

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 925**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 47/02** (2006.01)  
**A61K 47/18** (2007.01)  
**A61K 47/68** (2007.01)  
**A61K 47/10** (2007.01)  
**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/KR2011/000370**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO11090306**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2011 E 11734855 (7)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2525779**

54 Título: **Formulaciones líquidas para conjugado de eritropoyetina de acción prolongada**

30 Prioridad:

**19.01.2010 KR 20100004840**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.02.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BAE, SUNG MIN;  
IM, DAE SEONG;  
KIM, MIN YOUNG;  
LIM, CHANG KI;  
JUNG, SUNG YOUB y  
KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 700 925 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**

Formulaciones líquidas para conjugado de eritropoyetina de acción prolongada

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a una formulación líquida para garantizar la estabilidad de almacenamiento a largo plazo de un conjugado de eritropoyetina de acción prolongada en el que la eritropoyetina, un polímero no peptídico y un fragmento Fc de inmunoglobulina están unidos covalentemente y que exhiben una duración prolongada de acción en comparación con el tipo silvestre.

**Antecedentes de la invención**

10 La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína que consta de 165 restos de aminoácidos, que actúa como una citoquina para los precursores de eritrocitos en la médula ósea, por lo que es responsable de controlar la eritropoyesis (producción de glóbulos rojos). La EPO se sintetiza principalmente por las células renales, y el hígado produce una pequeña cantidad. Como se observa en la insuficiencia renal crónica, la pérdida de las funciones renales suele ir acompañada de una disminución, por ejemplo, en el nivel de EPO, con una disminución concomitante en la producción de eritrocitos. Ahora, la EPO se usa para tratar la anemia resultante de una enfermedad renal crónica y de otras enfermedades críticas, además de administrarse a pacientes programados para someterse a una cirugía (Miyake et al., J. Biol. Chem. 25: 5558-5564, 1977; Eschbach et al., New Engl. J. Med. 316: 73-78, 1987; Sanford BK, Blood, 177: 419-434, 1991; PCT WO 85-02610).

15 La EPO urinaria humana se purificó por primera vez a partir de pacientes con anemia aplásica por Miyake et al. (Miyake et al., J. Biol. Chem., 252: 5558, 1977), pero la cantidad de EPO de esta fuente es insuficiente para el uso en el tratamiento de la anemia. Desde la publicación de la Patente de EE.UU. n.º 4.703.008 que desvela la identificación y clonación de un gen de la EPO humano y la expresión de las proteínas de recombinación de EPO, se ha logrado la producción en masa de EPO mediante varias manipulaciones genéticas diferentes.

20 Debido a que los polipéptidos tienden a desnaturalizarse fácilmente debido a su baja estabilidad, se degradan por enzimas proteolíticas en la sangre y pasan fácilmente a través del riñón o el hígado, con frecuencia deben administrarse a los pacientes medicamentos de proteínas, incluidos los polipéptidos como componentes farmacéuticamente eficaces, para mantener el nivel deseado de concentraciones y títulos en sangre. Sin embargo, esta administración frecuente de medicamentos proteicos, especialmente por inyección, causa dolor en los pacientes.

25 Para resolver estos problemas, se ha realizado un gran esfuerzo para mejorar la estabilidad del suero de los fármacos proteínicos y mantener los fármacos en la sangre a niveles altos durante un período prolongado, y así maximizar la eficacia farmacéutica de los fármacos. Para su uso en formulaciones de acción prolongada, los fármacos proteicos deben formularse para tener una alta estabilidad y mantener sus títulos en niveles suficientemente altos sin incurrir en respuestas inmunitarias en los pacientes.

30 Para estabilizar las proteínas y prevenir la degradación enzimática y el aclaramiento por los riñones, convencionalmente se usó un polímero que tiene una alta solubilidad, como el polietilenglicol (PEG), para modificar químicamente la superficie de un fármaco proteico. Al unirse a regiones específicas o diversas de una proteína objetivo, el PEG estabiliza la proteína y evita la hidrólisis, sin causar efectos secundarios graves (Sada et al., J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139, 1991). Sin embargo, a pesar de su capacidad para mejorar la estabilidad de la proteína, la PEGilación tiene problemas como la reducción considerable de los títulos de proteínas fisiológicamente activas. Además, el rendimiento disminuye al aumentar el peso molecular del PEG debido a la reactividad reducida de las proteínas.

35 Un método alternativo para mejorar la estabilidad *in vivo* de proteínas fisiológicamente activas es unir un gen de una proteína fisiológicamente activa a un gen que codifica una proteína que tiene una alta estabilidad sérica mediante tecnología de recombinación genética y cultivar las células transfectadas con el gen recombinante para producir una proteína de fusión. Por ejemplo, una proteína de fusión puede prepararse conjugando albúmina, una proteína que se sabe que es la más efectiva para mejorar la estabilidad de la proteína, o su fragmento con una proteína fisiológicamente activa de interés por recombinación genética (Publicación PCT n.º WO 93/15199 y WO 93/15200, Publicación de Pat. Europea n.º 413,622).

