isotónica. En otra realización, la formulación líquida comprende de 2,5 mg/ml a 10 mg/ml del péptido terapéutico, un tampón que mantiene la formulación a un pH de 2,5 a 4,0 y suficiente concentración de cloruro de sodio para proporcionar una formulación aproximadamente isotónica. En otra realización, la formulación líquida comprende de 2,5 mg/ml a 5 mg/ml del péptido terapéutico, un tampón que mantiene la formulación a un pH de 2,5 a 3,5 y suficiente concentración de cloruro de sodio para proporcionar una formulación aproximadamente isotónica. En otra realización, la formulación líquida comprende de 2 mg/ml a 20 mg/ml del péptido terapéutico en solución acuosa, un tampón succinato que mantiene la formulación a un pH de aproximadamente 3,0 a 3,5 y suficiente concentración de cloruro de sodio para proporcionar una formulación aproximadamente isotónica.

- 35 En una realización, la formulación líquida comprende de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml de AMG 416, un tampón que mantiene la formulación a un pH de 2,0 a 5,0 y suficiente concentración de cloruro de sodio para proporcionar una formulación aproximadamente isotónica. En otra realización, la formulación líquida comprende de 1 mg/ml a 15 mg/ml de AMG 416, un tampón que mantiene la formulación a un pH de 2,5 a 4,5 y suficiente concentración de cloruro de sodio para proporcionar una formulación aproximadamente isotónica. En otra realización, la formulación líquida comprende de 2,5 mg/ml a 10 mg/ml de AMG 416, un tampón que mantiene la formulación a un pH de 2,5 a 4,0 y suficiente concentración de cloruro de sodio para proporcionar una formulación aproximadamente isotónica. En otra realización, la formulación líquida comprende de 2,5 mg/ml a 5 mg/ml de AMG 416, un tampón que mantiene la formulación a un pH de 2,5 a 3,5 y suficiente concentración de cloruro de sodio para proporcionar una formulación aproximadamente isotónica. En otra realización, la formulación líquida comprende de 2 mg/ml a 20 mg/ml de AMG 416, un tampón succinato que mantiene la formulación a un pH de aproximadamente 3,0 a 3,5 y suficiente concentración de cloruro de sodio para proporcionar una formulación aproximadamente isotónica.

- En una realización preferida, las formulaciones de la presente divulgación se preparan colocando una cantidad de tampón calculada para generar el pH deseado en un recipiente adecuado y disolviéndolo con agua para inyecciones (WFI), añadiendo una cantidad de material (p.ej., la sal clorhidrato de AMG 416) suficiente para conseguir la concentración deseada del ingrediente activo (p.ej., AMG 416), añadiendo una cantidad de modificador de la tonicidad (o mezcla de modificaciones de la tonicidad) calculada para volver la formulación resultante isotónica con los fluidos corporales y añadiendo la cantidad de WFI necesaria para llevar el volumen total a la concentración deseada. Después de mezclar los ingredientes, se ajusta el pH a aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,5 y se mezclan de nuevo los componentes.

- Si se requiere un ajuste para conseguir el intervalo de pH deseado, el valor de pH puede ajustarse mediante soluciones adecuadas; con soluciones ácidas si se indica una reducción del valor de pH y con soluciones alcalinas si se indica un aumento del valor de pH. Son ejemplos no limitantes de soluciones ácidas adecuadas, p.ej., ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido cítrico e hidrogenofosfato de sodio o potasio. Son ejemplos no limitantes de

soluciones alcalinas adecuadas hidróxidos alcalinos y alcalinotérreos, carbonatos alcalinos, acetatos alcalinos, citratos alcalinos e hidrogenofosfatos dialcalinos, *p.ej.*, hidróxido de sodio, acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato de sodio, hidrogenofosfato de disodio o dipotasio o amoniaco.

- 5 El procedimiento se lleva a cabo típicamente a una temperatura de aproximadamente 2-8 °C a aproximadamente 50 °C y a presión atmosférica. La formulación resultante puede transferirse entonces a envases de dosificación unitaria o multidosis (tales como botellas, viales, ampollas o jeringuillas prellenadas) para almacenamiento antes del uso.
- 10 Las formulaciones pueden prepararse y administrarse como se describe anteriormente. Como alternativa, las formulaciones pueden administrarse después de disolver, dispersar, etc. la formulación (preparada como se describe anteriormente) en un vehículo tal como, por ejemplo, un fluido de infusión o en la sangre/fluido devuelto al paciente durante hemodiálisis (*p.ej.*, durante el retrolavado).
- 15 La preparación de formulaciones líquidas de acuerdo con la presente divulgación es conocida, o será evidente para los especialistas en la materia, por ejemplo véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, 17ª edición, 1985.

EJEMPLOS

- 20 Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados conseguidos, se proporcionan solo con fines ilustrativos y no han de considerarse como limitantes del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1

- 25 **Solubilidad de AMG 416 en solución salina tamponada con succinato**

En este estudio, se investigó la solubilidad de AMG 416 en solución salina tamponada con succinato. Se disolvió HCl de AMG 416 (103 mg de polvo, 80 mg de péptido) en 200 µl de solución salina tamponada con succinato (succinato 30 25 mM, 0,9 % de solución salina, pH 4,5). Después de una breve agitación con vórtex, se obtuvo una solución transparente con una concentración nominal de 400 mg/ml. Debido que no se determinó la expansión del volumen de solución, la solubilidad de AMG 416 puede afirmarse conservadoramente como de al menos 200 g/ml. Aunque no se determinó la solubilidad máxima en este experimento, AMG 416 es soluble en solución salina tamponada con succinato a pH 4,5 hasta concentraciones de al menos 200 mg/ml.

- 35 **EJEMPLO 2**

Estudio de estabilidad dependiente de la concentración

- 40 En este estudio, se investigó la estabilidad de AMG 416 en un intervalo de concentraciones en solución salina tamponada con succinato (pH 4,5). Se diluyó adicionalmente la solución de AMG 416 200 mg/ml del Ejemplo 1, *supra*, con 200 µl de solución salina tamponada con succinato (pH 4,5) a una concentración nominal de 200 mg/ml, que se diluyó en serie con solución salina tamponada con succinato (pH 4,5) a 66, 20, 6,7, 2,2 y 0,67 mg/ml. Se mantuvieron las muestras a temperatura ambiente (es decir, aproximadamente 25 °C) y se analizaron las alícuotas 45 por HPLC a intervalos de hasta 29 días. Se incubó una segunda serie de muestras de AMG 416 que cubren el intervalo de concentración de 20 a 0,67 mg/ml a 40 °C y se analizaron de la misma manera.

Se proporciona la pureza en el punto temporal de 29 días para muestras a temperatura ambiente y a 40 °C en las Tablas 1 y 2, respectivamente. Los resultados proporcionan un perfil de estabilidad de AMG 416 en función de la 50 concentración y la temperatura.

Tabla 1

Estabilidad a TA de AMG 416 en solución salina tamponada con succinato 25 mM (pH 4,5)						
Concentración (mg/ml)	Pureza con el tiempo (días)					
	0	1	2	5	13	29
200	99,8	99,6	98,4	96,4	89,0	63,8
66	99,6	99,4	99,0	98,1	97,7	91,5
20	99,6	99,7	99,7	99,6	99,3	98,7
6,7	99,4	99,6	99,5	99,5	99,3	98,9
2,2	99,3	99,2	99,3	99,4	99,3	99,1

0,67	99,4	99,5	99,5	99,7	99,5	99,3
------	------	------	------	------	------	------

Tabla 2

Estabilidad a 40 °C de AMG 416 en solución salina tamponada con succinato 25 mM (pH 4,5)						
	Pureza con el tiempo (días)					
Concentración (mg/ml)	0	1	2	5	13	29
20	99,6	99,1	98,1	n.d.	90,5	72,9
6,7	99,4	99,1	98,7	n.d.	95,2	90,0
2,2	99,3	99,3	99,0	98,4	97,0	94,3
0,67	99,4	99,4	99,3	99,0	97,2	94,4

Se muestra el curso temporal de la degradación de AMG 416 en función de la concentración a temperatura ambiente en la Figura 1A. En la Figura 1B, se aumenta la escala para ilustrar más claramente el patrón de degradación a concentraciones de fármaco de 20 mg/ml y menores. Se muestra el curso temporal de la degradación de AMG 416 en función de la concentración a 40 °C en la Figura 2. Los datos muestran que la estabilidad de la solución de AMG 416 está relacionada con la concentración en el intervalo de estudio de 0,67 mg/ml a 200 mg/ml. Los datos muestran también que la estabilidad de la solución de AMG 416 está relacionada con la temperatura de incubación.

10

La Tabla 3 muestra las predicciones de la extensión de la degradación para soluciones de diversas concentraciones de AMG 416 a temperatura ambiente, basadas en la extensión de la degradación a 29 días de almacenamiento a temperatura ambiente a pH 4,5 SBS. Se extrapoló el dato de 29 días a temperatura ambiente de la Tabla 1 al periodo de tiempo afirmado suponiendo una cinética de degradación lineal. Se extrapoló el dato de temperatura ambiente a 5 °C. Se supuso una diferencia de 20 °C, equivalente a una tasa 4 veces menor de degradación. Se llevaron a cabo las extrapolaciones usando una simple aplicación de la ecuación de Arrhenius, donde una subida de 10 °C de temperatura proporciona un aumento de 2 veces de la tasa de reacción, suponiendo el mismo mecanismo de reacción y que la energía de activación para cada reacción relevante es de aproximadamente 50 kJ/mol.

15

20 Los valores sombreados indican condiciones de concentración/almacenamiento que tienen menos de un 10 % de degradación, que pueden ser preferibles para una formulación líquida.

Tabla 3

Predicciones de estabilidad para soluciones de AMG416

Concentración (mg/ml)	Extensión de la degradación predicha a:			
	2 años a TA	1 año a TA	2 años a 5 °C	1 año a 5 °C
66	>100	>100	50,1	25,0
20	20,9	10,4	5,2	2,6
6,7	13,9	7,0	3,5	1,7
2,2	5,2	2,6	1,3	0,7
0,67	2,7	1,4	0,7	0,3

25 La comparación de los datos mostrados en las Tablas 1 y 2 permite la valoración del aumento de temperatura como herramienta para predecir la estabilidad a largo plazo de las soluciones de AMG 416. El dato de 0,67 a 20 mg/ml se presenta en la Tabla 4, *infra*, y muestra la aceleración de la degradación a 40 °C, que es notablemente mayor que la predicha por Arrhenius (con las suposiciones descritas, *supra*). Esto sugiere que los datos de estabilidad acelerada predecirán una mayor extensión de la degradación que la observada a la temperatura de almacenamiento real.

