(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 654 102**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/68	(2007.01)
A61K 38/19	(2006.01)
C07K 14/535	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)
A61K 47/12	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2011 PCT/KR2011/000369**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO11090305**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2011 E 11734854 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2525787**

(54) Título: **Formulaciones líquidas para conjugado de C-CSF de acción prolongada**

(30) Prioridad:

19.01.2010 KR 20100004839

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2018

(73) Titular/es:

HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)
550 Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813, KR

(72) Inventor/es:

LEE, MI JI;
LEE, JAE MIN;
LEE, BYUNG SUN;
BAE, SUNG MIN y
KWON, SE CHANG

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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).

ES 2 654 102 T3

DESCRIPCIÓN

Formulaciones líquidas para conjugado de C-CSF de acción prolongada

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a una formulación líquida de acuerdo con las reivindicaciones para garantizar la estabilidad durante el almacenamiento de un conjugado de G-CSF de acción prolongada en el que un polímero no peptídico y un fragmento Fc de inmunoglobulina están unidos covalentemente y que exhibe una larga duración de acción comparado con el de tipo salvaje.

[Antecedentes]

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una citoquina que estimula células germinales de la médula ósea y leucocitos induciéndolos a diferenciarse y proliferar. Es una glucoproteína con un peso molecular en el intervalo de 18.000 a 19.000 Da y con un pH de 6,1 (5,5-6,1, dependiendo del grado de glucosación (Nomura et al., EMBO J. 5(5): 871-876, 1986).

Por tecnología de DNA recombinante se descubrió el peso molecular y las propiedades genéticas del G-CSF (Clark y Kamen, Science, 236: 1.229-1.237, 1987). Desde la clonación de genes del G-CSF a partir de genotecas de cDNA construidas con mRNA aislados de CHU-2 y cultivos de células humanas 5637 de carcinoma de vejiga (Nagata et al., Nature, 319: 415-418, 1986; Nagata et al., EMBO J., 5(3): 575-581, 1986; Souza et al., Science, 232: 61-65, 1986), la tecnología de DNA recombinante ha permitido producir G-CSF a partir de células de mamíferos y procariotas. Además, se ha descubierto que un G-CSF modificado, que difiere del de tipo salvaje en que por lo menos un resto aminoácido, especialmente un resto de cisteína en la posición 17, está sustituido por un resto de un aminoácido diferente, puede ser segregado, en forma libre, de restos de metionina en su N terminal a gran escala en una capa periférica del protoplasma (patente coreana número 10-356140).

Como los polipéptidos tienden a desnaturalizarse fácilmente debido a su baja estabilidad, ser degradados en la sangre por enzimas proteolíticas y pasar a través del riñón o hígado, con frecuencia es necesario administrar a pacientes medicamentos proteínicos, incluidos polipéptidos, como componentes farmacéuticamente eficaces, para mantener las concentraciones y títulos sanguíneos deseados. Sin embargo, esta administración frecuente de medicamentos proteínicos, especialmente mediante inyecciones, es dolorosa para los pacientes.

Para resolver estos problemas, se han realizado muchos esfuerzos para mejorar la estabilidad de fármacos proteínicos en el suero sanguíneo y mantener los fármacos en la sangre a niveles altos durante un período de tiempo prolongado y maximizar así la eficacia farmacéutica de los fármacos. Para su uso en formulaciones de larga duración, se deben formular fármacos proteínicos que tengan alta estabilidad y mantener sus títulos a niveles suficientemente altos sin originar respuestas inmunitarias en los pacientes.

Para estabilizar proteínas y evitar su degradación enzimática y aclaramiento por los riñones, convencionalmente se ha usado un polímero que tenga alta solubilidad, como polietilenglicol (PEG), para modificar químicamente la superficie de un fármaco proteínico. Mediante su unión a regiones específicas o diversas de una proteína objetivo, el PEG estabiliza la proteína y evita su hidrólisis, sin causar efectos secundarios graves (Sada et al., J. Fermentation Bioengineering, 71:137-139, 1991). Sin embargo, a pesar de su capacidad de aumentar la estabilidad de proteínas, el tratamiento con PEG tiene problemas tales como reducir mucho los títulos de proteínas fisiológicamente activas. Además, el rendimiento disminuye cuando se incrementa el peso molecular del PEG debido a la menor reactividad de las proteínas.

Un método alternativo para mejorar la estabilidad *in vivo* de proteínas fisiológicamente activas es mediante unión de un gen de una proteína fisiológicamente activa a un gen que codifique una proteína que tenga alta estabilidad en el suero sanguíneo por tecnología de recombinación genética y cultivando las células transfectadas con el gen recombinante para producir una proteína de fusión. Por ejemplo, se puede preparar por recombinación genética una proteína de fusión conjugando albúmina, una proteína que se sabe es la más eficaz para aumentar la estabilidad de proteínas, o un fragmento de ella, a una proteína fisiológicamente activa de interés (publicaciones PCT números WO 93/15199 y WO 93/15200 y publicación de patente europea número 413.622).

Otro método es usar una inmunoglobulina. Como se describe en la patente de los Estados Unidos número 5.045.312, se conjuga hormona humana del crecimiento a albúmina de suero bovino o a inmunoglobulina de ratón usando un agente de entrecruzamiento. Los conjugados tienen mayor actividad comparados con hormona del crecimiento no modificada. Como agente de entrecruzamiento se emplea carbodiimida o glutaraldehído. Sin embargo, uniéndose no específicamente a los péptidos, dichos agentes de entrecruzamiento de peso molecular bajo no permiten la formación de conjugados homogéneos e incluso son tóxicos *in vivo* Además, la patente muestra aumento de la actividad sólo gracias a acoplamiento químico con la hormona del crecimiento. El método de la patente no puede garantizar un aumento de la actividad a diversos tipos de fármacos polipéptidos, por lo que la patente ni siquiera reconoce factores relacionados con la estabilidad de proteínas, como duración, vida media en sangre, etc.

Recientemente se ha sugerido una formulación de un fármaco que es una formulación de un fármaco proteínico de acción prolongada con mayor duración y estabilidad *in vivo*. Para su uso en la formulación del fármaco de acción prolongada, se prepara un conjugado de una proteína uniendo covalentemente un polipéptido fisiológicamente activo, un polímero no polipéptido y un fragmento Fc de inmunoglobulina (patentes coreanas números 10-0567902 y 10-0725315).

En este método se puede usar G-CSF como polipéptido fisiológicamente activo para proporcionar un conjugado de G-CSF de acción prolongada. Para aplicar conjugados de G-CSF de acción prolongada a productos de fármacos, es necesario mantener su eficacia farmacéutica *in vivo* impidiendo cambios fisicoquímicos, como degeneración inducida por la luz, calor o aditivos y agregación, adsorción o hidrólisis durante su almacenamiento y transporte. Los conjugados de G-CSF de acción prolongada son más difíciles de estabilizar que un G-CSF-polipéptido porque tienen mayor volumen y peso molecular.