40 Otro método es usar una inmunoglobulina. Como se describe en la Patente de EE.UU. n.º 5.045.312, la hormona del crecimiento humana se conjuga con la albúmina de suero bovino o inmunoglobulina de ratón mediante el uso de un agente de reticulación. Los conjugados tienen una actividad mejorada en comparación con la hormona de crecimiento no modificada. Se emplea carbodiimida o glutaraldehído como agente de reticulación. Sin embargo, al no unirse específicamente a los péptidos, dichos agentes de reticulación de bajo peso molecular no permiten la formación de conjugados homogéneos e incluso son tóxicos *in vivo*. Además, la patente muestra una mejora de la actividad solo gracias al aclaramiento químico con la hormona del crecimiento. El método de la patente no puede garantizar la mejora de la actividad de varios tipos de fármacos polipeptídicos, por lo que la patente no reconoce ni siquiera los factores relacionados con la estabilidad de la proteína, como la duración, el semi-período en sangre, etc.

Recientemente, se ha sugerido una formulación de fármaco que es una formulación de fármaco proteico de acción prolongada que mejora tanto la duración como la estabilidad *in vivo*. Para su uso en la formulación de fármaco de acción prolongada, se prepara un conjugado de proteínas mediante la unión covalente de un polipéptido fisiológicamente activo, un polímero no polipeptídico y un fragmento Fc de inmunoglobulina (Patente Coreana n.º 10-0567902 y 10-0725315).

En este método, la EPO se puede usar como un polipéptido fisiológicamente activo para proporcionar un conjugado de EPO de acción prolongada. Para aplicar conjugados de EPO de acción prolongada a los productos farmacológicos, es necesario mantener la eficacia farmacéutica de los mismos *in vivo* al tiempo que se restringen los cambios fisicoquímicos, como la degeneración, agregación, adsorción o hidrólisis inducida por la luz, el calor o los aditivos durante el almacenamiento y el transporte. Los conjugados de EPO de acción prolongada son más difíciles de estabilizar que el propio polipéptido de EPO porque aumentan en volumen y peso molecular.

Generalmente, las proteínas tienen una semi-vida muy corta y, cuando se exponen a temperaturas inadecuadas, interfaces agua-aire, altas presiones, estrés físico/mecánico, disolventes orgánicos, contaminación microbiana, etc., sufren una degeneración tal como la agregación de monómeros, precipitación por agregación, y adsorción sobre la superficie de los contenedores. Cuando degeneran, las proteínas pierden sus propiedades fisicoquímicas y su actividad fisiológica. Una vez degeneradas, las proteínas casi no pueden recuperar sus propiedades originales porque la degeneración es irreversible. Particularmente en el caso de las proteínas que se administran en cantidades mínimas de cientos de microgramos por inyección, como la EPO, cuando pierden estabilidad y, por lo tanto, se absorben sobre la superficie del contenedor, se produce una cantidad relativamente grande de daño. Adicionalmente, las proteínas absorbidas se agregan fácilmente durante un proceso de degeneración, y los agregados de las proteínas degeneradas, cuando se administran en el cuerpo, actúan como antígenos, a diferencia de las proteínas sintetizadas *in vivo*. Por lo tanto, las proteínas deben ser administradas en forma estable. Se han realizado muchos estudios para prevenir 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).

La liofilización se aplica a algunos medicamentos de proteínas para lograr el objetivo de la estabilidad. Sin embargo, los productos liofilizados son inconvenientes ya que deben volver a disolverse en agua de inyección para su uso. Además, necesitan una inversión masiva en liofilizadores de gran capacidad porque el proceso de liofilización se incluye en los procesos de producción de los mismos. Se sugirió la restricción de proteínas mediante el uso de un secador por pulverización. Sin embargo, este método es económicamente desfavorable debido al bajo rendimiento de producción. Además, un proceso de secado por pulverización expone las proteínas a altas temperaturas, lo que influye negativamente en la estabilidad de las proteínas.

Como alternativa para superar las limitaciones, han aparecido estabilizantes que, cuando se agregan a las proteínas en solución, pueden restringir los cambios fisicoquímicos de los fármacos proteicos y mantener la eficacia farmacéutica *in vivo* incluso después de haber estado almacenados durante un largo período de tiempo. Entre ellos se encuentran los carbohidratos, aminoácidos, proteínas, tensioactivos, polímeros y sales. Entre otros, la albúmina sérica humana se ha utilizado ampliamente como estabilizante para varios fármacos proteicos, con certificación para su rendimiento (Edward Tarelli et al., Biologicals, 26: 331-346, 1998).

Un proceso de purificación típico para la albúmina sérica humana incluye la inactivación de contaminantes biológicos, como micoplasma, priones, bacterias y virus, o la selección o el examen de uno o más contaminantes biológicos o patógenos. Sin embargo, siempre existe el riesgo de que los pacientes estén expuestos a los contaminantes biológicos porque no se eliminan o inactivan completamente. Por ejemplo, se analiza la sangre humana de los donadores para examinar si contiene ciertos virus. Sin embargo, este proceso no siempre es fiable. Particularmente, ciertos virus que existen en un número muy pequeño no pueden ser detectados.

Recientemente se han sugerido alternativas a la albúmina sérica humana, incluida la albúmina recombinante (publicación de patente coreana abierta a inspección pública n.º 10-2004-0111351) y eritropoyetina libre de albúmina (patentes coreanas n.º 10-0560697 y 10-0596610).