30

Tabla 4

Dependencia de la temperatura y la concentración de la degradación de AMG 416 en solución a pH 4,5				
Concentración (mg/ml)	Degradación a los 29 días, TA (%)	Degradación a los 29 días, 40 °C (%)	Aceleración TA --> 40 °C (veces)	Aceleración predicha (veces)
20	0,9	26,7	29,7	4
6,7	0,5	9,4	18,8	4
2,2	0,2	5,0	25,0	4
0,67	0,1	5,0	50,0	4

EJEMPLO 3

5 Estabilidad de las formulaciones líquidas de AMG 416 en el intervalo de pH

En este estudio, se determinó la estabilidad de las formulaciones líquidas de AMG 416 a una concentración de 10 mg/ml en un intervalo de pH en solución salina tamponada con succinato. Se disolvió HCl de AMG 416 (257 mg de polvo) en 20 ml de solución salina tamponada con succinato a pH 4,5, proporcionando una concentración de péptido 10,0 mg/ml (ajustada para el contenido de péptido del polvo). Se dividió uniformemente la solución en 5 porciones de 4 ml que se ajustaron a pH 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente, con NaOH y HCl según fuera necesario. Se tomaron tres soluciones alícuotas de 1 ml de cada porción y se incubaron a 2-8 °C, temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) y 40 °C, respectivamente. Se diluyó la solución de 1 ml restante de cada alícuota con solución salina tamponada con succinato a pH 4,5 hasta 4 ml de concentración de péptido 2,5 mg/ml, se ajustó el pH y se incubó de la misma manera. Se recuperaron las muestras de acuerdo con el programa y se diluyeron con agua desionizada hasta 1,0 mg/ml para análisis de HPLC.

Se proporciona la pureza en el punto temporal de 28 días para todas las muestras probadas en la Tabla 5 (nota: el valor de pureza de partida era de 99,3 % para este estudio). Los resultados proporcionan un perfil de estabilidad en función de pH, temperatura y concentración.

Tabla 5

Pureza en el punto temporal de 28 días para soluciones de AMG 416						
	10 mg/ml			2,5 mg/ml		
	2-8 °C	TA	40 °C	2-8 °C	TA	40 °C
pH 2	99,1	98,7	94,0	98,9	98,7	89,8
pH 3	99,4	99,1	98,2	99,1	99,0	97,2
pH 4	99,4	98,6	85,0	99,2	98,9	92,2
pH 5	99,0	93,8	64,4	98,9	96,1	73,0
pH 6	96,9	71,8	53,6	97,0	80,0	52,9

Se muestra el curso temporal de la degradación de AMG 416 en función del pH en la Figura 3. En ambas soluciones de 10 mg/ml (Figura 3A) y 2,5 mg/ml (Figura 3B), se observa la menor degradación a pH 3. En ambas soluciones, la degradación a pH 6 avanza más rápidamente, aproximándose la pureza al 50 % el punto temporal del día 29. El análisis de HPLC mostró que un producto de degradación principal a pH 2 diferente del observado a pH mayor de 3. A menor pH, la degradación es predominantemente por desamidación por hidrólisis, y a un mayor pH, la degradación es predominantemente la formación del homodímero.

Se muestra el perfil de estabilidad en función del pH en el punto temporal de 28 días en la Figura 4. Puede verse de nuevo tanto a 10 mg/ml (Figura 4A) como a 2,5 mg/ml (Figura 4B) que en este conjunto de experimentos el pH de menor degradación es aproximadamente 3,0. Además, las disminuciones de pureza están relacionadas con la temperatura a todos los niveles de pH, observándose la menor degradación en las muestras incubadas a 2-8 °C y observándose la mayor degradación en las muestras incubadas a 40 °C.

Basándose en la extensión de la degradación a los 28 días, se calcularon las predicciones de la extensión de la degradación como se describe *supra*. Se proporcionan las predicciones para la solución de 10 mg/ml en la Tabla 6 y se proporcionan las predicciones para la de 2,5 mg/ml en la Tabla 7. Los valores sombreados indican condiciones que muestran menos de un 10 % de degradación, y que pueden preferirse para una formulación líquida. Las condiciones donde la muestra a los 28 días muestra una pureza ligeramente mayor que el dato inicial se presentan como 0,0 % para todas las proyecciones.

Estas extrapolaciones sugieren menos de un 10 % de degradación después de 2 años a temperatura ambiente para las soluciones de 2,5 o 10 mg/ml a pH 3. En general, el dato de mayor temperatura predice una mayor degradación a los 2 años que el dato de menor temperatura. Por tanto, para los estudios de 10 mg/ml (Tabla 6), aunque se predice que a pH 3 la degradación será menor del 10 % para todos los datos de temperatura, el dato de 2-8 °C predice una menor extensión de degradación que a las temperaturas mayores, y de hecho a 2-8 °C el dato a pH 4 también apoya menos de un 10 % de degradación. De forma similar, a 2,5 mg/ml, se predice que un intervalo de pH de 2-4 tiene menos de un 10 % de degradación durante 2 años a TA cuando se extrapola a partir del dato de 2-8 °C.

Tabla 6

Predicciones de estabilidad para soluciones de AMG 416 10 mg/ml basada en la extensión de la degradación a 28 días

2-8°C	Degradación observada a 28 días (%)	Degradación calculada			
		A 360 días (%)	A 1 año a TA (%)	A 2 años a 5 °C (%)	A 2 años a TA (%)
pH = 2	0,3	3,8	15,4	7,7	30,7
pH = 3	-0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
pH = 4	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
pH = 5	0,3	3,5	13,8	6,9	27,6
pH = 6	1,9	23,9	95,7	47,8	>100

TA	Degradación observada a 28 días (%)	Degradación calculada			
		A 360 días (%)	A 1 año a TA (%)	A 2 años a 5 °C (%)	A 2 años a TA (%)
pH = 2	0,6	8,1	8,1	4,0	16,1
pH = 3	0,2	2,6	2,6	1,3	5,1
pH = 4	0,7	8,6	8,6	4,3	17,1
pH = 5	5,6	71,4	71,4	35,7	>100
pH = 6	26,9	>100	>100	>100	>100

40°C	Degradación observada a 28 días (%)	Degradación calculada			
		A 360 días (%)	A 1 año a TA (%)	A 2 años a 5 °C (%)	A 2 años a TA (%)
pH = 2	5,3	68,4	17,1	8,6	34,2
pH = 3	1,1	14,1	3,5	1,8	7,0
pH = 4	14,3	>100	45,8	22,9	91,7
pH = 5	34,9	>100	>100	55,9	>100
pH = 6	45,1	>100	>100	72,2	>100

10

Tabla 7

Predicciones de estabilidad para soluciones de AMG 416 2,5 mg/ml basadas en la extensión de la degradación a los 28 días.					
2-8 °C	Degradación observada a los 28 días (%)	Degradación calculada (%)			
		1 año a 2-8 °C	1 año a TA	2 años a 2-8 °C	2 años a TA
pH = 2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

pH = 3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
pH = 4	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
pH = 5	0,2	2,9	11,8	5,9	23,5
pH = 6	0,8	10,7	43,0	21,5	86,0
	Degradación observada a los 28 días (%)	Degradación calculada (%)			
TA		1 año	1 año a TA	2 años a 2-8 °C	2 años a TA
pH = 2	0,6	7,9	7,9	4,0	15,9
pH = 3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
pH = 4	0,3	3,6	3,6	1,8	7,2
pH = 5	2,9	37,7	37,7	18,9	75,5
pH = 6	18,1	231,0	231,0	115,5	462,1
	Degradación observada a los 28 días (%)	Degradación calculada (%)			
40 °C		1 año	1 año a TA	2 años a 2-8 °C	2 años a TA
pH = 2	9,1	116,5	29,1	14,6	58,3
pH = 3	1,8	22,5	5,6	2,8	11,3
pH = 4	6,9	88,7	22,2	11,1	44,3
pH = 5	26,1	333,6	83,4	41,7	166,8
pH = 6	45,0	575,7	143,9	72,0	287,8

La Tabla 8 presenta el efecto de aceleración de la temperatura para estos datos de modo similar a la Tabla 4, *supra*. Esto indica de nuevo que la elevación de temperatura tiende a proporcionar una mayor aceleración de la degradación que la esperada por la extrapolación basada en la simple aplicación del principio de Arrhenius.

Tabla 8

Aceleración de la temperatura en función del pH.									
	Deg. a 28 días a 10 mg/ml			Aceleración: Dato de 10 mg/ml					
	2-8 °C	TA	40 °C	TA /	predicho a 2-8	40 °C/ 28	predicho a 2-8	40 °C/TA	predicho
pH 2	0,2	0,6	5,3	3	4	28	16	9	4
pH 3	-0,1	0,2	1,1	> 2	4	> 10	16	6	4
pH 4	-0,1	0,7	14,3	> 7	4	> 100	16	22	4
pH 5	0,3	5,6	34,9	19	4	116	16	6	4
pH 6	2,4	27,5	45,7	12	4	19	16	2	4

A cada valor de pH, se compara el dato de degradación para cada una de las tres temperaturas con el dato de las otras dos temperaturas para calcular la aceleración observada. La aceleración predicha es mediante la simple aplicación del principio de Arrhenius como se describe anteriormente. Como se describe, *infra*, el análisis de HPLC muestra que el mecanismo de degradación predominante a un pH menor de aproximadamente 3 es diferente del observado a un pH mayor de aproximadamente 3.

EJEMPLO 4

Efecto de los excipientes tonificantes sobre la estabilidad

10

En este estudio, se determinaron los efectos de diversos excipientes farmacéuticos sobre la estabilidad de AMG 416 en formulación líquida. Se prepararon una solución de AMG 416 10 mg/ml y soluciones madre de manitol, glicina, arginina, NaCl y Na₂SO₄ a concentraciones isotónicas x2. Se ajustaron los pH de la solución de AMG 416 y las 5 soluciones excipientes y agua desionizada separadamente a pH 3,5 usando HCl/NaOH. Se añadieron alícuotas de 500 µl de cada una de las 6 soluciones a viales de vidrio, se añadieron 500 µl de la solución de AMG 416 a los mismos viales y se mezclaron bien. Se efectuó esto por triplicado para proporcionar 18 viales de muestra, conteniendo cada uno AMG 416 5 mg/ml y una concentración isotónica del excipiente (o agua desionizada). Se repitió esto con un conjunto de soluciones ajustadas a pH 4,5, proporcionando 18 viales de muestra adicionales. Se incubaron las muestras y se retiraron para análisis de HPLC a puntos temporales relevantes.

20

Se muestra en la Tabla 9 el dato de estabilidad en el punto temporal de 56 días. Se observó un intervalo de comportamiento de estabilidad en función del excipiente. En la mayoría de condiciones ensayadas, las formulaciones de NaCl mostraron la menor cantidad de degradación. Las excepciones son para el dato de 2-8 °C a pH 3,5 y 4,5. Se observó más variabilidad para otros excipientes, aunque la arginina parecía ser nociva en las muestras de 40 °C y en la muestra a pH 4,5 a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), y el sulfato de sodio parecía ser nocivo en las muestras a pH 4,5 a temperatura ambiente y a 40 °C.