En general, las proteínas tienen una vida media muy corta y, cuando se exponen a temperaturas inadecuadas, interfaces de agua-aire, presiones altas, tensiones físicas/mecánicas, disolventes orgánicos, contaminación microbiana, etc., sufren degeneración, como agregación de monómeros, precipitación por agregación y adsorción sobre la superficie de recipientes. Cuando se degeneran, las proteínas pierden sus propiedades fisicoquímicas y su actividad fisiológica. Una vez degeneradas, las proteínas no pueden recuperar sus propiedades originales porque la degeneración es irreversible. Particularmente en el caso de proteínas que se administran en cantidades traza de cientos de microgramos por inyección, como G-CSF, cuando pierden actividad y son adsorbidas sobre la superficie del recipiente, se origina un daño relativamente grande. Además, las proteínas adsorbidas se agregan fácilmente durante un proceso de degeneración y los agregados de las proteínas degeneradas cuando se administran al organismo actúan como antígenos, a diferencia de proteínas sintetizadas *in vivo*. Por lo tanto, las proteínas deben ser administradas en una forma estable. Se han realizado muchos estudios para evitar la degeneración de proteínas en soluciones [John Geigert, J. Parenteral Sci. Tech., 43(5): 220-224, 1989; David Wong, Pharm. Tech., 34-48, 1997; Wei Wang., Int. J. Pharm., 185: 129-188, 1999; Willem Norde, Adv. Colloid Interface Sci., 25: 267-340, 1986; Michelle et al., Int. J. Pharm., 120: 179-188, 1995].

Se aplica liofilización a algunos fármacos proteínicos para conseguir el objetivo de estabilidad. Sin embargo, los productos liofilizados no son convenientes porque, para usarlos, deben ser disueltos de nuevo en agua de inyectables. Además, se necesita una gran inversión en secadores de liofilización de gran capacidad porque en los procesos de producción hay un proceso de liofilización. Se ha sugerido la fricción intensa de proteínas usando un secador por aspersión. Sin embargo, este método es económicamente desfavorable debido a su bajo rendimiento de producción. Además, un proceso de secado por aspersión expone las proteínas a temperaturas altas que tienen una influencia negativa sobre la estabilidad de las proteínas.

Como alternativa para superar estas limitaciones, parece que cuando se añaden estabilizadores a proteínas en solución, pueden restringir cambios fisicoquímicos de fármacos proteínicos y mantener su eficacia farmacéutica *in vivo*, incluso después de haber sido almacenados durante un período de tiempo prolongado. Entre los estabilizadores, se pueden mencionar hidratos de carbono, aminoácidos, proteínas, tensioactivos, polímeros y sales. Como estabilizador para diversos fármacos proteínicos se ha usado mucho, *inter alia*, albúmina de suero humano, con certificación de su rendimiento (Edward Tarelli et al., Biologicals, 26: 331-346, 1998).

Un proceso típico de purificación de albúmina de suero humano incluye inactivar contaminantes biológicos, como micoplasmas, prión, bacterias y virus, o rastrear o examinar uno o más contaminantes o patógenos biológicos. Sin embargo, siempre existe el riesgo de exponer los pacientes a contaminantes biológicos porque estos no se han eliminado o inactivado completamente. Por ejemplo, la sangre humana procedente de donantes se analiza para examinar si contiene ciertos virus. Sin embargo, este proceso no siempre es seguro. En particular, ciertos virus que existen en muy pequeña cantidad no pueden ser detectados.

Recientemente se han sugerido alternativas a la albúmina de suero humano, incluidas albúmina recombinante (publicación de patente coreana sometida a información pública número 10-2004-0111351) y G-CSF exento de albúmina (patentes coreanas números 10-0560697 y 10-0596610).

Aunque se empleen estabilizadores exentos de albúmina, diferentes proteínas pueden ser inactivadas gradualmente debido a sus diferencias químicas porque han estado sometidas a proporciones y condiciones diferentes durante su almacenamiento. El efecto de un estabilizador sobre el tiempo de almacenamiento difiere de una proteína a otra. Es decir, se pueden usar diversos estabilizadores en proporciones diferentes, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de interés.

Además, cuando se usan simultáneamente estabilizadores diferentes, pueden producir efectos opuestos debido a la competencia y al funcionamiento erróneo de ellos. Una combinación de estabilizadores diferentes también puede provocar efectos diferentes porque originan que las proteínas cambien de características o concentración durante su almacenamiento. Como cada estabilizador tiene adecuadamente su actividad estabilizadora en cierto intervalo de concentraciones, se deben realizar con cuidado muchos esfuerzos para combinar los tipos y concentraciones de estabilizadores diferentes.

En particular, como en los conjugados de G-CSF de actividad prolongada en los que se han mejorado su duración *in vivo* y su estabilidad *in vivo*, sus pesos moleculares y volúmenes son completamente diferentes de los de compuestos generales de G-CSF porque están compuestos del péptido fisiológicamente activo G-CSF y un fragmento Fc de inmunoglobulina. Además, la estabilidad de fragmentos Fc de inmunoglobulina varía mucho, dependiendo del pH. Por lo tanto, no se pueden emplear estabilizadores convencionales para el G-CSF tal como son. En consecuencia, para conjugados de G-CSF de acción prolongada se requieren estabilizadores con composiciones diferentes a las de estabilizadores para G-CSF.

La solicitud de patente WO 2005/047334A1 describe ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes para formulaciones farmacéuticas y relaciona 24 vehículos, excipientes y diluyentes, entre ellos productos químicos muy diferentes, como manitol, estearato magnésico y aceites minerales. El ejemplo 8 describe la preparación de un conjugado de G-CSF-PEG-Fc formulado en forma de formulación líquida exenta de albúmina.

La solicitud de patente de los Estados Unidos 2005/0176108A1 describe conjugados de proteínas que tienen una vida media *in vivo* prolongada. En particular se describe una formulación líquida estabilizada de C-CSF-PEG-IgG que comprende fosfato sódico, glicina y 0,25% de manitol y tiene un pH de 7,0.´

La solicitud de patente WO 2009/027437A1 describe una formulación líquida de un polímero-conjugado de C-CSF con un pH de 4,5 a 5,5 y un tensioactivo, que además puede comprender opcionalmente un agente modificador de la tonicidad seleccionado de sorbitol y manitol.

Precediendo a la presente invención, investigaciones intensas y minuciosas para desarrollar una formulación líquida estable para conjugados de G-CSF de acción prolongada, capaz de conservar su eficacia farmacéutica durante un tiempo prolongado sin infección vírica, dieron lugar al descubrimiento de que un estabilizador que comprende un tampón de un determinado intervalo de pH y una concentración alta de manitol proporciona conjugados de G-CSF de acción prolongada con mayor estabilidad y permite la formación de formulaciones líquidas estables y económicas de conjugados de G-CSF de acción prolongada.

[Divulgación]

[Problema técnico]

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación líquida de acuerdo con las reivindicaciones y que comprende un conjugado de G-CSF de acción prolongada, en la que el conjugado de G-CSF, un polímero no peptídico y un fragmento Fc de inmunoglobulina están unidos covalentemente, y un estabilizador exento de albúmina que contiene un tampón y manitol.

[Solución técnica]

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona una formulación líquida que comprende un conjugado de G-CSF de acción prolongada, en la que el conjugado de G-CSF, un polímero no peptídico y un fragmento Fc de inmunoglobulina están unidos covalentemente, y un estabilizador exento de albúmina compuesto de un tampón y manitol.

En la presente memoria, el término “conjugado de G-CSF de acción prolongada” se refiere a una estructura de proteína en la que el G-CSF fisiológicamente activo, uno o más polímeros no peptídicos y uno o más fragmentos Fc de inmunoglobulina están unidos covalentemente y que tiene una duración prolongada de acción en comparación con G-CSF en su forma natural.

En la presente memoria, el término “de acción prolongada” se refiere a una duración prolongada de acción en comparación con la de una forma natural. El término “conjugado” se refiere a una estructura en la que el G-CSF, un polímero no peptídico y un fragmento Fc de inmunoglobulina están unidos covalentemente.