Aunque emplean estabilizantes libres de albúmina, diferentes proteínas pueden inactivarse gradualmente debido a sus diferencias químicas, ya que se someten a diferentes relaciones y condiciones durante el almacenamiento. El efecto de un estabilizante en el plazo de almacenamiento de proteínas difiere de una proteína a otra. Es decir, se pueden usar varios estabilizantes en diferentes proporciones dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de interés.

Además, los diferentes estabilizantes, cuando se usan simultáneamente, pueden provocar efectos inversos debido a la competencia y la operación errónea de los mismos. Una combinación de diferentes estabilizantes también provoca diferentes efectos porque hacen que las proteínas cambien de características o concentración durante el almacenamiento. Debido a que cada estabilizante realiza adecuadamente su actividad estabilizante en un cierto rango de concentraciones, se deben hacer muchos esfuerzos para combinar los tipos y concentraciones de diferentes estabilizantes, con cuidado.

Particularmente para los conjugados de EPO de acción prolongada que tienen una mejor duración y estabilidad *in vivo*, sus pesos moleculares y volúmenes son bastante diferentes de los de los compuestos de eritropoyetina en general porque están compuestos del péptido EPO fisiológicamente activo, polímeros no peptídicos y el fragmento Fc de inmunoglobulina. Por consiguiente, para los conjugados de EPO de acción prolongada se requieren estabilizantes con composiciones especiales diferentes de las de los estabilizantes de EPO.

Como parte de la presente invención, una investigación exhaustiva y meticulosa sobre el desarrollo de una formulación líquida estable para conjugados de EPO de acción prolongada, capaz de retener la eficacia farmacéutica durante un largo período de tiempo sin infección viral, dio como resultado el hallazgo de un estabilizante que comprende un tampón y una alta concentración de manitol que proporciona a los conjugados de EPO de acción prolongada una mayor estabilidad y permite la formación de formulaciones líquidas económicas y estables de los conjugados de EPO de acción prolongada.

### **Divulgación**

#### **Problema técnico**

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación líquida que comprenda un conjugado de eritropoyetina de acción prolongada en la que la EPO, un polímero no peptídico y un fragmento Fc de inmunoglobulina estén unidos covalentemente, y un estabilizante libre de albúmina compuesto de tampón y manitol.

#### **Solución técnica**

De acuerdo con una realización de la misma, la presente invención proporciona una formulación líquida que comprende un conjugado de eritropoyetina de acción prolongada en el que la EPO, un polímero no peptídico y un fragmento Fc de inmunoglobulina están unidos covalentemente, y un estabilizante libre de albúmina compuesto de tampón y manitol de acuerdo con la reivindicación 1 del presente documento. El término "conjugado de eritropoyetina de acción prolongada" o "conjugado de EPO de acción prolongada", como se usa en este documento, pretende referirse a una construcción proteica en la que la EPO fisiológicamente activa, uno o más polímeros no peptídicos y uno o más fragmentos Fc de inmunoglobulina están unidos covalentemente y tienen una duración de acción prolongada en comparación con la EPO en su forma natural.

El término "acción prolongada", como se usa en este documento, se refiere a una duración prolongada de la acción en comparación con la de una forma natural. El término "conjugado" se refiere a una construcción en la que la EPO, un polímero no peptídico y un fragmento Fc de inmunoglobulina están unidos covalentemente.

Para su uso en la presente invención, la EPO tiene una secuencia de aminoácidos de eritropoyetina humana o análogos estrechamente relacionados. La EPO útil en la presente invención puede ser una proteína natural o una proteína recombinante. Además, la EPO puede ser un mutante que haya sufrido la inserción, supresión o inserción de aminoácidos, siempre que la mutación no tenga una influencia significativa en la actividad biológica original de los mismos.

La EPO humana o sus análogos útiles en la presente invención pueden aislarse de vertebrados o pueden sintetizarse químicamente. Alternativamente, la EPO o sus análogos se pueden obtener a partir de procariontes o eucariotas que se transforman con un gen que codifica la EPO o sus análogos utilizando una técnica de recombinación genética. En este sentido, pueden usarse bacterias del colon (por ejemplo, *E. coli*), células de ovario de hámster chino, células de mono) como células hospedadoras. Dependiendo de las células hospedadoras, la EPO recombinante o sus análogos pueden estar glicosilados con carbohidratos de mamíferos o eucariotas o aglicosilados. Cuando se expresa, la EPO recombinante o sus análogos pueden contener el resto de metionina inicial (posición -1). Preferiblemente, la EPO humana recombinante (HuEPO) se prepara utilizando células CHO como hospedador.

Para su uso en la presente invención, el fragmento Fc de inmunoglobulina tiene una secuencia de aminoácidos de fragmentos Fc de inmunoglobulina humana o sus análogos estrechamente relacionados. Los fragmentos Fc pueden obtenerse a partir de formas nativas aisladas de animales, como vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas. Además, el fragmento Fc de la inmunoglobulina puede ser un fragmento Fc que se deriva de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, o que se elabora mediante combinaciones de los mismos o híbridos de los mismos. Preferiblemente, se deriva de IgG o IgM, que se encuentra entre las proteínas más abundantes en la sangre humana, y lo más preferiblemente de IgG, que se sabe que mejora la semi-vida de las proteínas de unión al ligando. En el presente documento, la inmunoglobulina Fc se puede obtener a partir de una inmunoglobulina nativa aislando inmunoglobulinas completas de organismos humanos o animales y tratándolas con una enzima proteolítica o puede ser recombinante o derivados de las mismas, obtenidos de células o microorganismos animales transformados. Es preferible el Fc de inmunoglobulina humana recombinante producido por transformantes de *E. coli*.