25

Tabla 9

Extensión de la degradación (%) a los 56 días para la solución de AMG 416 5 mg/ml						
Temperatura	2-8 °C		TA		40 °C	
pH	3,5	4,5	3,5	4,5	3,5	4,5
Agua DI	0,0	0,7	1,0	3,6	8,2	24
Manitol	0,0	0,5	0,5	2,2	4,9	23
Gly	0,0	0,6	0,6	6,4	17	28
Arg	0,0	0,5	0,6	29	28	67
NaCl	0,1	1,1	0,3	1,8	3,0	18
Na ₂ SO ₄	0,0	0,4	0,4	51	9,4	30

La Tabla 10 extrapola el dato a los 2 años de almacenamiento a temperatura ambiente, y se ve una tendencia similar a la discutida, *supra* en que el almacenamiento a mayor temperatura predice generalmente una degradación más rápida de lo esperado por la simple aplicación del principio de Arrhenius.

Tabla 10

Extensión de la degradación predicha (%) para soluciones de AMG 416 5 mg/ml
Después de 2 años de almacenamiento a temperatura ambiente

Temp	2-8°C		TA		40°C	
pH	3,5	4,5	3,5	4,5	3,5	4,5
Agua DI	1	35	13	47	27	77
Mannitol	0	28	7	28	16	75
Gly	3	31	8	83	55	90
Arg	2	27	7	>100	90	>100
NaCl	4	56	4	24	10	58
Na ₂ SO ₄	2	22	5	>100	31	98

35

El dato muestra que el cloruro de sodio puede ser un modificador de la tonicidad adecuado para las formulaciones de solución de AMG 416.

EJEMPLO 5

5

Estabilidad de solución en diferentes tampones

En este estudio, se evaluó la estabilidad de las formulaciones líquidas de AMG 416 en 4 tampones diferentes durante 9 días. Se prepararon soluciones salinas tamponadas a una concentración de 25 mM y pH 4,5 para 4
10 tampones aniónicos diferentes en forma de sal de sodio: acetato, citrato, lactato y succinato. Se disolvió HCl AMG 416 (polvo) en cada solución tamponada, proporcionando una solución de 2,5 mg/ml y se ajustó el pH a 4,5 con HCl/NaOH. Se diluyeron adicionalmente las soluciones con tampón a pH 4,5 a 1,0 mg/ml y 0,25 mg/ml. Se dividió cada una de las soluciones resultantes en dos viales de HPLC de vidrio, uno almacenado a 2-8 °C y el otro a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Se realizó el análisis de HPLC a los 0, 4 y 9 días para la
15 determinación de la potencia y pureza.

La pureza de AMG 416 en la mayoría de muestras en todos los puntos temporales era de 100 %, con la excepción de unos pocos picos pequeños para la muestra de citrato a los 9 días, que puede atribuirse a la variación del valor basal. En todos los tampones ensayados, AMG 416 mostraba buena estabilidad durante el estudio de 9 días.

20

EJEMPLO 6

Estabilidad en soluciones tamponadas a pH 2,25, 2,5, 3,0 y 3,5

25 En este estudio, se investigó la estabilidad de una formulación líquida de AMG 416 en condiciones de bajo pH. Se preparó solución salina tamponada con succinato (10 mM, pH 3,5) disolviendo 59 mg de ácido succínico en 45 ml de agua procesada en laboratorio (desionizada) y se ajustó el pH a 3,5 usando HCl 1 N y NaOH 1 N, como fuera necesario, y c.s. hasta 50 ml. Del mismo modo, se preparó una solución tampón lactato de sodio 10 mM a pH 3,5 (56 mg/50 ml).

30

Se disolvió HCl de AMG 416 (120 mg de polvo) en 20 ml de tampón succinato, proporcionando una solución de AMG 416 5 mg/ml que se dividió en dos porciones iguales de 10 ml. Se añadió NaCl (90 mg) a una porción y se añadió manitol (500 mg) a la otra. Se dividió de nuevo cada porción de 10 ml en dos porciones iguales de 5 ml y se ajustó el pH a 2,25 y 3,5, respectivamente, con HCl 1 N y NaOH 1 N. Del mismo modo, se prepararon 4 soluciones de 5 ml
35 usando tampón lactato. Se añadió 1,0 ml de cada una de las (8) soluciones resultantes a 3 viales de muestra de suero. Además, se ajustó a pH 2,5 la solución de AMG 416 tamponada con succinato a pH 2,25 que contiene NaCl restante y se añadieron alícuotas de 0,5 ml a 3 viales de muestra de suero, y se ajustó a pH 3,0 la solución tamponada con succinato a pH 3,5 con NaCl restante y se añadieron alícuotas de 0,5 ml a 3 viales de muestra de suero. Véase la Tabla 11.

40

En cada punto temporal (0, 2, 8, 12, y 24 semanas), se recuperaron las 30 muestras del almacenamiento, se equilibraron a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) y se diluyó una alícuota de 100 µl a 0,5 mg/ml con agua para el análisis de RP-HPLC. Se resellaron las muestras restantes y se devolvieron a sus condiciones de almacenamiento respectivas.

45

Tabla 11

Descripción de los números de muestra										
pH	2,25				3,5				2,5	3,0
Tampón	Lactato		Succinato		Lactato		Succinato		Succinato	
Excipiente	NaCl	Man.	NaCl	Man.	NaCl	Man.	NaCl	Man.	NaCl	NaCl
2-8 °C	1	2	3	4	5	6	7	8	25	28
TA	9	10	11	12	13	14	15	16	26	29
40 °C	17	18	19	20	21	22	23	24	27	30

Se muestran los datos de HPLC representativos para el estudio en las Figura 5 y 6. La señal de HPLC mostrada en la Figura 5 es una muestra a pH 2,25 almacenada durante 67 días a 40 °C (5 mg/ml, 87,8 % de pureza). La Figura
50 5B muestra una escala diferente para ver las impurezas. La Figura 6 ilustra el efecto de aumentar el pH a 3,5 para la formulación por lo demás equivalente (pH 3,5, 40 °C, 5 mg/ml, 67 días, 91,7 % de pureza). La Figura 6B muestra una escala diferente para ver las impurezas. Como en el estudio anterior, se ve una diferencia notable en el perfil de producto de degradación a medida que cambia el pH.

Se presenta la pureza de AMG 416 en función del tiempo en la Tabla 12 (concentración de tampón 10 mM: L= lactato; S= succinato, modificador de la tonicidad: N= NaCl al 0,9 %, M= manitol al 5 %). Obsérvese que el lote usado contenía un 3,4 % de dímero a tiempo 0. Se omitió el punto temporal de 14 días para la muestra 26 debido a
5 un error en la preparación de muestra.

Se representan las tendencias de datos seleccionados en forma gráfica en las Figuras 7-9.

Tabla 12

Estabilidad de la solución de AMG 416 a 5 mg/ml a los 67 días en solución tamponada									
Muestra	pH	Temperatura	Tampón	Tonic.	Pureza (%) en tiempo (días)				
					0	14	27	49	67
1	2,25	5	L	N	96,8	96,4	97,0	95,7	95,7
2	2,25	5	L	M	96,8	96,4	95,9	96,0	95,7
3	2,25	5	S	N	95,6	95,1	95,1	94,6	93,8
4	2,25	5	S	M	95,4	95,1	95,4	94,0	94,0
5	3,5	5	L	N	96,9	96,6	96,4	95,8	96,2
6	3,5	5	L	M	96,8	96,9	96,9	96,0	94,5
7	3,5	5	S	N	95,3	95,7	95,5	95,0	95,0
8	3,5	5	S	M	95,4	95,2	95,1	95,1	94,4
9	2,25	25	L	N	96,9	96,4	95,2	94,0	92,8
10	2,25	25	L	M	96,9	96,6	95,6	93,2	94,9
11	2,25	25	S	N	95,3	94,2	93,9	91,7	90,6
12	2,25	25	S	M	95,6	94,5	94,1	92,5	92,1
13	3,5	25	L	N	96,6	96,3	96,3	94,7	95,2
14	3,5	25	L	M	96,5	96,2	95,3	94,8	93,3
15	3,5	25	S	N	95,3	95,1	94,8	93,4	93,3
16	3,5	25	S	M	95,8	95,3	94,7	93,5	93,6
17	2,25	40	L	N	96,7	91,9	87,8	83,5	79,4
18	2,25	40	L	M	96,5	93,8	89,5	86,6	83,0
19	2,25	40	S	N	95,3	89,9	86,9	80,4	76,3
20	2,25	40	S	M	95,4	91,8	89,6	85,3	82,9
21	3,5	40	L	N	96,7	94,3	91,7	89,5	86,2
22	3,5	40	L	M	96,6	92,2	85,9	79,5	77,3
23	3,5	40	S	N	95,3	92,3	89,3	86,8	84,2
24	3,5	40	S	M	95,6	91,6	88,5	84,2	80,3
25	2,5	5	S	N	95,4	94,9	95,2	94,8	94,4
26	2,5	25	S	N	95,2	ND	94,5	93,2	93,2
27	2,5	40	S	N	95,3	92,3	90,3	85,0	82,4
28	3,0	5	S	N	95,4	95,4	94,9	94,7	94,9
29	3,0	25	S	N	95,6	94,9	95,0	93,9	94,2
30	3,0	40	S	N	95,3	92,5	90,0	86,9	85,2

La Figura 7 proporciona la estabilidad en solución de AMG 416 (5 mg/ml) en solución salina tamponada con succinato en función del pH en condiciones refrigeradas (2-8 °C). La Figura 8 proporciona la estabilidad en solución de AMG 416 (5 mg/ml) en solución salina tamponada con fosfato en función del pH después de almacenamiento a temperatura ambiente. La Figura 9 proporciona la estabilidad en solución de AMG 416 (5 mg/ml) en solución salina tamponada con succinato en función del pH después de almacenamiento a 40 °C.

Se presenta el perfil de producto de degradación en el último punto temporal en la Tabla 13 y se muestra el curso temporal de la aparición de los dos productos de degradación principales (desamidación C-terminal y formación de homodímero) en las Tablas 14 y 15. Las Figuras 10 y 11 presentan el curso temporal de degradación a estos productos individuales (desamidación C-terminal y formación de homodímero, respectivamente) en función del pH para formulaciones seleccionadas (aquellas formulaciones para las que están disponibles un conjunto completo de condiciones de pH, es decir, aquellas que contienen NaCl y succinato, pero no lactato o manitol).