Para su uso en la presente invención, el G-CSF tiene una secuencia de aminoácidos de G-CSF humano o de análogos estrechamente relacionados. El G-CSF útil en la presente invención puede ser una proteína existente en la naturaleza o una proteína recombinante. También, el G-CSF puede ser un mutante que ha sufrido la inserción o supresión de aminoácidos siempre que la mutación no tenga una influencia significativa sobre la actividad biológica original de aquél.

El G-CSF humano o sus análogos útiles en la presente invención pueden ser aislados de vertebrados o pueden ser sintetizados químicamente. Alternativamente, el G-CSF o sus análogos pueden ser obtenidos de procariotas o eucariotas que se transforman con un gen que codifica G-CSF o sus análogos usando una técnica de recombinación genética. A este respecto, como células huéspedes se pueden usar bacterias del colon (por ejemplo, E. coli), células de levaduras (por ejemplo, S. cerevisiae) o células de mamíferos (por ejemplo, células de ovarios de hámster chino, células de monos). Dependiendo de las células huéspedes, el G-CSF recombinante o sus análogos pueden estar glucosados con hidratos de carbono de mamíferos o eucariotas o pueden no estar glucosados. Cuando sean expresados, el G-CSF recombinante o sus análogos pueden contener el resto inicial de metionina (posición -1). Preferiblemente, se prepara G-CSF recombinante humano (HuG-CSF) usando como huésped células CHO. El G-

CSF recombinante humano (HuG-CSF) preparado usando E. coli como célula huésped es adecuado para la presente invención. En una realización preferida de la presente invención, el G-CSF recombinante humano es un mutante (17Ser-G-CSF) en la que un resto de serina está situado en la posición 17, en lugar de cisteína en el de tipo salvaje y puede ser expresado como se describe en la patente coreana número 10-356140.

Para su uso en la presente invención, el fragmento Fc de inmunoglobulina tiene una secuencia de aminoácidos de fragmentos Fc de inmunoglobulina humana o de análogos estrechamente relacionados. Los fragmentos Fc se pueden obtener a partir de formas naturales aisladas de animales, incluidos vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas. Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina puede ser un fragmento Fc obtenido de IgG, IgA, IgD, IgF e IgM, o se puede preparar por combinaciones o híbridos de estos. Preferiblemente, se obtiene de IgG o IgM que, entre ellas, es la proteína más abundante en la sangre humana, y lo más preferiblemente se obtiene de IgG, que se sabe aumenta la vida media de las proteínas que se unen a ligandos. En la presente invención, el fragmento Fc de inmunoglobulina se puede obtener de una inmunoglobulina natural aislando inmunoglobulinas completas de organismos humanos o animales y tratándolas con una enzima proteolítica o puede ser recombinantes o derivados obtenidos a partir de células animales transformadas o microorganismos. Preferiblemente, es Fc de inmunoglobulina recombinante humana producido por transformantes de E. coli.

Por otro lado, la IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y la presente invención incluye combinaciones e híbridos de estas. Las subclases preferidas son IgG2 e IgG4 y la más preferida es el fragmento Fc de IgG4, que raramente tiene funciones efectoras tales como CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Es decir, como excipiente del fármaco de la presente invención, el fragmento Fc de inmunoglobulina más preferible es un fragmento Fc no glucosilado obtenido de IgG4 humana. El fragmento Fc derivado de humano es más preferido que un fragmento Fc no derivado de humano, que puede actuar como antígeno en el cuerpo humano y causar respuestas inmunitarias no deseables, como la producción de un nuevo anticuerpo contra el antígeno.

El conjugado de G-CSF de acción prolongada, útil en la presente invención, se prepara uniendo el G-CSF y el fragmento Fc de inmunoglobulina. A este respecto, el G-CSF y el fragmento Fc de inmunoglobulina se pueden entrecruzar mediante un polímero no peptídico o se pueden transformar en una proteína de fusión usando una técnica recombinante.

El polímero no peptídico a usar en el entrecruzamiento se puede seleccionar del grupo que consiste en polímeros biodegradables, polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones de estos. El polímero biodegradable se puede seleccionar de polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polietoxilados, poli(alcohol vinílico), polisacáridos, dextrano, polivinil etil éter, PLA [poli(ácido láctico)], PLGA [poli (ácido láctico)-glicólico] y combinaciones de estos. El más preferido es polietilenglicol (PEG). También, en el alcance de la presente invención se incluyen derivados de estos polímeros, bien conocidos en la técnica y que pueden ser preparados fácilmente.

Los conjugados de G-CSF de acción prolongada útiles en la presente invención se pueden preparar usando una técnica de ingeniería genética, como se describe en la patente coreana número 10-0725315.

La formulación líquida de acuerdo con la presente invención comprende un conjugado de G-CSF de acción prolongada en una cantidad terapéuticamente eficaz. Típicamente, la cantidad terapéuticamente eficaz de G-CSF es aproximadamente 300 mcg por vial de un solo uso. La concentración de los conjugados de G-CSF de acción prolongada usados en la presente invención es del orden de 7 a 22 mg/ml y preferiblemente del orden de 11 a 22 mg/ml.

En la presente memoria, el término “estabilizador” se refiere a una sustancia que permite que el conjugado de G-CSF se almacene de modo seguro. El término “estabilización” significa la pérdida de un ingrediente activo hasta un grado determinado, generalmente hasta 10%, durante un cierto período de tiempo bajo las condiciones de almacenamiento. Se entiende que el G-CSF es estable cuando conserva 90% o más de su actividad original y preferiblemente 95% o más de su actividad original después de haber estado almacenado a 10°C durante 2 años, a 25°C durante 6 meses o a 40°C durante una a dos semanas. En cuanto a proteínas tales como G-CSF, su estabilidad durante el almacenamiento es importante para evitar la degeneración potencial de materiales antigénicos similares al G-CSF así como garantizar cantidades de administración exactas. Durante el almacenamiento, se puede considerar permisible para la administración una pérdida de actividad del G-CSF de aproximadamente 10%, excepto cuando el G-CSF presente en la formulación se agregue o fragmente formando materiales antigénicos.

El estabilizador adecuado para ser usado en la presente invención comprende una solución tamponada formulada para proporcionar el conjugado de G-CSF de acción prolongada, con estabilidad, y manitol.

Además, el estabilizador de acuerdo con la presente invención está preferiblemente exento de albúmina. Como se prepara a partir de sangre humana, es posible que la albúmina de suero humano, disponible como estabilizador de proteínas, esté contaminada por virus patógenos procedentes del hombre. La gelatina o la albúmina de suero de bovinos pueden causar enfermedades o inducir una reacción alérgica en algunos pacientes. Al estar exento de albúmina de suero humano o de animales o de proteínas heterogéneas, como gelatina purificada, el estabilizador de acuerdo con la presente invención carece de consecuencias relativas a infecciones víricas.

La solución tampón presente en el estabilizador desempeña el papel de mantener constante el pH de la formulación líquida evitando fluctuaciones del pH y estabilizando así el conjugado de G-CSF de acción prolongada. La solución tampón útil en la presente invención puede comprender agentes tampón del pH farmacéuticamente aceptables, incluidas sales alcalinas (fosfato sódico o potásico, hidrogenofosfato o dihidrogenofostato sódico o potásico), ácido cítrico/citrato sódico, ácido acético/acetato sódico y combinaciones de estos compuestos). Soluciones tampón adecuadas para su uso en la presente invención son soluciones de citrato, fosfato, tartrato, carbonato, succinato, lactato y acetato, preferiblemente soluciones de fosfato y citrato, más preferiblemente soluciones de citrato. En la solución de citrato usada como tampón, la concentración de citrato varía preferiblemente de 5 a 100 mM y más preferiblemente de 10 a 50 mM. El tampón tiene preferiblemente un pH de 4,0 a 8,0, más preferiblemente un pH de de 5,0 a 7,0 y lo más preferiblemente un pH de 5,0 a 6,0.