Por otro lado, la IgG se divide en subclases de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la presente invención incluye combinaciones e híbridos de las mismas. Se prefieren las subclases de IgG2 e IgG4, y el más preferido es el fragmento Fc de IgG4 que rara vez tiene funciones efectoras tales como CDC (citotoxicidad dependiente del

complemento). Es decir, como portador de fármacos de la presente invención, el fragmento Fc de inmunoglobulina más preferible es un fragmento Fc aglicosilado derivado de IgG4 humana. El fragmento Fc derivado de ser humano es más preferible que un fragmento Fc no derivado de ser humano, que puede actuar como antígeno en el cuerpo humano y causar respuestas inmunitarias indeseables como la producción de un nuevo anticuerpo contra el antígeno.

El conjugado de EPO de acción prolongada útil en la presente invención se prepara uniendo la EPO y el fragmento Fc de inmunoglobulina juntos. A este respecto, la EPO y el fragmento Fc de inmunoglobulina pueden estar reticulados a través de un polímero no peptídico o pueden conformarse en una proteína de fusión usando una técnica recombinante.

El polímero no peptídico para su uso en la reticulación puede seleccionarse del grupo que consiste en polímeros biodegradables, polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos. El polímero biodegradable se puede seleccionar entre polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxitilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, polivinil etil éter, PLA (poli (ácido láctico)), PLGA (ácido poliláctico-glicólico), y combinaciones de los mismos. El más preferido es el poli (etilenglicol) (PEG), con preferencia por el polietilenglicol. Además, en el alcance de la presente invención están incluidos sus derivados bien conocidos en la técnica y que pueden prepararse fácilmente dentro de la experiencia de la técnica.

Los conjugados de EPO de acción prolongada útiles en la presente invención pueden prepararse utilizando una técnica de ingeniería genética, como se describe en la patente coreana n.º 10-0725315.

La formación de líquido de acuerdo con la presente invención comprende un conjugado de EPO de acción prolongada en una cantidad terapéuticamente eficaz. Normalmente, la cantidad terapéuticamente eficaz de EPO varía de 2000 a 10.000 unidades internacionales (UI) por vial de un solo uso. La concentración de los conjugados de EPO de acción prolongada utilizados en la presente invención es del orden de 1 a 5000 µg/ml, y preferiblemente del orden de 50 a 3000 µg/ml.

Como se usa en este documento, el término "estabilizante" pretende referirse a una sustancia que permite que el conjugado de EPO de acción prolongada se almacene de manera segura. El término "estabilización" pretende significar la pérdida de un ingrediente activo hasta una tasa predeterminada, generalmente, hasta el 10 %, durante un cierto período de tiempo bajo unas condiciones de almacenamiento. Cuando la EPO retiene el 90 % o más de su actividad original y preferiblemente el 95 % o más de la actividad original después de haber sido almacenada a 10 °C durante 2 años, a 25 °C durante 6 meses o a 40 °C durante una a dos semanas, se entiende como estable. En cuanto a las proteínas como la EPO, su estabilidad de almacenamiento es importante para suprimir la generación potencial de materiales antigénicos similares a la EPO, así como para garantizar cantidades de administración precisas. Durante el almacenamiento, se puede entender que es admisible aproximadamente el 10 % de pérdida de la actividad de la EPO para la administración, a menos que la EPO dentro de la formulación se agregue o esté fragmentada para formar materiales antigénicos.

El estabilizante adecuado para su uso en la presente invención comprende una solución tamponada formulada para dotar de estabilidad al conjugado de EPO de acción prolongada y manitol de acuerdo con la reivindicación 1 del presente documento. Además, el estabilizante de acuerdo con la presente invención preferiblemente está libre de albúmina. Debido a que se prepara a partir de sangre humana, la albúmina sérica humana, disponible como estabilizante para proteínas, puede estar contaminada por virus patógenos derivados de seres humanos. La gelatina o la albúmina de suero bovino pueden causar enfermedades o inducir una reacción alérgica en algunos pacientes. Al estar libre de albúmina sérica derivada de seres humanos o animales o proteínas heterogéneas como la gelatina purificada, el estabilizante de acuerdo con la presente invención se libera de las preocupaciones sobre la infección viral.

El manitol, un tipo de alcohol de azúcar, se usa en el estabilizante de la presente invención porque actúa para mejorar la estabilidad del conjugado de EPO de acción prolongada. El manitol se usa a una concentración del 5 al 20 % (p/v) basado en el volumen total de la formulación líquida. De acuerdo con una realización de la presente invención, cuando se utilizó manitol en presencia de una solución tamponada con fosfato como estabilizante, se demostró que la estabilidad de almacenamiento del conjugado de EPO de acción prolongada aumentaba mucho más que cuando los estabilizantes convencionales incluyen sorbitol y maltosa. Se utilizaron PEG400 y aminoácidos (ver Tabla 1). Cuando se aplica a la presente invención, la maltosa, utilizada como estabilizante en la publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2009-249292, se encontró que disminuía la estabilidad del conjugado de EPO de acción prolongada a medida que se extendía el plazo de almacenamiento (ver Tabla 8).