La Figura 10 indica una clara dependencia del pH para la desamidación, con una degradación significativamente mayor por esta ruta a pH 2,25 que a un pH mayor, y una correspondencia directa entre el pH y la cantidad de desamidación. En contraposición, la formación de homodímero presentada en la Figura 11 muestra la relación opuesta entre pH y extensión de degradación. Estas tendencias opuestas son la base del dato de estabilidad global presentado en las Figuras 7-9 y se observó la estabilidad máxima para las soluciones de AMG 416 en este conjunto de experimentos a un pH de $3,0 \pm 0,5$.

La correlación entre estabilidad y composición de excipiente es menos clara. Independientemente de la selección de tampón (succinato frente a lactato), la inspección de los datos de las Tablas 12-14 no muestra un claro patrón de preferencia por cualquier tampón con respecto a cualquiera de los productos de degradación principales a pH 2,25 o

- 3.5. Todas las muestras con tampón succinato mostraban una menor pureza a tiempo 0 que la correspondiente a las muestras tamponadas con lactato, debido a la mayor integración del pico de homodímero. La razón para esto no está clara, pero puede indicar un cambio en la absorbancia para compuesto parental y dímero en función del tampón. Sin embargo, como se señala anteriormente, la incubación posterior proporciona una tasa esencialmente idéntica de degradación en presencia de cualquier tampón. Independientemente de la elección del modificador de la tonicidad (NaCl o manitol), el cloruro de sodio parece potenciar la tasa de desamidación a pH 2,25 (véase la Tabla 13, muestras 9-12 a 25 °C, y especialmente las muestras 17-20 a 40 °C). Sin embargo, el NaCl parece suprimir (en comparación con el manitol) la degradación hasta homodímero a pH 3,5 (Tabla 14, muestras 13-16 a 25 °C y especialmente las muestras 21-24 a 40 °C).

10

Tabla 13

Perfil de producto de degradación para solución de AMG 416 (5 mg/ml) después de 67 días								
				Impurezas principales (% del área total)				
t= 67 días				Ácido	Dímero	Trisulfuro dimérico	Desacetilo	Trisulfuro
pH	Temperatura	Tampón	Tonic.	8,1 min	9,3 min	9,5	7,4 min	8,2 min
2,25	5	L	N	0,8	0,4			
2,25	5	L	M	0,5	0,6			
2,25	5	S	N	0,8	0,8			
2,25	5	S	M	1,1	0,1			
3,5	5	L	N		0,1			
3,5	5	L	M	1,2	1,6			
3,5	5	S	N	0,2	0,1			
3,5	5	S	M	0,7	-0,1			
2,25	25	L	N	2,5	0,3		0,3	0,9
2,25	25	L	M	1,2	0,4		0,3	
2,25	25	S	N	3,1	0,4		0,4	
2,25	25	S	M	1,6	0,9			
3,5	25	L	N		1,4			
3,5	25	L	M		3,1			
3,5	25	S	N	0,2	1,8			
3,5	25	S	M		2,1		0,1	
2,25	40	L	N	13,9	0,4	0,7	2,9	
2,25	40	L	M	8,7	1,6	0,6	2,0	0,3
2,25	40	S	N	14,2	0,0	0,2	3,1	
2,25	40	S	M	8,9	2,4	0,6	2,5	0,3
3,5	40	L	N	1,4	7,4	1,0		0,7
3,5	40	L	M	0,5	17,0	0,5		1,0
3,5	40	S	N	1,0	8,1	0,6	0,1	0,6
3,5	40	S	M	1,0	11,7	0,7		1,3
2,5	5	S	N	0,5	0,5			
2,5	25	S	N	1,5	0,2		0,4	
2,5	40	S	N	8,4	1,1	0,4	1,9	
3,0	5	S	N		0,2		0,4	
3,0	25	S	N		1,3		0,1	
3,0	40	S	N	2,4	5,5	0,6	0,6	0,5

Concentración de tampón 10 mM: L= lactato; S= succinato Modificador de la tonicidad: N= NaCl al 0,9 %, M= manitol al 5 %). El valor de % de dímero refleja el aumento del producto de degradación después de restar el valor de partida.

Tabla 14

Desamidación en solución de AMG 416 (5 mg/ml) en puntos temporales hasta 67 días									
Muestra	pH	Temperatura	Tampón	Tonic.	% de producto de degradación con el tiempo (días)				
					0	14	27	49	67
1	2,25	5	L	N	0,1			0,7	0,8
2	2,25	5	L	M			0,9	0,8	0,5
3	2,25	5	S	N			0,4	0,8	0,8
4	2,25	5	S	M				0,3	1,1
5	3,5	5	L	N			0,3	0,4	
6	3,5	5	L	M					1,2
7	3,5	5	S	N					0,2
8	3,5	5	S	M					0,7
9	2,25	25	L	N			1,3	1,6	2,5
10	2,25	25	L	M			1,2	1,2	1,2
11	2,25	25	S	N		1,1	1,4	2,0	3,1
12	2,25	25	S	M		0,7	1,0	1,3	1,6
13	3,5	25	L	N					
14	3,5	25	L	M					
15	3,5	25	S	N					0,2
16	3,5	25	S	M					
17	2,25	40	L	N		3,4	6,6	10,2	13,9
18	2,25	40	L	M		2,5	4,8	7,0	8,7
19	2,25	40	S	N		3,9	6,6	11,0	14,2
20	2,25	40	S	M		2,3	4,2	6,4	8,9
21	3,5	40	L	N			0,9	0,9	1,4
22	3,5	40	L	M			0,5	0,6	0,5
23	3,5	40	S	N			1,0	1,0	1,0
24	3,5	40	S	M			0,4	0,3	1,0
25	2,5	5	S	N					0,5
26	2,5	25	S	N			0,7	1,3	1,5
27	2,5	40	S	N		2,0	3,3	6,7	8,4
28	3,0	5	S	N					
29	3,0	25	S	N				0,3	
30	3,0	40	S	N		1,0		2,2	2,4

Concentración de tampón 10 mM: L= lactato; S= succinato Modificador de la tonicidad: N= NaCl al 0,9 %, M= manitol al 5 %).

5

Se observó la estabilidad máxima para soluciones de AMG 416 en este conjunto de experimentos a un pH de 3,0 $\pm$ 0,5. La tasa de degradación total a pH 2,5 y 3,5 es similar, pero el perfil de producto de degradación es diferente. La estabilidad a pH 2,25 es inferior debido a las mayores cantidades de desamidación observadas. Aunque puede observarse cierto efecto del excipiente sobre el perfil de estabilidad, el dato no indica una preferencia global entre los

10 sistemas excipientes estudiados, cuando se formulan a pH 3,0.

Tabla 15

Degradación de AMG 416 a homodímero en solución de 5 mg/ml en los puntos temporales hasta 67 días									
Muestra	pH	Temperatura	Tampón	Tonic.	Dímero (% de aumento)				
					0	14	27	49	67
1	2,25	5	L	N	0,0	0,5	-0,1	0,5	0,4
2	2,25	5	L	M	0,0	0,4	0,0	0,0	0,6
3	2,25	5	S	N	0,0	0,5	0,1	0,1	0,8
4	2,25	5	S	M	0,0	0,3	0,0	0,2	0,1
5	3,5	5	L	N	0,0	0,2	0,1	0,2	0,1
6	3,5	5	L	M	0,0	-0,1	0,0	0,2	1,6
7	3,5	5	S	N	0,0	-0,4	-0,2	0,0	0,1
8	3,5	5	S	M	0,0	0,2	0,1	-0,1	-0,1

9	2,25	25	L	N	0,0	0,5	0,4	0,5	0,3
10	2,25	25	L	M	0,0	0,3	0,1	0,5	0,4
11	2,25	25	S	N	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,4
12	2,25	25	S	M	0,0	0,5	0,5	0,2	0,9
13	3,5	25	L	N	0,0	0,3	0,3	0,9	1,4
14	3,5	25	L	M	0,0	0,4	0,3	1,5	3,1
15	3,5	25	S	N	0,0	0,2	0,5	1,1	1,8
16	3,5	25	S	M	0,0	0,5	1,0	1,4	2,1
17	2,25	40	L	N	0,0	0,6	0,8	0,5	0,4
18	2,25	40	L	M	0,0	0,0	0,3	0,6	1,6
19	2,25	40	S	N	0,0	0,5	0,4	0,8	0,0
20	2,25	40	S	M	0,0	0,6	0,6	1,3	2,4
21	3,5	40	L	N	0,0	2,4	3,7	5,5	7,4
22	3,5	40	L	M	0,0	4,1	9,5	15,0	17,0
23	3,5	40	S	N	0,0	2,8	4,6	6,3	8,1
24	3,5	40	S	M	0,0	3,7	6,6	9,0	11,7
25	2,5	5	S	N	0,0	0,4	0,2	0,0	0,5
26	2,5	25	S	N	0,0		0,1	0,5	0,2
27	2,5	40	S	N	0,0	0,6	0,6	1,5	1,1
28	3,0	5	S	N	0,0	0,0	0,5	0,2	0,2
29	3,0	25	S	N	0,0	0,6	0,6	0,9	1,3
30	3,0	40	S	N	0,0	1,6	3,2	4,8	5,5

(concentración de tampón 10 mM: L= lactato; S= succinato Modificador de la tonicidad: N= NaCl al 0,9 %, M= manitol al 5 %). Obsérvese que la degradación se expresa con un *aumento* del contenido de dímero (no dímero total) ya que el API usado para el experimento contenía una cantidad apreciable de dímero.

5

Se observó la estabilidad máxima de las soluciones de AMG 416 en este conjunto de experimentos a un pH de 3,0 ± 0,5. El análisis de las soluciones formuladas a pH 2,5 o 3,5 muestra perfiles de degradación diferentes, siendo la hidrólisis de amida C-terminal el producto de degradación mayor a pH bajo, mientras que la formación de homodímero era mayor a mayor pH. Las formulaciones líquidas a pH 3,0 tienen una degradación total predicha de 2-4 % durante 2 años en condiciones refrigeradas.

10

EJEMPLO 7

Estudio de robustez

15

En este estudio, se investigó la estabilidad de una formulación líquida de AMG 416 en una variedad de condiciones de fabricación y analíticas. Se prepararon 14 grupos de ensayo de formulación, teniendo cada uno una combinación diferente de pH (2,7, 3,3 o 3,9), concentración de péptido (4, 5 o 6 mg/ml) y concentración salina (0,7, 0,85 o 1,0 %). Se mantuvo igual la osmolalidad de cada formulación (succinato 10 mM). Véase la Tabla 16.