En una realización, la estabilidad del conjugado de G-CSF de acción prolongada se evaluó de acuerdo con los valores del pH del tampón usado. A pH 5,5, se encontró que la solución de citrato de pH 5,5 usada como tampón garantiza al G-CSF de acción prolongada una estabilidad mayor que a pH 6,0 (véanse las tablas 2 y 4). A partir de estos resultados, se entiende que el conjugado de G-CSF de acción prolongada de la presente invención está estabilizado en grados diferentes dependiendo de los valores del pH del tampón y muestra un pico de estabilidad a un cierto pH. En particular, se encontró que la estabilidad durante el almacenamiento del conjugado de G-CSF de acción prolongada en el que el fragmento Fc, estable a pH neutro, está unido al G-CSF disminuye cuando la formulación líquida comprende un tampón de pH bajo. Neulasta, un fármaco disponible comercialmente de G-CSF fusionado a PEG, emplea como agente estabilizador una solución tampón de acetato de pH 4. Sin embargo, no es recomendable aplicar la composición convencional de estabilizador y el pH al conjugado de G-CSF de acción prolongada no sólo porque el conjugado de G-CSF de acción prolongada de la presente invención tiene un volumen y un peso molecular mayores que el G-CSF de tipo salvaje, sino también porque el fragmento Fc de inmunoglobulina es estable a un intervalo de pH neutro.

En el estabilizador de la presente invención se usa manitol, un tipo de azúcar hidroxilado, porque actúa aumentando la estabilidad del conjugado de G-CSF de acción prolongada. El manitol se usa preferiblemente a una concentración de 1 a 20% (peso/volumen) (p/v), referida al volumen total de la formulación líquida, más preferiblemente a una concentración de 3 a 10% (p/v) y lo más preferiblemente a una concentración de 5 a 7% (p/v).

De acuerdo con una realización de la presente invención, cuando se usa manitol como estabilizador en presencia de citrato como tampón se observa que la estabilidad durante el almacenamiento del conjugado de G-CSF de acción prolongada se incrementa mucho más que cuando se usa sorbitol (véase la tabla 6). Estos datos muestran la especificidad del manitol como estabilizador del conjugado de G-CSF de acción prolongada en comparación con la de otros estabilizadores, lo cual indica que se necesitan estabilizadores diferentes de acuerdo con los objetivos a estabilizar.

El estabilizador puede comprender además otros azúcares hidroxilados si no deterioran el efecto estabilizador de una combinación de manitol y tampón sobre el conjugado de G-CSF de acción prolongada.

En otra realización de la presente invención, el estabilizador útil en la presente invención puede comprender además por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en agentes isotónicos, alcoholes polihidroxilados, azúcares, tensioactivos no iónicos y aminoácidos neutros, además de la solución tampón y manitol.

El agente isotónico actúa no sólo manteniendo una presión osmótica adecuada cuando se deja que el conjugado de G-CSF de acción prolongada presente en la formulación líquida entre en el organismo, sino que además estabiliza al conjugado de G-CSF de acción prolongada en la formulación líquida. Ejemplos de agentes isotónicos incluyen sales inorgánicas solubles en agua. Entre estas sales están cloruro sódico, sulfato sódico, citrato sódico, cloruro cálcico y combinaciones de estas sales. La sal más preferida es cloruro sódico.

Preferiblemente, la concentración del agente isotónico es del orden de 5 a 200 mM. Dentro de este intervalo, se puede ajustar la concentración del agente isotónico de acuerdo con los tipos y cantidades de los componentes contenidos de modo que la formulación líquida sea isotónica.

Ejemplos preferidos de azúcares que pueden estar contenidos para incrementar la estabilidad durante el almacenamiento del conjugado de G-CSF de acción prolongada incluyen monosacáridos, como manosa, glucosa, fructosa y xilosa, y polisacáridos, como lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa y dextrano. En la formulación líquida el azúcar se usa preferiblemente en una cantidad de 1 a 20% (p/v) y más preferiblemente en una cantidad de 5 a 20% (p/v). Ejemplos de alcoholes polihidroxilados útiles en la presente invención incluyen propilenglicol, polietilenglicol de peso molecular bajo y polipropilenglicol de peso molecular bajo. Estos se pueden usar solos o combinados y su concentración en la formulación líquida es preferiblemente del orden de 1 a 15% (p/v) y más preferiblemente del orden de 5 a 15% (p/v).

En cuanto al tensioactivo no iónico, éste disminuye la tensión superficial de la solución de las proteínas evitando que estas sean adsorbidas o agregadas sobre superficies hidrófobas. Para su uso en la presente invención son adecuados tensioactivos no iónicos a base de polisorbatos y tensioactivos no iónicos a base de poloxámeros. Se

pueden usar solos o combinados. Los preferidos son tensioactivos no iónicos a base de polisorbatos. Entre ellos, están el polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 y polisorbato 80, con mayor preferencia por el polisorbato 80.

No se recomienda usar el tensioactivo no iónico a una concentración alta porque, si está presente a una concentración alta, el tensioactivo no iónico induce interferencias en espectrometría de infrarrojos o enfoque isoeléctrico haciendo más difícil evaluar con precisión la concentración o estabilidad de las proteínas. Por lo tanto, la formulación líquida de la presente invención debe comprender el tensioactivo no iónico preferiblemente a una concentración de 0,1% (p/v) o menos y más preferiblemente a una concentración de 0,001 a 0,05% (p/v).

En cuanto a la estabilidad durante el almacenamiento del conjugado de G-CSF de acción prolongada, se comparó el polisorbato 20 con el polisorbato 80. Se encontró que el polisorbato 80 incrementa la estabilidad del conjugado de G-CSF de acción prolongada más que el polisorbato 20 (véase la tabla 8). Neulasta, formulación de un fármaco de G-CSF fusionado con PEG, emplea polisorbato 20. Sin embargo, la formulación líquida de la presente invención garantiza al G-CSF de acción prolongada una estabilidad cuando contiene polisorbato 80 mayor que cuando contiene polisorbato 20. A partir de estos datos, se entiende que se necesitan tensioactivos diferentes de acuerdo con los objetivos a estabilizar.

En una realización de la presente invención, el conjugado de G-CSF de acción prolongada se mantuvo de modo más estable durante el almacenamiento a 40°C durante 4 semanas en una formulación líquida que contenía como tensioactivo no iónico 0,005% (p/v) de polisorbato 80 que en otra que contenía 0,01% (p/v) de polisorbato 80 (véase la tabla 10).

Un aminoácido, disponible también como estabilizador de la formulación líquida, actúa atrayendo más moléculas de agua alrededor del G-CSF en solución, por lo que las moléculas hidrófilas exteriores de aminoácidos del G-CSF se estabilizan más (Wang, Int. J. Pharm., 185: 129-188, 1999). A este respecto, los aminoácidos con carga eléctrica pueden inducir atracción electrostática con G-CSF promoviendo la agregación del C-CSF. Por lo tanto, como componente estabilizador se añaden aminoácidos neutros, como glicina, alanina, leucina e isoleucina. En la formulación líquida, el aminoácido neutro se usa preferiblemente a una concentración de 0,1 a 10% (p/v).