Estos datos revelan la especificidad del manitol como estabilizante para el conjugado de EPO de acción prolongada, en comparación con otros estabilizantes, lo que indica que se necesitan diferentes estabilizantes de acuerdo con los objetivos que necesitan estabilización.

La solución tampón en el estabilizante desempeña un papel en mantener constante el pH de la formulación líquida para evitar fluctuaciones en el pH, estabilizando así el conjugado de EPO de acción prolongada. La solución tampón útil en la presente invención puede comprender agentes tamponantes de pH farmacéuticamente aceptables que

incluyen sales alcalinas (fosfato de sodio o potasio, sus sales de hidrógeno o dihidrógeno), citrato de sodio/ácido cítrico, acetato de sodio/ácido acético y una combinación de los mismos. Adecuados para su uso en la presente invención son el tampón de citrato, el tampón de fosfato, el tampón de tartrato, el tampón de carbonato, el tampón de succinato, el tampón de lactato y el tampón de acetato, prefiriéndose el tampón de fosfato y el tampón de citrato, prefiriéndose más el tampón de fosfato. En el tampón fosfato, los niveles de fosfato están a una concentración preferiblemente de 5 a 100 mM y más preferiblemente de 10 a 50 mM. El tampón preferiblemente tiene un pH de 4,0 a 8,0 y más preferiblemente un pH de 5,0 a 7,0.

En otra realización de la presente invención, el estabilizante útil en la presente invención puede comprender además al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en agentes isotónicos, alcoholes polihídricos, azúcares, tensioactivos no iónicos y aminoácidos neutros, además de solución tampón y manitol.

El agente isotónico actúa no solo para mantener una presión osmótica adecuada cuando se permite que el conjugado de EPO de acción prolongada en la formulación líquida entre al cuerpo, sino también para estabilizar aún más el conjugado de EPO de acción prolongada en la formación de líquido. Los ejemplos del agente isotónico incluyen sales inorgánicas solubles en agua. Entre ellos se encuentran el cloruro de sodio, el sulfato de sodio, el citrato de sodio, el cloruro de calcio y una combinación de ellos. El más preferible es el cloruro de sodio.

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

De acuerdo con una realización de la presente invención, la influencia sobre la estabilidad del conjugado de EPO de acción prolongada en presencia de una solución tampón se evaluó para varios tipos de sales. Como resultado, se encontró que las formulaciones líquidas que comprenden sulfato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio o una combinación de sulfato de sodio y cloruro de sodio, junto con una solución tamponada con fosfato, aumentan la estabilidad del conjugado de EPO de acción prolongada, en comparación con Formulaciones líquidas libres de sales (ver Tabla 2). A partir de los datos, se entiende que el conjugado de EPO de acción prolongada de la presente invención se estabiliza en diferentes grados dependiendo de los tipos de sales utilizadas y muestra una estabilidad máxima con algunas sales.

Los ejemplos preferidos de azúcar que puede contener adicionalmente para aumentar la estabilidad de almacenamiento del conjugado de EPO de acción prolongada incluyen monosacáridos tales como manosa, glucosa, fucosa y xilosa, y polisacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa y dextrano. En la formulación líquida, el azúcar se usa preferiblemente en una cantidad del 1 al 20 % (p/v) y más preferiblemente se usa en una cantidad del 5 al 20 % (p/v). Los ejemplos del alcohol polihídrico útil en la presente invención incluyen propilenglicol, polietilenglicol de bajo peso molecular, glicerol y polipropilenglicol de bajo peso molecular. Se pueden usar solos o en combinación. Y su concentración en la formulación líquida es preferiblemente del orden del 1 al 15 % (p/v) y más preferiblemente del orden del 5 al 15 % (p/v).

En cuanto al tensioactivo no iónico, disminuye la tensión superficial de la solución de proteína para evitar que las proteínas se adsorban o se agreguen en superficies hidrófobas. Los tensioactivos no iónicos basados en polisorbato y los tensioactivos no iónicos basados en poloxámero son adecuados para su uso en la presente invención. Se pueden usar solos o en combinación. Se prefieren los tensioactivos no iónicos basados en polisorbato. Entre ellos se encuentran el polisorbato 20, el polisorbato 40, el polisorbato 60 y el polisorbato 80, con mayor preferencia por el polisorbato 80.

No se recomienda usar el tensioactivo no iónico en una concentración alta porque el tensioactivo no iónico, si está presente en una concentración alta, induce interferencia con la espectrometría UV o el iso-electroenfoque dificultando la evaluación de la concentración o estabilidad de la proteína con precisión. Por lo tanto, la formulación líquida de la presente invención puede comprender el tensioactivo no iónico preferiblemente a una concentración del 0,1 % (p/v) o menos y más preferiblemente a una concentración del 0,001 al 0,05 % (p/v).