20

Tabla 16

Grupos de ensayo de formulación				
Muestra	pH	Succinato (mM)	Péptido (mg/ml)	NaCl (%)
1	3,3	10	5	0,85
2	3,9	10	4	1,0
3	2,7	10	4	0,85
4	3,9	10	6	0,7
5	3,3	10	4	0,7
6	3,9	10	6	1,0
7	3,3	10	5	1,0
8	3,3	10	5	0,85
9	3,9	10	5	0,85
10	3,3	10	6	0,85
11	2,7	10	6	0,85
12	2,7	10	5	1,0
13	2,7	10	5	0,7

14	3,9	10	4	0,7
----	-----	----	---	-----

Se dispensaron muestras (2,1 ml) de cada uno de los grupos de ensayo de formulación en viales de vidrio de tipo 1B de 3 ml (Schott, Alemania) y se sellaron (tapón de caucho). Se almacenaron conjuntos de viales verticales durante 3 meses a temperaturas de 4 °C, 25 °C o 40 °C. Se valoraron los cambios de pH, osmolalidad, AMG 416 porcentual y productos de degradación durante 3 meses.

Se estimó la superficie de respuesta dependiente del tiempo por los tres factores (pH, % de péptido y % de NaCl) ajustando un modelo estadístico que describe cada superficie de los datos para cada respuesta de HPLC y a cada temperatura (JMP® statistical discovery software, SAS). Se usó la simulación de Monte Carlo para generar las distribuciones de las respuestas de HPLC predichas en el punto fijado (pH= 3,3, péptido= 5 % y NaCl= 8,5 %) en función de la variación aleatoria de factores alrededor del punto establecido y el ruido aleatorio.

No se señaló un cambio significativo del pH y la osmolalidad con el tiempo. A 4 °C y 25 °C, la pureza permanecía en 92 % o mayor, la desamidación era de 4 % o menor y la formación de homodímero era de 4 % o menor durante toda la duración del estudio. A 40 °C, se vieron pureza, desamidación y formación de homodímero empezando al cabo de 1 mes. Sin embargo, la desamidación y formación de homodímero disminuyeron a medida que el intervalo de pH se estrechaba alrededor de 3,3, indicando que el pH tiene un impacto significativo sobre la formación de estos productos de degradación.

Basándose en este dato, es posible proporcionar una predicción del perfil de pureza en un intervalo de pH de 2,8 a 3,8. Como se muestra en la Figura 12, la pureza a cada temperatura depende en gran medida del pH, y es menos dependiente de la concentración de péptido y NaCl en el intervalo ensayado. En condiciones refrigeradas, el efecto del pH es menos significativo a valores por encima de pH 3,3, pero a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), los valores de pH mayores están asociados a una degradación más rápida. Las formulaciones para uso terapéutico pueden someterse a almacenamiento a largo plazo en condiciones refrigeradas. Además, debería tenerse en consideración también la exposición potencial a temperaturas mayores durante la fabricación, envasado, etiquetado y uso clínico. Por tanto, en este conjunto de experimentos, se observó que un valor de pH en el intervalo ensayado de 2,8 a 3,8 ($3,3 \pm 0,5$) sería adecuado para formulaciones de AMG 416.

30 EJEMPLO 8

Estabilidad a largo plazo de formulaciones líquidas de AMG 416 en el intervalo de pH

En este estudio, se determinó la estabilidad a largo plazo de una formulación líquida de AMG 416 a una concentración de 3,4 mg/ml en un intervalo de pH en solución salina tamponada con succinato. Se dispensó agua purificada USP (1200 ml) en un vaso de precipitados de vidrio. Se añadieron succinato de sodio (4,05 g) y cloruro de sodio (13,5 g) y se agitaron para disolver. Se ajustó el pH a 2,5 con NaOH 1 N y/o HCl 1 N como se requiera. Se añadió HCl de AMG 416 (5,5 g de peso de polvo), se agitó para disolver y c.s. hasta 1500 ml con agua purificada, proporcionando una solución de 3,4 mg/ml (AMG 416). Se dividió la solución en tres porciones y se ajustó el pH para cada porción a 2,5, 3,0 y 3,5, respectivamente. Se filtró cada solución separadamente a través de un filtro de PVDF de 0,22 micrómetros y se dispensaron 2 ml en viales de 5 cc. Después de tapar, sellar y etiquetar, se colocaron los viales en cámaras de estabilidad designadas a 5 ± 3 °C, 25 ± 2 °C y 40 ± 2 °C. Se recuperaron las muestras de acuerdo con el programa y se diluyeron con agua desionizada hasta 1,0 mg/ml para análisis de HPLC. Se proporciona la pureza a 0, 1, 2, 3, 5, 12 y 24 meses en la Tabla 17 (nota: el valor de pureza de partida era de 99,2 % para este estudio). Los resultados proporcionan un perfil de estabilidad a largo plazo de una formulación líquida de 3,4 mg/ml de AMG 416 en función de pH y temperatura.

Tabla 17

Pureza en el punto temporal de hasta 24 meses para soluciones de AMG 416.									
pH	Temp (°C)	Pureza (%) con el tiempo (meses)							Degradación a los 2 años
		0	1	2	3	5	12	24	
2,5	5	99,2	99,0	98,8	98,8	98,1	96,8	94,8	4,4
	25	99,2	96,9	95,2	93,4	89,3	80,9	68,5	30,7
	40	99,2	88,8	81,9	75,3	60,9	39,1	20,4	78,8
3	5	99,2	99,1	99,1	99,2	98,7	98,3	97,7	1,5
	25	99,2	98,2	97,5	96,7	95,0	91,1	84,6	14,6
	40	99,2	93,7	90,2	86,4	78,9	61,6	39,2	60,0

3,5	5	99,2	99,2	99,2	99,2	98,8	98,6	98,3	0,9
	25	99,2	98,6	98,1	97,6	96,2	93,4	89,2	10,0
	40	99,2	94,6	91,5	88,7	83,1	67,5	46,1	53,1

Se muestra el curso temporal de la pureza de la formulación líquida de AMG 416 a cada nivel de pH en la Figura 13. A todas las temperaturas, se observó la máxima pureza a pH 3,5, mientras que se observó la máxima degradación a pH 2,5. Además, a todas las temperaturas, la pureza a pH 3,0 y 3,5 era significativamente mayor que la pureza a pH 2,5. Por tanto, por ejemplo para las muestras refrigeradas, la pureza a los 24 meses era de 98,3 y 97,7 para las soluciones a pH 3,5 y 3,0, respectivamente, pero solo de 94,8 para la solución a pH 2,5. Además, se vio que la disminución de pureza estaba relacionada con la temperatura a todos los niveles de pH, observándose la mínima degradación en las muestras incubadas a 2-8 °C y observándose la máxima degradación en las muestras incubadas a 40 °C. El producto de degradación principal observado a pH 2,5 era el producto desamidado y a pH 3,5 se observaba el homodímero.

Estos datos confirman que las formulaciones descritas son capaces de mantener una estabilidad adecuada de AMG 416 durante al menos una vida útil de 2 años en condiciones refrigeradas. La degradación observada es lineal en todos los casos y apoya las conclusiones basadas en la extrapolación de datos de experimentos anteriores. A partir de estos datos, el pH óptimo se encuentra entre 3,0 y 3,5, basándose en el equilibrio entre diferentes rutas de degradación.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en esta memoria descriptiva se incorporan a la presente memoria como referencia como si se indicara específica e individualmente que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpora como referencia. Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, resultará fácilmente evidente para los especialistas en la materia a la vista de las enseñanzas de esta invención que pueden hacerse ciertos cambios y modificaciones de la misma sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende AMG 416 en solución acuosa, donde la formulación tiene un pH de 2,0 a 5,0.
5
2. La formulación de la reivindicación 1, donde la formulación tiene un pH de 2,5 a 4,5.
3. La formulación de la reivindicación 1, donde la formulación tiene un pH de 2,5 a 4,0.
- 10 4. La formulación de la reivindicación 1, donde la formulación tiene un pH de 3,0 a 3,5.
5. La formulación de la reivindicación 1, donde el pH se mantiene por un tampón farmacéuticamente aceptable.
- 15 6. La formulación de la reivindicación 5, donde el tampón es succinato.
7. La formulación de la reivindicación 1, donde está presente AMG 416 en la formulación a una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml.
- 20 8. La formulación de la reivindicación 1, donde está presente AMG 416 en la formulación a una concentración de 1 mg/ml a 15 mg/ml.
9. La formulación de la reivindicación 1, donde está presente AMG 416 en la formulación a una concentración de 2,5 mg/ml a 10 mg/ml.
- 25 10. La formulación de la reivindicación 1, que comprende además un modificador de la tonicidad farmacéuticamente aceptable.
11. La formulación de la reivindicación 10, donde está presente el modificador de la tonicidad en la formulación a una concentración suficiente para que la formulación sea aproximadamente isotónica.
- 30 12. La formulación de la reivindicación 10, donde el tonificador es NaCl.
13. La formulación de la reivindicación 1, donde la formulación tiene menos de un 10 % de degradación cuando se almacena a 2-8 °C durante 2 años.
- 35 14. La formulación de la reivindicación 1, donde la formulación tiene menos de un 10 % de degradación cuando se almacena a temperatura ambiente durante 2 años.
- 40 15. Una formulación que comprende de 2 mg/ml a 20 mg/ml de AMG 416 en solución acuosa, un tampón succinato que mantiene la formulación a un pH de aproximadamente 3,0 a 3,5 y una concentración suficiente de cloruro de sodio para que la formulación sea aproximadamente isotónica.