En una realización de la presente invención, un estabilizador que comprendía manitol a una concentración de 3 a 12% (p/v), referida al volumen total de la formulación líquida, permitió almacenar de modo estable durante 4 semanas el conjugado de G-CSF de acción prolongada que tiene un fragmento Fc de peso molecular alto, incluso aunque no se añadieran aminoácidos neutros (véase la tabla 12). En consecuencia, se puede preparar una formulación líquida para proporcionar alta estabilidad a conjugados de C-CSF de acción prolongada usando una concentración alta de manitol, incluso aunque no se añadan aminoácidos neutros. Sin embargo, una concentración de manitol que exceda de 20% (p/v) está fuera del límite isotónico superior. Por lo tanto, en la formulación líquida se usa manitol a una concentración de 1 a 20% (p/v), preferiblemente a una concentración de 3 a 10% (p/v), y más preferiblemente a una concentración de 5 a 7% (p/v).

Además de los componentes antes mencionados que incluyen un tampón, un agente isotónico, un azúcar polihidroxilado, un aminoácido neutro y un tensioactivo no iónico, la formulación líquida de la presente invención también puede comprender selectivamente otros componentes conocidos en la técnica siempre que no deterioren el efecto de la presente invención.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la formulación líquida no contiene albúmina y puede comprender una solución tampón, manitol, un agente isotónico y un tensioactivo no iónico.

Con más detalle, la presente invención proporciona una formulación líquida que comprende un conjugado de C-CSF de acción prolongada y un estabilizador, comprendiendo el estabilizador fosfato o citrato como tampón, manitol, un agente isotónico y polisorbato 80, seleccionándose el agente isotónico del grupo que consiste en cloruro sódico, sulfato sódico, citrato sódico y combinaciones de estas sales.

Preferiblemente, la formulación líquida comprende como tampón fosfato o citrato a una concentración que varía de 5 a 100 mM y con un pH de 5 a 7, manitol a una concentración de 1 a 20% (p/v), un agente isotónico a una concentración de 5 a 200 mM, seleccionándose el agente isotónico del grupo que consiste en cloruro sódico, sulfato sódico y citrato sódico, y polisorbato 80 a una concentración de 0,001 a 0,05% (p/v). Más preferiblemente, la formulación líquida comprende como solución tampón citrato a una concentración de 5 a 100 mM y con un pH de 5 a 6, manitol a una concentración de 1 a 10% (p/v), cloruro sódico a una concentración de 100 a 200 mM y polisorbato 80 a una concentración de 0,001 a 0,05% (p/v). Lo más preferiblemente, la formulación líquida comprende citrato como tampón a una concentración 20 mM (pH 5,2-5,8), manitol a una concentración de 3 a 7% (p/v) cloruro sódico a una concentración de 100 a 200 mM y polisorbato 80 a una concentración de 0,001 a 0,05% (p/v) y no se usan aminoácidos en la formulación líquida.

En una realización de la presente invención, para estudiar la estabilidad, se comparó una formulación líquida de conjugados de G-CSF de acción prolongada que contenía una solución de citrato sódico como tampón (pH 5,5), 5% (p/v) de manitol, cloruro sódico 150 mM y 0,005% (p/v) de polisorbato 80 con Neulasta, formulación conocida de C-CSF, Amgen. Se encontró que el C-GSF era más estable en la formulación líquida de la presente invención que en otra disponible comercialmente que comprendía citrato sódico de pH 4 (véase la tabla 14).

En otra realización, se ensayó la estabilidad durante el almacenamiento de conjugados de C-CSF de acción prolongada que comprendían citrato como tampón (pH 5,5), manitol, cloruro sódico y polisorbato 80 de acuerdo con la presente invención y se encontró que los conjugados de C-CSF de acción prolongada mantenían la estabilidad durante 6 meses y garantizaban por lo menos 96,6% de la actividad, incluso después de 6 meses de almacenamiento bajo condición acelerada (véase la tabla 16).

A partir de estos datos, se entiende que la formulación líquida que comprende un tampón cuyo pH varía de 5 a 6 y manitol a una concentración de 1 a 20% (p/v) puede almacenar de modo estable conjugados de C-CSF de acción prolongada durante 12 meses o más.

[Efectos ventajosos]

Como se ha descrito anteriormente, el estabilizador que comprende un tampón y manitol de acuerdo con la presente invención es especial para conjugados de C-CSF de acción prolongada. Al estar exenta de albúmina de suero humano y de otros factores perjudiciales potenciales para el organismo, la formulación líquida de conjugados de C-CSF de acción prolongada de acuerdo con la presente invención carece de consecuencias relativas a infecciones víricas y garantiza excelente estabilidad durante el almacenamiento a los conjugados de C-CSF de acción prolongada en los que el C-CSF y un fragmento Fc de inmunoglobulina están unidos covalentemente y que además tienen un peso molecular mayor y una duración de acción mayor que formas naturales de C-CSF.

[Descripción de los dibujos]

La figura 1 es una gráfica que muestra la estabilidad de G-CSF en formulaciones líquidas para conjugado de C-CSF de acción prolongada en las que se usan tampones con valores diferentes del pH y en Neulasta, formulación de G-CSF fusionada con PEG, cuando se analizan usando cromatografía líquida de alta resolución, de exclusión molecular (SE-HPLC) cada semana durante la duración del almacenamiento a 40°C durante dos semanas.

[Modo de la invención]

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención mediante los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar pero que no se deben considerar limitativos de la presente invención.

Ejemplo 1: Construcción de conjugado de G-CSF de acción prolongada

<1.1> Preparación de fragmento Fc de inmunoglobulina usando inmunoglobulina

El fragmento Fc de inmunoglobulina útil en la presente invención fue fragmento Fc de IgG4 no glucosilada que puede ser expresado a partir de transformante de E. coli como se describe en la patente coreana número 725314.

<1.2> Preparación de factor estimulante recombinante humano de colonias de granulocitos

El G-CSF recombinante humano usado en este ejemplo es un mutante (17Ser-G-CSF) en el que un resto de serina está situado en la posición 17, en lugar de cisteína en el de tipo salvaje y puede ser expresado a partir de transformante de E. coli como se describe en la patente coreana número 356140.

<1.3> Preparación de conjugado de G-CSF de acción prolongada usando fragmento Fc de inmunoglobulina

El conjugado de G-CSF de acción prolongada en este ejemplo fue una construcción en la que un factor estimulante humano de colonias de granulocitos y fragmento Fc de inmunoglobulina están unidos covalentemente por un polímero no peptídico y que se obtuvo como se describe en las patentes coreanas números 725315 y 775343

Ejemplo 2: Ensayo de la estabilidad de conjugados de G-CSF de acción prolongada de acuerdo con el pH del tampón.

Para formular una formulación líquida para estabilizar el conjugado de G-CSF preparado en el ejemplo 1, se realizó un examen del efecto que la variación de los valores del pH tenía sobre la estabilidad del conjugado de G-CSF de acción prolongada.

Para el ensayo, se prepararon formulaciones líquidas para el conjugado de G-CSF de acción prolongada de la tabla 1 con composiciones de estabilizadores que comprendían manitol como agente estabilizador, polisorbato 80 como tensioactivo y una solución de citrato sódico con un pH de 5,0, 5,5 o 6,0 como tampón. Después se almacenaron a 40°C durante dos semanas y se realizó su análisis de cromatografía de exclusión molecular. Los resultados se resumen en la tabla 2. El índice de retención del conjugado de G-CSF de acción prolongada comparado con su valor inicial se expresó como SE-HPLC (%).