En una realización de la presente invención, se analizaron los tensioactivos no iónicos para determinar el efecto sobre la estabilidad de la proteína en presencia de tampón fosfato. Durante un período de almacenamiento tan corto como una semana, se encontró que los tensioactivos no iónicos tienen poca influencia sobre la estabilidad del conjugado de EPO de acción prolongada (ver Tabla 3). Además, cuando se usó el polisorbato 80 tensioactivo no iónico, se encontró que el conjugado de EPO de acción prolongada estaba más estabilizado durante el almacenamiento por un estabilizante que contenía un 0,01 % de polisorbato 80 que un 0,1 % de polisorbato 80 (ver Tabla 4).

Un aminoácido, también disponible como estabilizante para la formulación líquida, actúa para atraer más moléculas de agua alrededor de la EPO en una solución, de modo que las moléculas de aminoácidos hidrófilas más externas de la EPO se estabilizan aún más (Wang, Int. J. Pharm. 185: 129-188, 1999). En este sentido, los aminoácidos cargados pueden inducir atracción electrostática con la EPO para promover la agregación de EPO. Por lo tanto, los aminoácidos neutros, como la glicina, alanina, leucina e isoleucina, se agregan como componente estabilizante. En la formulación líquida, el aminoácido neutro se usa preferiblemente a una concentración del 0,1 al 10 % (p/v).

En una realización de la presente invención, la maltosa garantizaba una mayor estabilidad de almacenamiento para los conjugados de EPO de acción prolongada cuando se usaba en combinación con glicina que sola. Sin embargo, se observó que el tratamiento con manitol a una concentración tan alta como del 3 al 12 % (p/v) proporciona una mayor estabilidad incluso en ausencia de aminoácidos neutros que el tratamiento con una combinación de maltosa y glicina (ver Tabla 10).

Por consiguiente, se puede preparar una formulación líquida para proporcionar una alta estabilidad para los conjugados de EPO de acción prolongada utilizando una alta concentración de manitol incluso cuando no se agregan aminoácidos neutros. Sin embargo, una concentración de manitol superior al 20 % (p/v) está fuera del límite isotónico superior. Por lo tanto, el manitol se utiliza en una concentración del 5 al 20 % en la formación de líquido. Además de los componentes mencionados anteriormente que incluyen un tampón, un agente isotónico, un alcohol de azúcar, un aminoácido neutro y un tensioactivo no iónico, la formulación líquida de la presente invención puede comprender adicionalmente otros componentes conocidos en la técnica siempre que no deterioren el efecto de la presente invención.

Según 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.

En mayor detalle, la presente invención proporciona una formulación líquida que comprende un conjugado de EPO de acción prolongada y un estabilizante, el estabilizante que comprende tampón fosfato o citrato, manitol, un agente isotónico y polisorbato 80, seleccionándose el agente isotónico del grupo que consiste de cloruro de sodio, sulfato de sodio, citrato de sodio y una combinación de los mismos. Preferiblemente, la formulación líquida comprende una solución tampón de fosfato o citrato a una concentración de 5 a 100 mM, manitol a una concentración del 1 al 20 % (p/v), un agente isotónico a una concentración de 5 a 200 mM, seleccionándose el agente isotónico del grupo que consiste en cloruro de sodio, sulfato de sodio y citrato de sodio, y polisorbato 80 a una concentración del 0,001 al 0,05 % (p/v). Más preferiblemente, la fórmula líquida comprende una solución tampón de fosfato a una concentración de 5 a 100 mM, manitol a una concentración del 3 al 12 % (p/v), cloruro de sodio a una concentración de 100 a 200 mM y polisorbato 80 a una concentración del 0,001 al 0,05 % (p/v). Lo más preferiblemente, la formulación líquida comprende un tampón de fosfato de sodio (pH 6,5) a una concentración de 10 mM, manitol a una concentración del 5 al 10 % (p/v), sodio a una concentración de 100 a 200 mM, y polisorbato 80 a una concentración del 0,001 al 0,05 % (p/v) y no contiene aminoácidos neutros.

En una realización de la presente invención, una formulación líquida para conjugados de EPO de acción prolongada que comprende una solución tampón de fosfato de sodio a una concentración de 10 mM (pH 6,5), manitol a una concentración del 5 al 10 % (p/v), cloruro de sodio a una concentración de 100 a 200 mM y polisorbato 80 a una concentración del 0,001 al 0,05 % (p/v) se comparó con la formulación de EPO conocida Recormon, Roche, para la estabilidad de almacenamiento de la EPO. Se encontró que la EPO es más estable en la formulación líquida de la presente invención que en la disponible en el mercado (ver Tablas 6 y 14).

Además, la formulación líquida para EPO de acuerdo con la presente invención se comparó con otras formulaciones, como Aranesp, un agente terapéutico para la anemia fabricado por Amgen, Enbrel (TNFR-Fc), un agente terapéutico para la artritis reumatoide fabricado por Amgen, y PBS solo, para la estabilidad de almacenamiento de la EPO. Como resultado, la formulación líquida para conjugados de EPO de acción prolongada de acuerdo con la presente invención exhibió una estabilidad más alta que cualquier otra formulación líquida (ver Tabla 17).