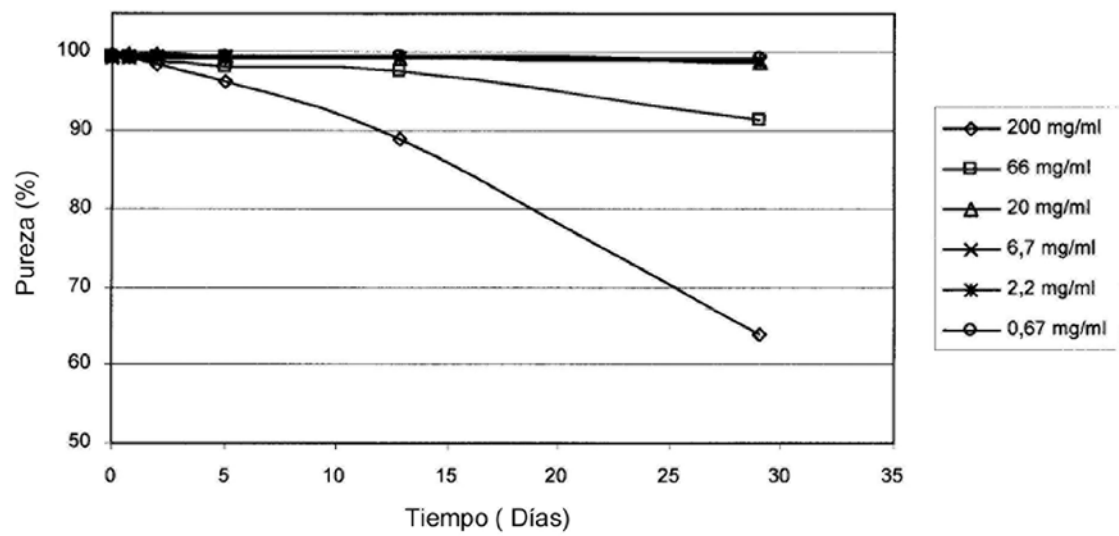


FIGURA 1A

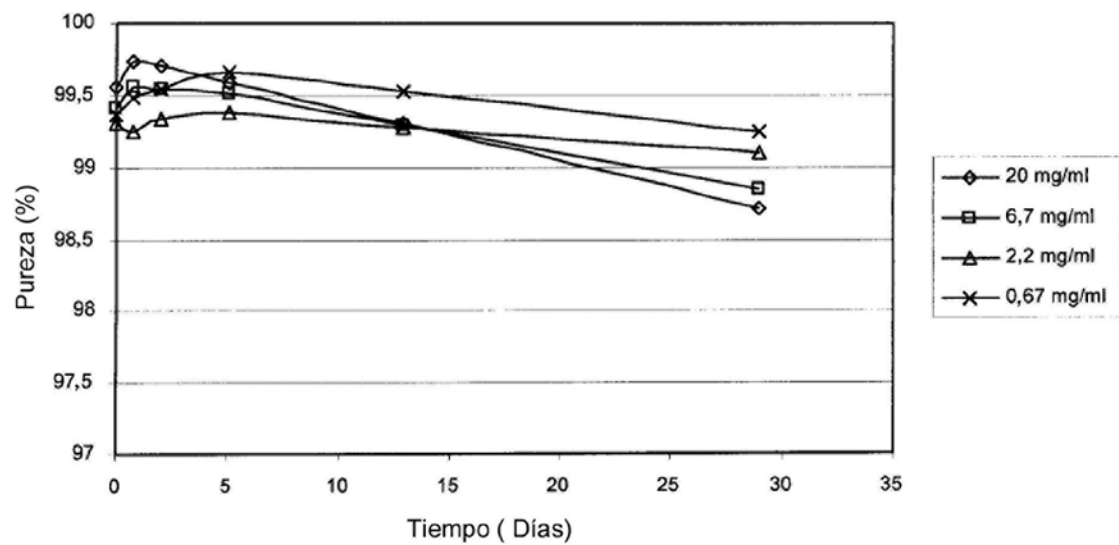


FIGURA 1B

FIGURA 1

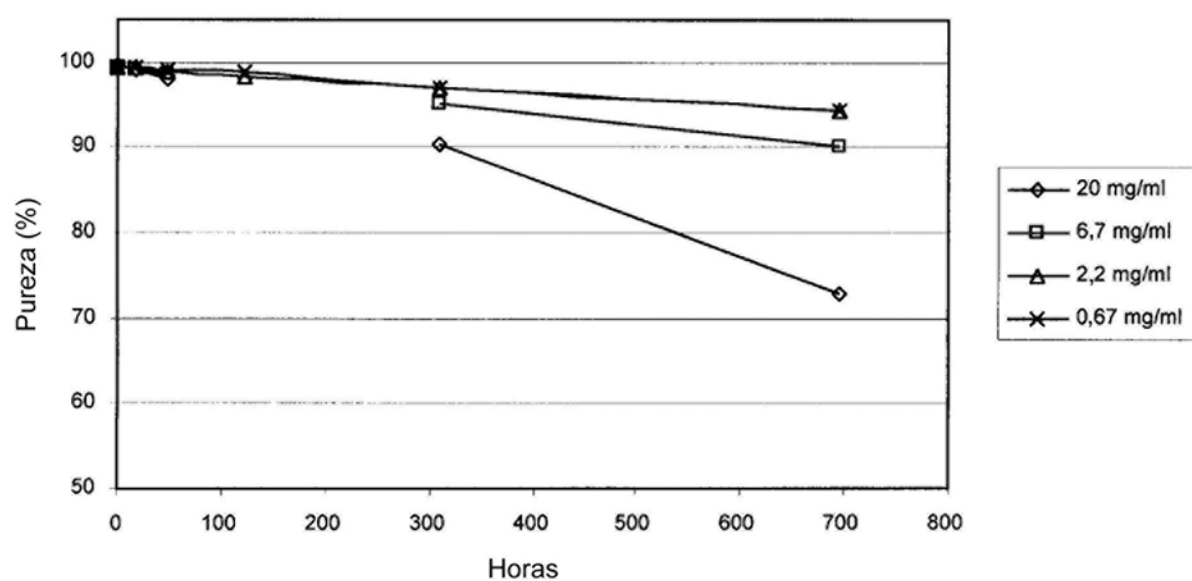


FIGURA 2

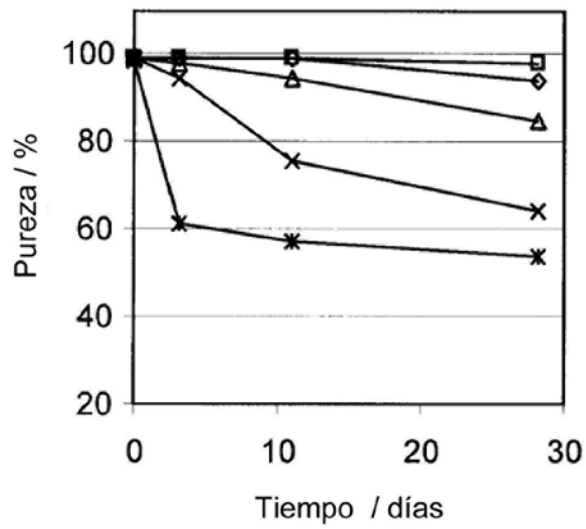


FIGURA 3A

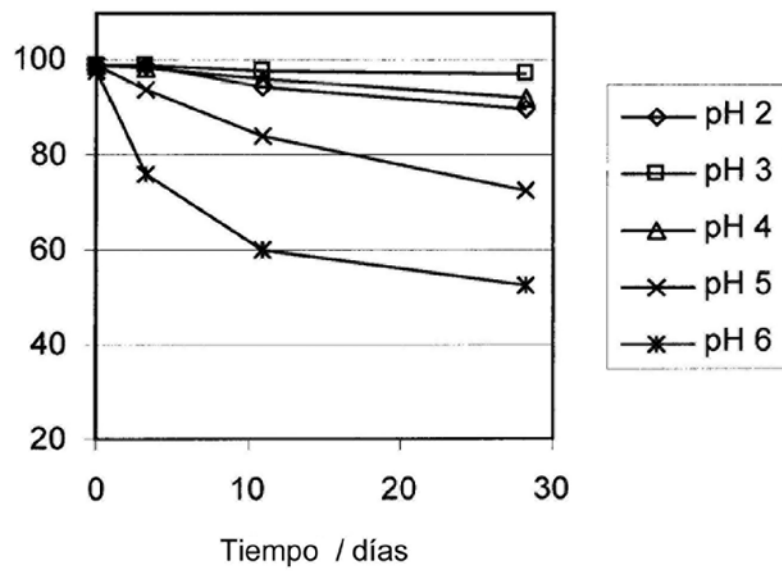


FIGURA 3B

FIGURA 3

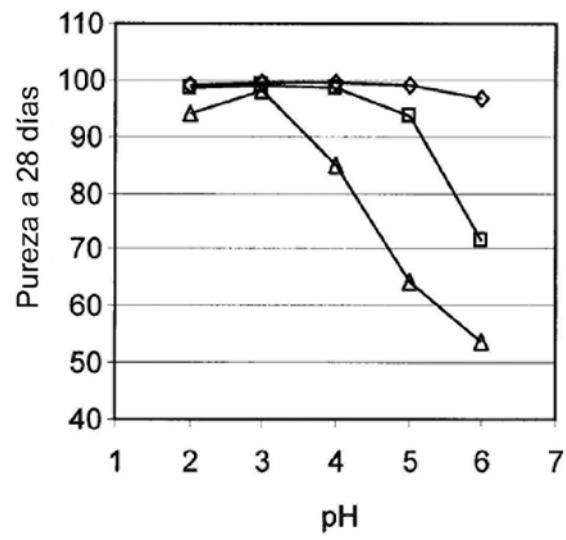


FIGURA 4A

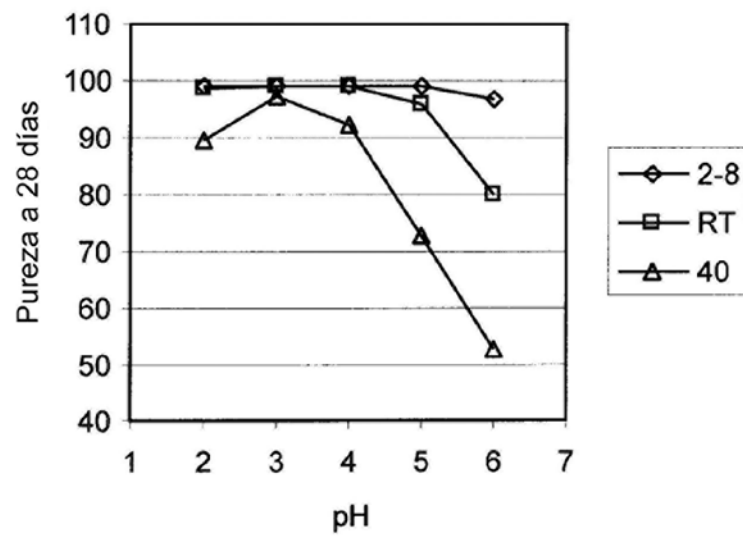


FIGURA 4B

FIGURA 4

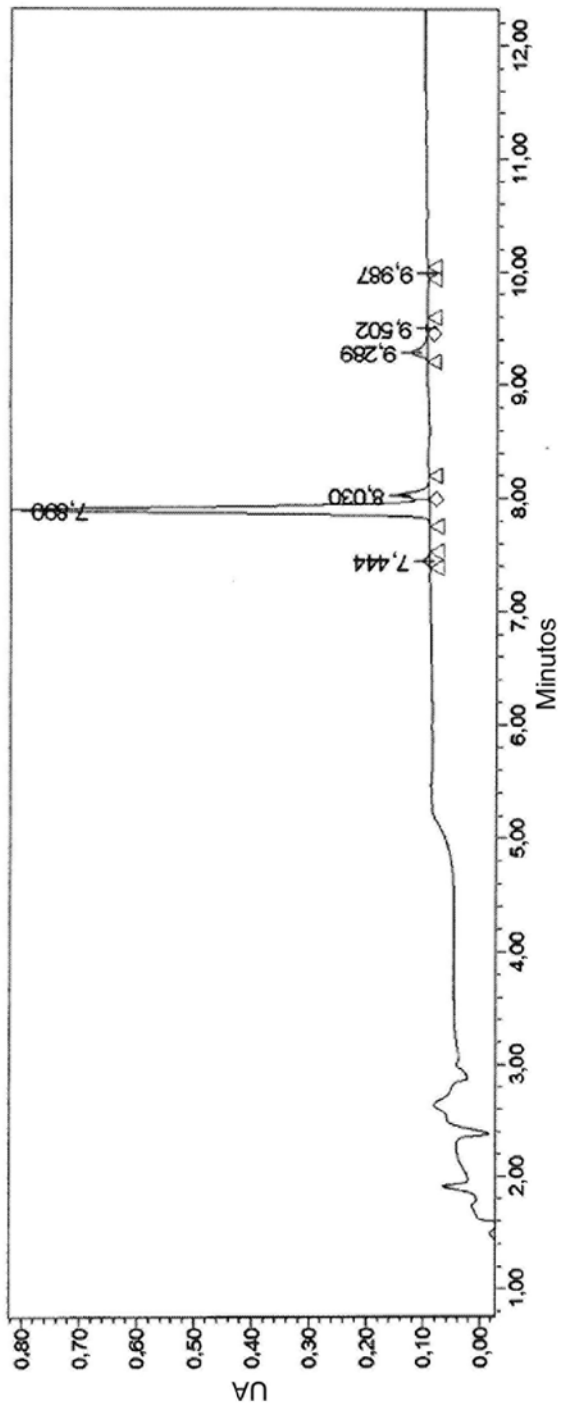


FIGURA 5A

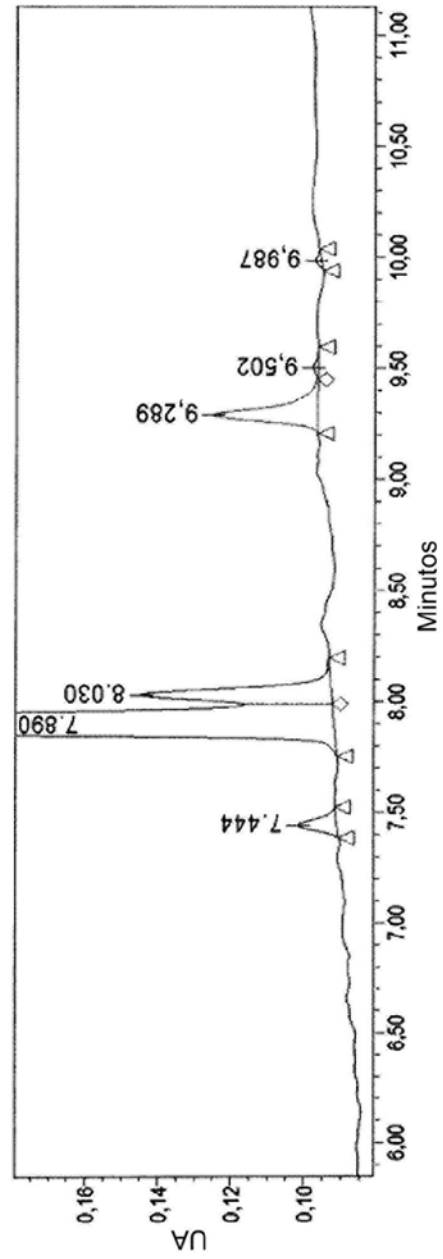