Tabla 1

	G-CSF	Tampón	Sal	Agente estabilizador	Tensioactivo
1	6 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 5,0	NaCl 150 mM	5% de manitol	0,01% de polisorbato 80
2	6 mg/ml	Citrato sódico mM, pH 5,5	NaCl 150 mM	5% de manitol	0,01% de polisorbato 80
3	6 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 6,0	NaCl 150 mM	5% de manitol	0,01% de polisorbato 80

Tabla 2

	HPLC de exclusión molecular (%)		
	Inicial	Semana 1	Semana 2
1	100	No analizado	No analizado
2	100	94,9	94,6
3	100	90,6	89,8

Como es evidente por los datos de la tabla 2, un tampón de citrato sódico a un pH de 5,0 causa la precipitación de la proteína en la semana 1 mientras que no se detectó precipitación cuando se usó un tampón de citrato sódico a un pH de 5,5 o 6,0. También se observó que la estabilidad del G-CSF de acción prolongada se incrementó más en un tampón de citrato sódico que tenía un pH de 5,5 que en uno que tenía un pH de 6,0.

Se realizó el siguiente experimento con tampones que tenían valores de pH subdivididos. Se prepararon formulaciones líquidas para conjugados de G-CSF de acción prolongada con las composiciones de estabilizadores indicadas en la tabla 3 y se almacenaron a 40°C durante dos semanas antes de ser analizadas usando cromatografía de fase inversa y cromatografía de exclusión molecular (SE-HPLC). Los resultados se resumen en la tabla 4. El índice de retención del conjugado de G-CSF de acción prolongada comparado con su valor inicial se expresó como SE-HPLC (%).

Tabla 3

	G-CSF	Tampón	Sal	Agente Estabilizador	Tensioactivo
1	6 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 5,5	NaCl 150 mM	5% de manitol	0,005% de polisorbato 80
2	6 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 5,2	NaCl 150 mM	5% de manitol	0,005% de polisorbato 80
3	6 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 5,8	NaCl 150 mM	5% de manitol	0,005% de polisorbato 80

Tabla 4

	HPLC de fase inversa (%)			HPLC de exclusión molecular (%)		
	Inicial	Semana 1	Semana 2	Inicial	Semana 1	Semana 2
1	100	95,5	90,4	100	95,4	90,5
2	100	95,8	91,9	100	96,4	94,4
3	100	95,7	91,8	100	93,8	89,8

Como se ve en la tabla 4, después de almacenarlo durante dos semanas en tampones de citrato sódico con pH de 5,2 a 5,5, se encontró que el conjugado de G-CSF de acción prolongada conservaba aproximadamente 90% o más de la actividad inicial.

A partir de estos resultados, se observa que los conjugados de G-CSF de acción prolongada de acuerdo con la presente invención se estabilizan en grados diferentes dependiendo de los valores del pH del tampón usado, con un pico de estabilidad en un intervalo de pH determinado.

En particular, se encontró que la estabilidad durante el almacenamiento del conjugado de C-CSF de acción prolongada en el que el fragmente Fc, estable a pH neutro, está unido covalentemente al C-CSF disminuyó en una formulación líquida que comprendía un tampón de pH bajo.

Ejemplo 3: Ensayo de actividad de conjugados de G-CSF de acción prolongada de acuerdo con azúcares hidroxilados

Se ensayó del modo siguiente la capacidad de azúcares hidroxilados, como sorbitol y manitol, de estabilizar el conjugado de G-CSF de acción prolongada.

Se prepararon como se indica en la tabla 5 formulaciones líquidas de conjugados de G-CSF de acción prolongada con composiciones de estabilizadores que comprendían manitol o sorbitol como azúcares hidroxilados, cloruro sódico como agente isotónico y polisorbato como tensioactivo y se almacenaron a 40°C durante cuatro semanas antes de ser analizadas usando cromatografía de exclusión molecular (SE-HPLC). Los resultados se resumen en la tabla 6. El índice de retención del conjugado de G-CSF de acción prolongada, comparado con su valor inicial (superficie %/superficie inicial %) se expresó como SE-HPLC (%).

Tabla 5

	G-CSF	Tampón	Sal	Agente estabilizador	Tensioactivo
1	3 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 6,0	NaCl 150 mM	5% de manitol	0,01% de polisorbato 80
2	3 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 6,0	NaCl 150 mM	5% de sorbitol	0,01% de polisorbato 80

Tabla 6

	HPLC de exclusión molecular (%)			
	Inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 4
1	100	97,9	97,3	93,7
2	100	100	96,6	90,7

Como es evidente por los datos de la tabla 6, el uso de manitol en lugar de sorbitol como agente estabilizador mantiene más estable al conjugado de G-CSF de acción prolongada.

Ejemplo 4: Ensayo de estabilidad de conjugados de G-CSF de acción prolongada de acuerdo con el tipo de tensioactivo

En presencia de citrato sódico como tampón, se ensayó del modo siguiente la capacidad de diversos tensioactivos no iónicos de estabilizar el conjugado de G-CSF de acción prolongada.

En el ensayo se compararon dos tensioactivos no iónicos, polisorbato 80 y polisorbato 20, estando contenido el segundo en Naulasta, una formulación líquida disponible comercialmente de G-CSF fusionado con PEG. Se emplearon en la combinación apropiada otros agentes que incluían citrato sódico como tampón (pH 5,5) y manitol, que había mostrado proporcionar estabilidad al conjugado de G-CSF de acción prolongada en los ejemplos 2 y 3. Se prepararon formulaciones líquidas de conjugado de G-CSF de acción prolongada, con composiciones de estabilizadores que comprendían diferentes tipos de polisorbato, indicadas en la tabla 7, y se almacenaron a 40°C durante semanas antes de ser analizadas usando cromatografía de exclusión molecular (SE-HPLC). Los resultados se resumen en la tabla 8. El índice de retención del conjugado de G-CSF de acción prolongada comparado con su valor inicial se expresó como SE-HPLC (%).

Tabla 7

	G-CSF	Tampón	Sal	Agente estabilizador	Tensioactivo
1	6 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 5,5	NaCl 150 mM	5% de manitol	0,005% de polisorbato 20
2	6 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 5,5	NaCl 150 mM	5% de sorbitol	0,005% de polisorbato 80

Tabla 8

	HPLC de exclusión molecular (%)			
	Inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 4
1	100	95,6	94,6	85,0
2	100	95,4	95,8	92,4

Como se ve en la tabla 8, bajo las mismas condiciones, el polisorbato 80 garantizó mayor estabilidad al conjugado de G-CSF de acción prolongada que el polisorbato 20. No se detectó diferencias significativas en la estabilidad durante el almacenamiento entre los dos C-CSF de acción prolongada hasta el término de las dos semanas de almacenamiento a 40°C. Sin embargo, en la semana 4, los tensioactivos no iónicos exhibieron diferencias significativas en la estabilidad durante el almacenamiento aunque son muy similares en estructura.

Ejemplo 5: Ensayo de estabilidad de conjugados de C-CSF de acción prolongada en relación con la concentración de tensioactivo no iónico

En el ejemplo 4 se evaluó que el polisorbato 80 es más eficaz para estabilizar el G-CSF de acción prolongada que el polisorbato 20. En este ejemplo, se examinó el efecto de la concentración de polisorbato 80 sobre la estabilidad del conjugado de G-CSF de acción prolongada. Para este fin, se prepararon las formulaciones líquidas de conjugado de G-CSF de acción prolongada con las composiciones de estabilizador indicadas en la tabla 9 y se almacenaron a 40°C durante cuatro semanas antes de ser analizadas usando cromatografía de exclusión molecular. Los resultados se resumen en la tabla 10. El índice de retención del conjugado de G-CSF de acción prolongada comparado con su valor inicial se expresó como SE-HPLC (%).