En otra realización, la formulación líquida para los conjugados de EPO de acción prolongada de acuerdo con la presente invención se analizó para determinar la estabilidad a largo plazo y se encontró que mantiene los conjugados de EPO de acción prolongada de manera estable durante 12 meses y garantizó al menos el 92,5 % de la actividad incluso después de 6 meses de almacenamiento bajo condiciones aceleradas (ver Tablas 19 a 21).

A partir de los datos, se entiende que la formulación líquida que comprende tampón y manitol a una concentración del 1 al 20 % (p/v) puede almacenar el conjugado de EPO de acción prolongada en forma estable durante 12 meses o más, incluso en ausencia de aminoácidos neutros.

### **Efectos ventajosos**

Al estar libre de albúmina sérica humana y otros factores dañinos potenciales para el cuerpo, la formulación líquida para los conjugados de eritropoyetina de acción prolongada de acuerdo con la presente invención está libre de preocupaciones sobre infecciones virales y garantiza una excelente estabilidad de almacenamiento para los conjugados de EPO de acción prolongada en los que la EPO y el fragmento Fc de inmunoglobulina están unidos y que tienen un mayor peso molecular y una duración de acción más prolongada que las formas naturales de EPO. Incluso cuando no contiene aminoácidos neutros, la formulación líquida de la presente invención puede proporcionar una excelente estabilidad de almacenamiento para la EPO, por lo que es económicamente más beneficiosa que otros estabilizantes y agentes liofilizantes.

**Descripción de los dibujos**

La FIG. 1 es un gráfico que muestra la estabilidad de la EPO en diferentes formulaciones líquidas para el conjugado de EPO de acción prolongada y en la formulación de EPO disponible en el mercado, Recormon, cuando se analizan mediante cromatografía de fase inversa todas las semanas durante el almacenamiento a 40 °C durante cuatro semanas.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra la estabilidad del conjugado de EPO de acción prolongada en una formulación líquida que comprende tampón fosfato a pH 6,5, cloruro de sodio, manitol y polisorbato 80 cuando se analizó mediante cromatografía de fase inversa y cromatografía de exclusión por tamaños cada dos meses durante el almacenamiento a 4 °C durante 12 meses.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra la estabilidad del conjugado de EPO de acción prolongada en una formulación líquida que comprende tampón fosfato a pH 6,5, cloruro de sodio, manitol y polisorbato 80 cuando se analizó mediante un ensayo *in vitro* cada dos meses durante el almacenamiento a 4 °C durante 12 meses.

**Modo de invención**

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención a través de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero que no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

**Ejemplo 1: Construcción de conjugado de EPO de acción prolongada****<1-1> Preparación del fragmento Fc de inmunoglobulina utilizando inmunoglobulina**

El fragmento Fc de inmunoglobulina útil en la presente invención era un fragmento Fc de IgG4 aglicosilada humana que podía expresarse a partir del transformante de *E. coli* como se describe en la patente coreana n.º 725314.

**<1-2> Preparación de eritropoyetina humana recombinante**

La EPO humana utilizada en este ejemplo se obtuvo como se describe en la patente coreana n.º 880509. Para esto, se cultivó una línea celular animal transformada con un vector capaz de mejorar enormemente la eficacia de la amplificación del gen al debilitar artificialmente un promotor del gen de la dihidrofolato reductasa, que es una secuencia de control transcripcional del gen, para expresar proteínas de la EPO humana. Solo se purificaron para su uso las proteínas altamente glicosiladas.

**<1-3> Preparación del conjugado de EPO de acción prolongada utilizando un fragmento Fc de inmunoglobulina**

El conjugado de EPO de acción prolongada en este ejemplo era una construcción en la que una eritropoyetina humana y un fragmento Fc de inmunoglobulina están unidos covalentemente por un polímero no peptídico. Se obtuvo como se describe en la patente coreana n.º 725315 y 775343.

**Ejemplo 2: Ensayo de conjugados de EPO de acción prolongada para determinar la estabilidad en función de diversos estabilizantes**

En presencia de tampón fosfato, se analizaron diversos agentes estabilizantes, incluidos azúcares, alcoholes de azúcar, alcoholes polihídricos y aminoácidos, para determinar su capacidad para estabilizar el conjugado de EPO de acción prolongada.

Para el ensayo, se utilizó tampón de fosfato de sodio como tampón fosfato, manitol o sorbitol como alcohol de azúcar, histidina o metionina como alcohol de azúcar, maltosa como azúcar y PEG 400 como alcohol polihídrico.

Después del almacenamiento a 40 °C durante una semana en las composiciones enumeradas en la Tabla 1, se realizó una cromatografía de fase inversa para realizar el análisis. Los resultados se resumen en la Tabla 1, a continuación. La tasa de retención del conjugado de EPO de acción prolongada en comparación con el valor inicial del mismo se expresó como RPC (%) (% de área/% de área inicial).

[Tabla 1]

N.º	EPO	Tampón	Agente estabilizante	RPC (%)
1	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	1 % de manitol	95,2
2	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	Histidina 1 mM	86,2
3	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	Metionina 1 mM	76,1
4	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	10 % de maltosa	93,5
5	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	1 % de PEG 400	92,8
6	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	1 % de sorbitol	92,7

Como se desprende de los datos de la Tabla 1, el uso de manitol como agente estabilizante mantuvo el conjugado de EPO de acción prolongada el más estable.