FIGURA 5B

FIGURA 5

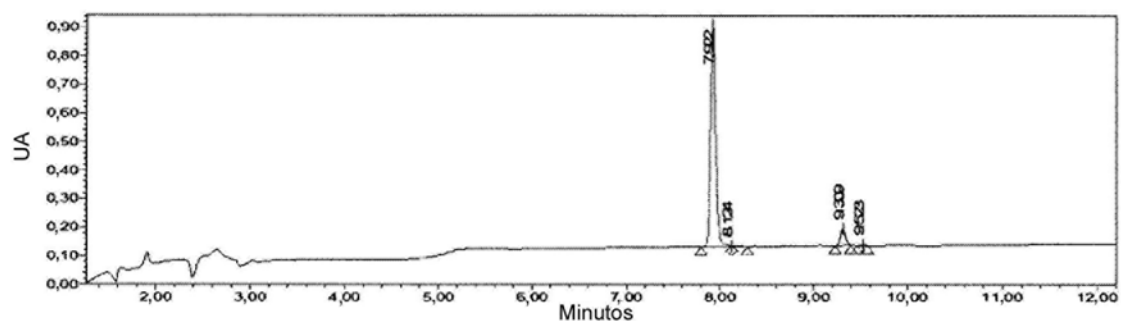


FIGURA 6A

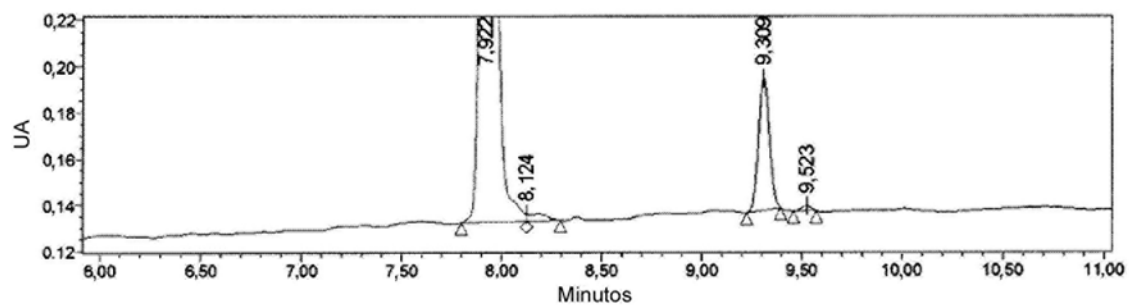


FIGURA 6B

FIGURA 6

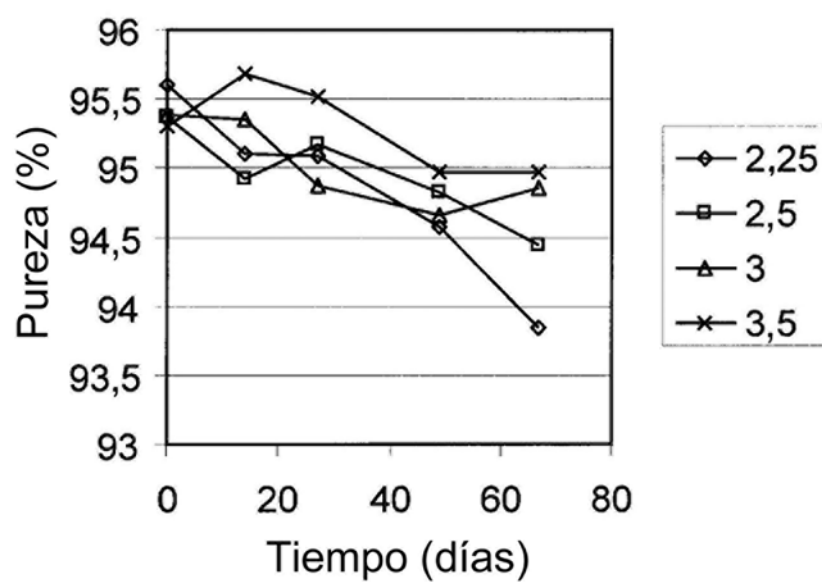


FIGURA 7

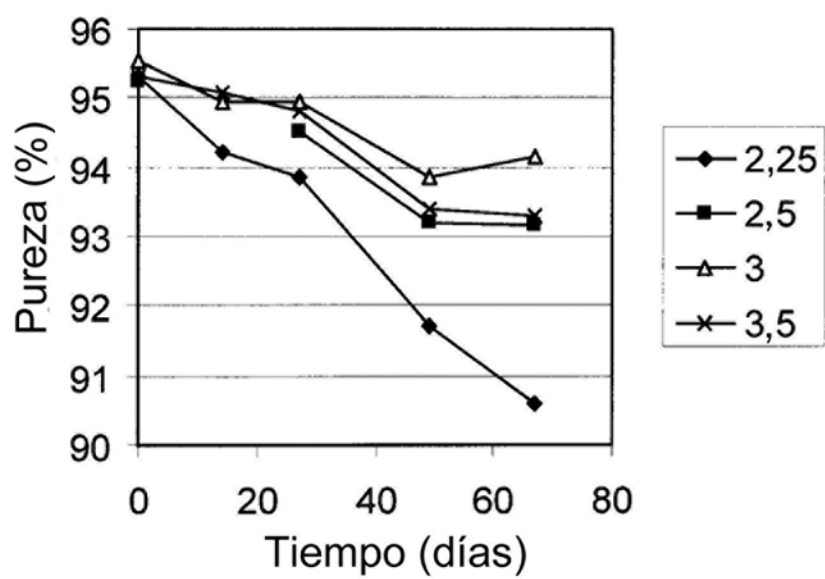


FIGURA 8

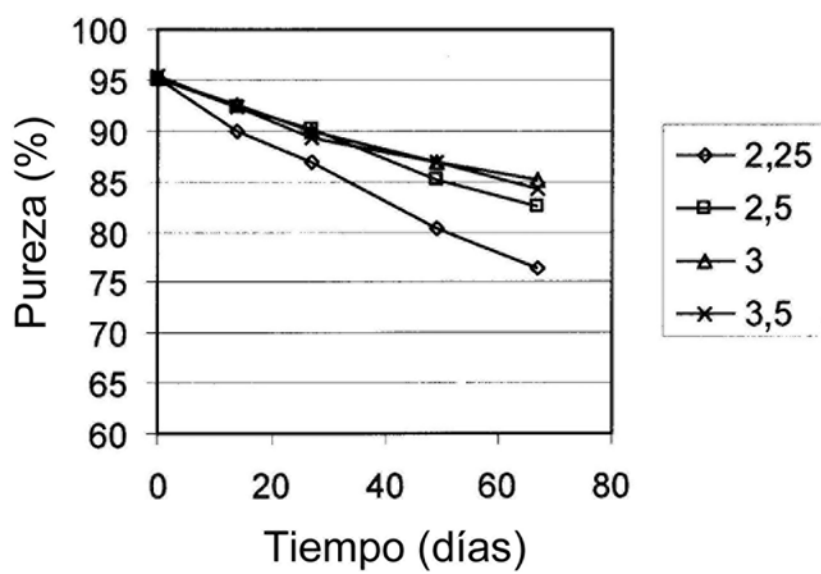


FIGURA 9

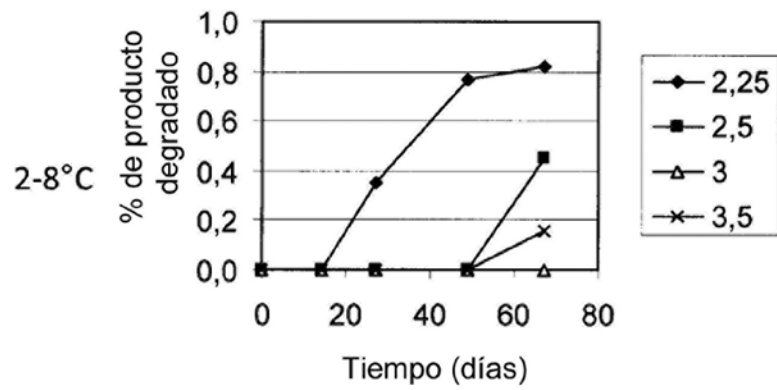


FIGURA 10A

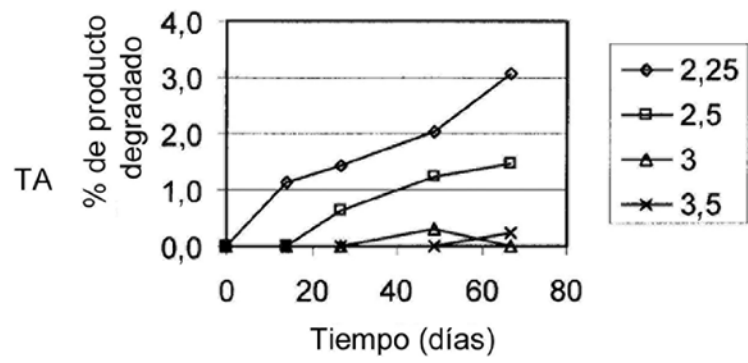


FIGURA 10B

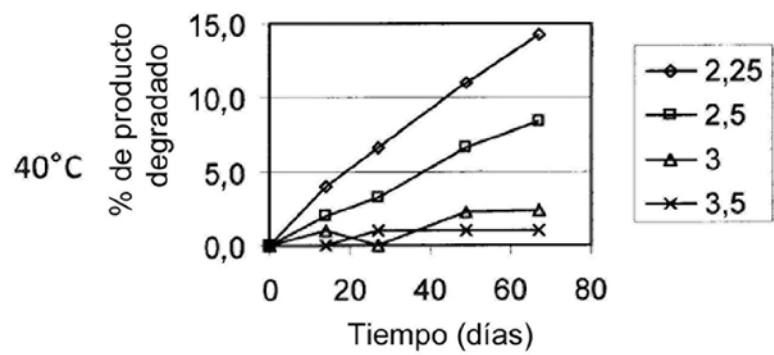


FIGURA 10C

FIGURA 10