Tabla 9

	G-CSF	Tampón	Sal	Agente estabilizador	Tensioactivo
1	6 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 5,5	NaCl 150 mM	5% de manitol	0,005% de polisorbato 80
2	6 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 5,5	NaCl 150 mM	5% de sorbitol	0,01% de polisorbato 80

Tabla 10

	HPLC de exclusión molecular (%)			
	Inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 4
1	100	95,4	95,8	92,4
2	100	94,9	95,3	85,1

Como se muestra en la tabla 10, en la duración de almacenamiento de cuatro semanas a 40°C, se encontró que el conjugado de G-CSF de acción prolongada es más estable en una formulación líquida que comprende 0,005% de polisorbaro 80 que en una con 0,01% de polisorbatto 80.

Ejemplo 6: Ensayo de estabilidad de conjugados de G-CSF de acción prolongada en relación con aminoácidos

Se ensayó la capacidad de un aminoácido de estabilizar los conjugados de C-CSF de acción prolongada. Se realizó un experimento para evaluar la estabilidad durante el almacenamiento del g-CSF de acción prolongada con estabilizadores que comprendían citrato sódico como tampón (pH 6,0), manitol y el aminoácido neutro glicina.

Se prepararon formulaciones líquidas de conjugados de G-CSF de acción prolongada con las composiciones de estabilizador indicadas en la tabla 11 y se almacenaron a 40°C durante cuatro semanas antes de ser analizadas usando cromatografía de exclusión molecular. Los resultados se resumen en la tabla 12. El índice de retención del conjugado de G-CSF de acción prolongada comparado con su valor inicial [superficie (%) / superficie inicial (%)] se expresó como SE-HPLC (%)

Tabla 11

	G-CSF	Tampón	Sal	Agente estabilizador	Tensioactivo
1	10 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 6,0	NaCl 100 mM	5% de manitol	0,01% de polisorbato 80
2	10 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 6,0	NaCl 100 mM	5% de manitol, Glicina 10 mM	0,01% de polisorbato 80
3	10 mg/ml	Citrato sódico 20 mM, pH 6,0	NaCl 100 mM	5% de sorbitol	0,01% de polisorbato 80

Tabla 12

	HPLC de exclusión molecular (%)			
	Inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 4
1	100	97,9	97,3	93,7
2	100	98,2	97,3	93,4
3	100	100	96,6	90,7

Como se ve en la tabla 12, incluso en ausencia del aminoácido neutro glicina, la formulación líquida que comprende una concentración alta de manitol [5% (p/v)] garantizó la estabilidad durante el almacenamiento del conjugado de acción prolongada a un nivel similar al obtenido cuando se usó el aminoácido neutro.

Ejemplo 7: Comparación de la estabilidad durante el almacenamiento de conjugados de C-CSF de acción prolongada entre formulaciones líquidas

Con respecto a la estabilidad durante el almacenamiento, la formulación líquida que se había preparado con una composición de estabilizador que comprendía citrato sódico como tampón (pH 5,5), cloruro sódico, manitol y polisorbato 80, que en los ejemplos 2 a 6 había demostrado tener capacidad estabilizadora, se comparó con Neulasta, formulación líquida disponible comercialmente de C-CSF, Amgen. Las composiciones de la formulación líquida de la presente invención y de Neulasta se muestran en la tabla 13. Cuando estaban almacenadas a 40°C durante dos semanas, las formulaciones líquidas de conjugado de C-CSF de acción prolongada se analizaron cada semana usando cromatografía de fase inversa y cromatografía de exclusión molecular. Los resultados se resumen en la tabla 14. El índice de retención del conjugado de C-CSF de acción prolongada comparado con su valor inicial se expresó como RP-HPLC (%) y SE-HPLC (%).

Tabla 13

	Concentración	Tampón	Sal	Agente estabilizador	Tensioactivo
Neulasta	6mg/0,6 ml	Acetato sódico 10 mM (pH 4,0)	---	5% de sorbitol	0,003% de polisorbato 20
G-CSF de acción prolongada	G-CSF 6mg/ml	Citrato sódico 20 mM (pH 5,5)	NaCl 150 mM	5% de manitol	0,005% de polisorbato 80

Tabla 14

	HPLC de fase inversa (%)			HPLC de exclusión molecular (%)		
	Inicial	Semana 1	Semana 2	Inicial	Semana 1	Semana 2
Neulasta	100	99,7	97,7	100	98,4	94,8
G-CSF de acción prolongada	100	98,5	97,5	100	96,9	95,8

Como es evidente por los datos de la tabla 14, después de un tiempo de almacenamiento largo, la formulación líquida del conjugado de C-CSF de acción prolongada de la presente invención garantizó una estabilidad durante el almacenamiento equivalente o mayor que la proporcionada por Neulasta.

A partir de estos resultados, se observa que las formulaciones líquidas de la presente invención son capaces de garantizar excelente estabilidad durante el almacenamiento, específicamente para el conjugado de C-CSF de acción prolongada.

Ejemplo 8: Ensayo de estabilidad durante el almacenamiento de larga duración y estabilidad acelerada de formulaciones líquidas de conjugado de C-CSF de acción prolongada

Para examinar la estabilidad durante el almacenamiento de larga duración y la estabilidad acelerada, la formulación líquida de conjugado de C-CSF de acción prolongada, preparada a partir de una composición de estabilizador que comprende citrato sódico como tampón (pH 5,5), cloruro sódico, manitol y polisorbato 80, que había demostrado garantizar la mayor estabilidad durante el almacenamiento en los ejemplos 2 a 6, se almacenó a 4°C durante 12 meses y posteriormente a 25°C durante 6 meses, durante cuyo tiempo se analizó la estabilidad de las muestras durante el almacenamiento. Los resultados se resumen en las tablas 15 y 16. En las tablas 15 y 16, el índice de retención del conjugado de C-CSF de acción prolongada comparado con su valor inicial se expresó como RP-HPLC (%), SE-HPLC (%), contenido de proteína (%) y actividad biológica inerte (%).

Tabla 15

Ensayo de estabilidad durante almacenamiento de larga duración (almacenamiento a 4°C									
Duración del almacenamiento	Propiedades	pH	Ensayo de identificación		Ensayo de pureza			Ensayo de contenido de proteína (%)	Actividad biológica inerte (%)
			RP-HPLC	Transferencia Western	SDS-PAGE	RP-HLC (%)	SE-HPLC (%)		
Inicial	Transparente incolora	5,5	Conforme	Adecuada	Adecuada	100,0	100,0	100,0	100,0
3 meses	Transparente incolora	5,5	Conforme	Adecuada	Adecuada	100,1	101,1	No analizado	120,5
6 meses	Transparente incolora	5,5	Conforme	Adecuada	Adecuada	99,6	102,0	No analizado	102,3
9 meses	Transparente incolora	5,5	Conforme	Adecuada	Adecuada	99,5	101,6	No analizado	86,4
12 meses	Transparente incolora	5,5	conforme	Adecuada	Adecuada	100,0	101,6	No analizado	81,1

Tabla 16

Ensayo de estabilidad acelerada (almacenamiento a 25°C									
Duración del almacenamiento	Propiedades	pH	Ensayo de identificación		Ensayo de pureza			Ensayo de contenido de proteína (%)	Actividad biológica inerte (%)
			RP-HPLC	Transferencia Western	SDS-PAGE	RP-HLC (%)	SE-HPLC (%)		
Inicial	Transparente incolora	5,5	Conforme	Adecuada	Adecuada	100,0	100,0	100,0	100,0
2 meses	Transparente incolora	No analizado	Conforme	Adecuada	Adecuada	100,2	99,0	No analizado	75,0
4 meses	Transparente incolora	No analizado	Conforme	Adecuada	Adecuada	98,4	100,4	No analizado	78,0
9 meses	Transparente incolora	5,5	Conforme	Adecuada	adecuada	96,6	99,7	100,9	81,8

Como es evidente por los datos de las tablas 15 y 16, el conjugado de G-CSF de acción prolongada se mantuvo muy estable durante 6 meses en la formulación líquida que comprendía la composición de estabilizador de acuerdo con la presente invención y se encontró que tenía 92,5% de la actividad inicial incluso después de haber estado almacenada durante 6 meses en la formulación líquida bajo la condición acelerada. Por lo tanto, la formulación líquida para el conjugado de G-CSF de acción prolongada de acuerdo con la presente invención exhibe estabilidad eficaz durante el almacenamiento.

[Aplicabilidad industrial]

Al estar exenta de albúmina de suero humano, la formulación líquida que garantiza específicamente a los conjugados de G-CSF de acción prolongada de acuerdo con la presente invención estabilidad durante el almacenamiento carece de consecuencias relativas a infecciones víricas. Comprende una composición simple teniendo por lo tanto una ventaja económica sobre otros estabilizadores o formulaciones secadas por liofilización. Además, como contiene un conjugado de G-CSF de acción prolongada que tiene mayor duración de acción que una forma natural así como mantiene la actividad de la proteína durante un período de tiempo mucho mayor, la formulación líquida puede ser usada como sistema de fármaco eficaz.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación líquida de un conjugado del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) de acción prolongada, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado del factor estimulante de colonias de granulocitos de acción prolongada, en el que el G-CSF está unido covalentemente a un fragmento Fc. de inmunoglobulina mediante un polímero no peptídico, y un estabilizador exento de albúmina que comprende un tampón y manitol.

2. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración de manitol varía de 1 a 20% (peso/volumen) (p/v), referida al volumen total de la formulación líquida.

3. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tampón se selecciona del grupo que consiste en tampones de citrato, fosfato, tartrato, carbonato, succinato y acetato.

4. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración del tampón varía de 5 a 100 mM.

5. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el pH del tampón varía de 4 a 8.

6. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el estabilizador exento de albúmina comprende además un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en un agente isotónico, un alcohol polihidroxilado, un azúcar, un tensioactivo no iónico, un aminoácido neutro, y una combinación de estos.

7. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el agente isotónico es una sal seleccionada del grupo que consiste en cloruro sódico, sulfato sódico, citrato sódico y una combinación de estos.

8. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la concentración del agente isotónico varía de 5 a 200 mM.

9. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el tensioactivo no iónico es un tensioactivo no iónico basado en polisorbato o basado en poloxámero.

10. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el tensioactivo no iónico basado en polisorbato se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 y polisorbato 80.

11. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la concentración del tensioactivo no iónico varía de 0,001 a 0,05% (p/v) referida al volumen total de la formulación líquida.

12. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el aminoácido neutro se selecciona del grupo que consiste en glicina, alanina, leucina, isoleucina y una combinación de estas.

13. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la concentración del aminoácido neutro en la formulación líquida varía de 0,1 a 10% (p/v).

14. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el estabilizador exento de albúmina comprende un tampón de citrato con un pH que varía de 5 a 8 y a una concentración que varía de 5 a 100 mM, manitol a una concentración de 1 a 20% (p/v), cloruro sódico a una concentración de 5 a 200 mM y polisorbato 80 a una concentración de 0,001 a 0,05% (p/v).

15. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el C-CSF es un G-CSF mutante (^{17}Ser-G-CSF) en el que un resto de serina está situado en la posición 17, en lugar de un resto de cisteína del G-CSF del tipo salvaje.

16. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración del conjugado de G-CSF varía de 7 a 22 mg/ml.

17. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE, IgM y una combinación de estos.

18. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento híbrido compuesto de dominios de orígenes diferentes del grupo que consiste en IgG, IgA, IgG, IgE e IgM.

19. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina está en forma de dímero o multímero de inmunoglobulinas de cadena única compuestos de dominios del mismo origen.

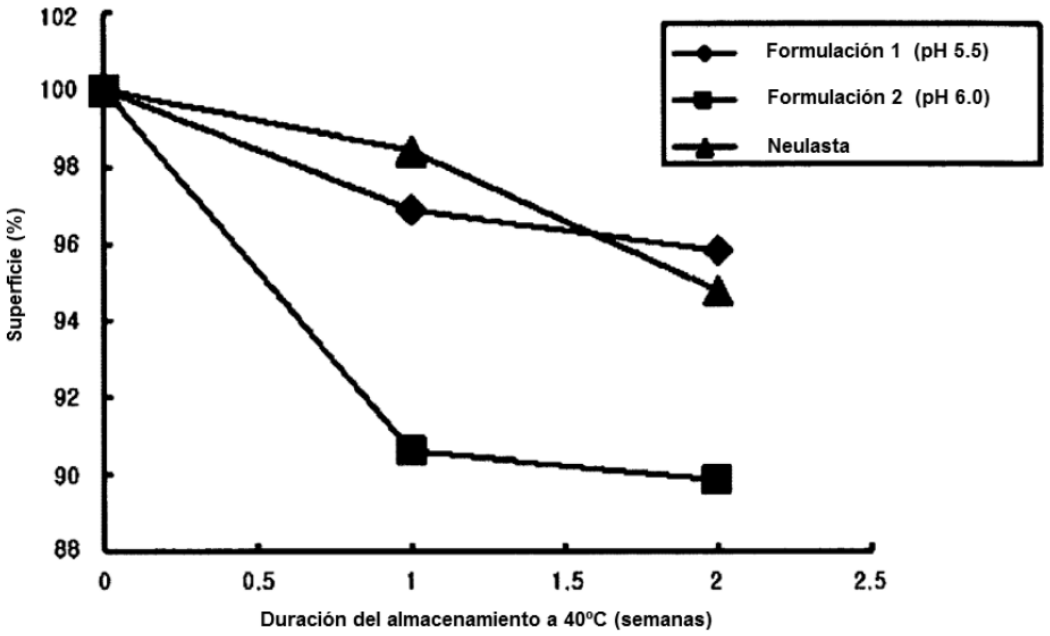
20. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG4.

21. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 20, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG4 humana no glucosilada.

22. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polímero no peptídico se selecciona del grupo que consiste en un polímero biodegradable, un polímero lipídico, quitina, ácido hialurónico y una combinación de estos.

23. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 22, en la que el polímero biodegradable se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol y propilenglicol, polioles polietoxilados, poli(alcohol vinílico), polisacáridos, dextrano, polivinil etil éter, PLA (ácido poliláctico) y PLGA (ácido poliláctico-glicólico).

[Figura 1]



Número	Concentración (mg/ml)	Tampón	Sal	Estabilizador	Tensioactivo
1	6	Citrato sódico 20 mM pH 5,5	NaCl 150 mM	5% de manitol	0,005% de polisorbato 80
2	6	Citrato sódico 20 mM pH 6,0	NaCl 150 mM	5% de manitol	0,01% de polisorbato 80
Neulasta	10	Acetato sódico 10 mM pH 4,0	---	5% de sorbitol	0,003% de polisorbato 20