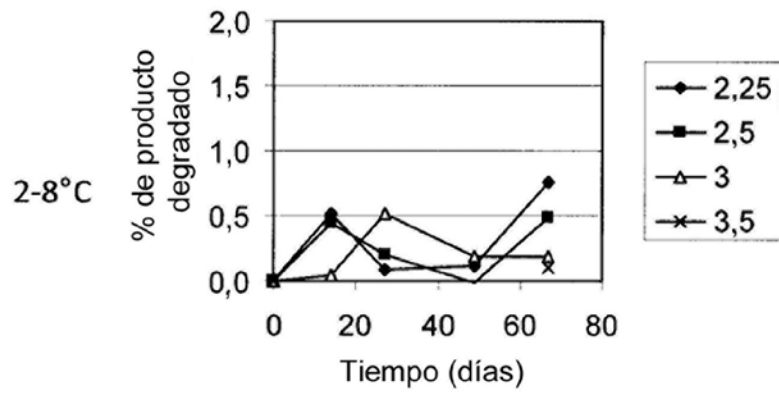


FIGURA 11A

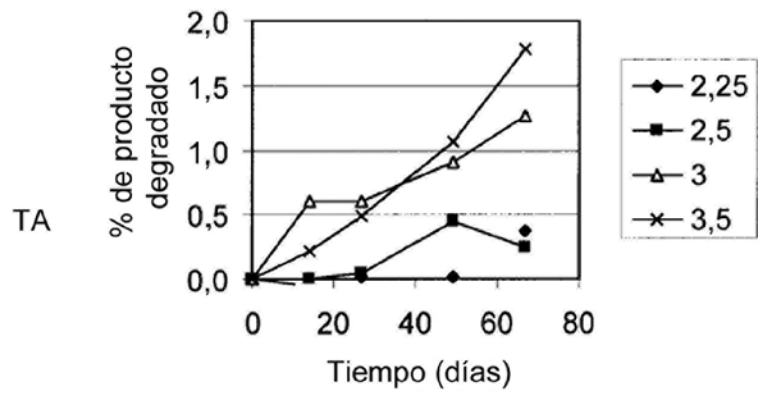


FIGURA 11B

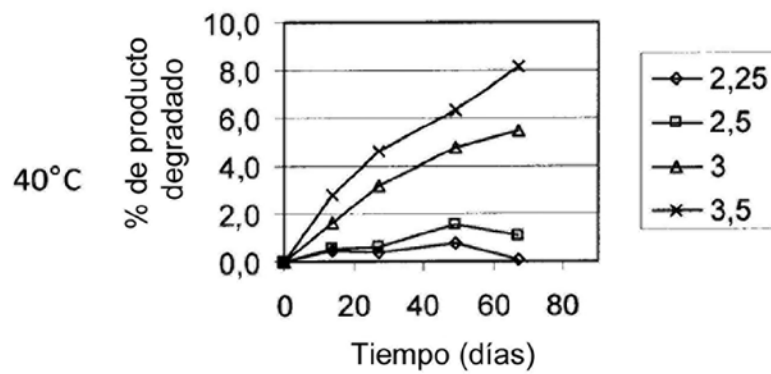


FIGURA 11C

FIGURA 11

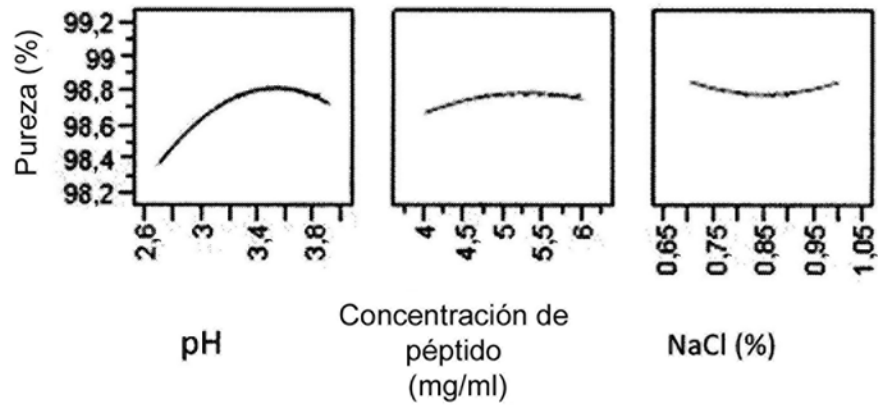


FIGURA 12A

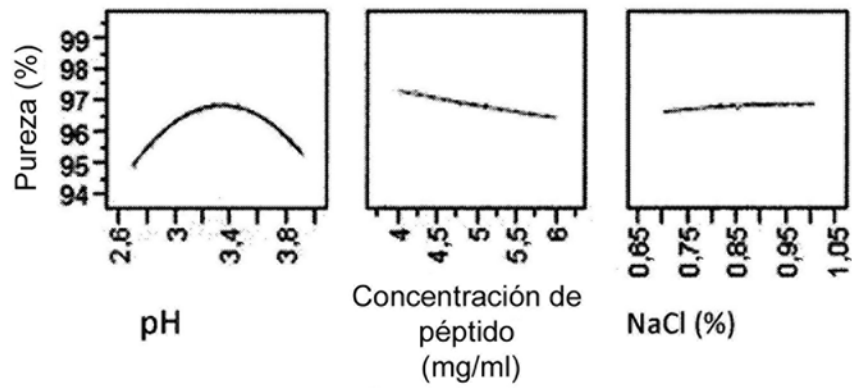


FIGURA 12B

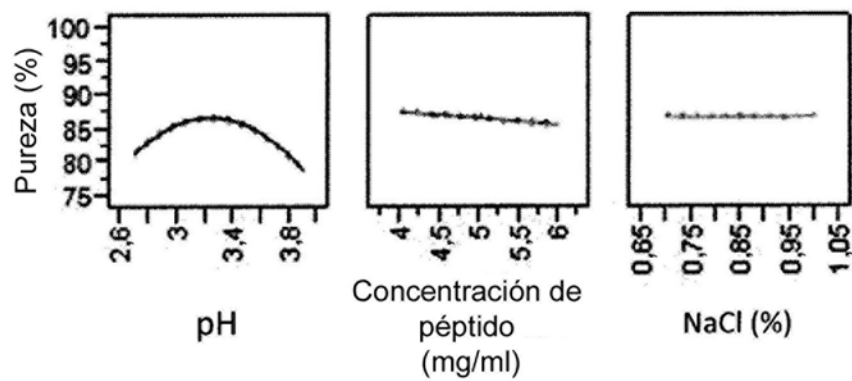


FIGURA 12C

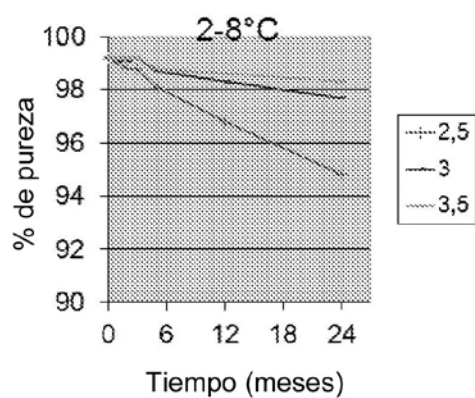


FIGURA 13A

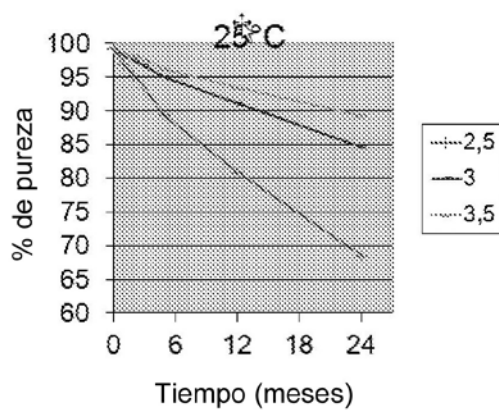


FIGURA 13B

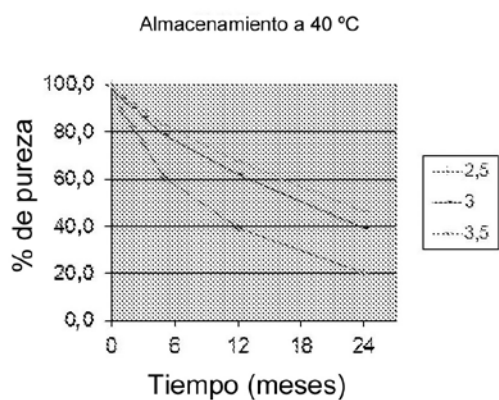


FIGURA 13C

FIGURA 13