**Ejemplo 3: Ensayo de conjugados de EPO de acción prolongada para determinar la estabilidad en función de las sales**

5 En presencia de tampón fosfato, se analizaron diversas sales para determinar su capacidad para estabilizar el conjugado de EPO de acción prolongada, como sigue. Las sales como las sales alcalinas y las sales inorgánicas no solo sirven como agentes tamponantes del pH para dotar al conjugado de acción prolongada con una estabilidad adicional del pH, sino como agentes isotónicos para mantener las presiones osmóticas adecuadas.

10 Después de almacenar a 40 °C durante una semana las composiciones enumeradas en la Tabla 2, se realizó una cromatografía de fase inversa para su análisis. Para el ensayo, se utilizó tampón de fosfato de sodio (pH 6,5) como tampón, mientras que como sales se utilizaron cloruro de cobre (II), sulfato de sodio, citrato de sodio y carbonato de sodio. Los resultados se resumen en la Tabla 2, a continuación. La tasa de retención del conjugado de EPO de acción prolongada en comparación con el valor inicial del mismo se expresó como RP-HPLC (%).

[Tabla 2]

N.º	EPO	Tampón	Sal	RP-HPLC (%)
1	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	-	94,6
2	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	CuCl <sub>2</sub> 30 mM	81,6
3	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 40 mM	98,1
4	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	NaCl 200 mM	97,0
5	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	Citrato de sodio 10 mM	97,5
6	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10 mM	83,2
7	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20 mM/NaCl 100 mM	97,7

15 Como se desprende de los datos de la Tabla 2, la estabilidad del conjugado de EPO de acción prolongada aumentó cuando se utilizó sulfato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio o una combinación de sulfato de sodio y cloruro de sodio en presencia de tampón fosfato, en comparación con el control al que no se le ha añadido ninguno. En contraste, la estabilidad del conjugado de EPO de acción prolongada disminuyó en presencia de cloruro de cobre (II), en comparación con el control.

A partir de los datos, se entiende que el conjugado de EPO de acción prolongada de la presente invención se estabiliza en diferentes grados dependiendo de los tipos de sales utilizadas y muestra una mayor estabilidad con algunas sales.

25 **Ejemplo 4: Ensayo de conjugados de EPO de acción prolongada para determinar la estabilidad en función de un tensioactivo no iónico**

En presencia de tampón fosfato, se analizaron diversos tensioactivos no iónicos para determinar su capacidad para estabilizar el conjugado de EPO de acción prolongada, como sigue.

30 Para el ensayo, se utilizó polisorbato 80 como un tampón fosfato no iónico, y se emplearon en la combinación adecuada otros agentes que mostraron estabilidad para el conjugado de EPO de acción prolongada, incluidas sales, alcoholes de azúcar y azúcares.

35 Por simplicidad, el cloruro de sodio se seleccionó entre las sales verificadas, que incluyen cloruro de sodio, sulfato de sodio y citrato de sodio. Además, se usó el manitol probado en el Ejemplo 1 como garantía de la mayor estabilidad. Bajo las mismas condiciones en que la EPO se estableció que tenía 200 µg/ml en tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 6,5), el conjugado de EPO de acción prolongada de la presente invención se almacenó a 40 °C durante una semana en las composiciones enumeradas en la Tabla 3, seguido de análisis por cromatografía de fase inversa. Los resultados se resumen en la Tabla 3, a continuación. La tasa de retención del conjugado de EPO de acción prolongada en comparación con el valor inicial del mismo se expresó como RP-HPLC (%).

[Tabla 3]

N.º	Tensioactivo	Sal	Agente estabilizante	RP-HPLC (%)
1	-	NaCl 100 mM	10 % de manitol	96,5
2	0,005 % de polisorbato 80	NaCl 100 mM	10 % de manitol	97,8

Bajo las condiciones del tampón fosfato, como se ve en la Tabla 3, la EPO fluctuó un poco en estabilidad independientemente de la presencia del tensioactivo no iónico, lo que indica que el tensioactivo no iónico tiene efectos significativos en la estabilidad de la EPO durante un periodo tan corto como una semana.

5 Además, se realizó un examen del efecto de la concentración de tensioactivo no iónico en la estabilidad del conjugado EPO de acción prolongada. En las mismas condiciones en que se estableció que la EPO tenía 200 µg/ml en tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 6,5), el conjugado de EPO de acción prolongada de la presente invención se almacenó a 40 °C durante dos semanas en las composiciones enumeradas en la Tabla 4, seguido de un análisis por cromatografía de fase inversa. Los resultados se resumen en la Tabla 4, a continuación. La tasa de retención del conjugado de EPO de acción prolongada en comparación con el valor inicial del mismo se expresó como RP-HPLC (%)

[Tabla 4]

N.º	Tensioactivo	Sal	Agente estabilizante	1S (%)	2S (%)
1	0,1 % de polisorbato 80	NaCl 150 mM	5 % de manitol	95,9	91,8
2	0,01 % de polisorbato 80	NaCl 150 mM	5 % de manitol	98,4	93,7

15 Durante las dos semanas de almacenamiento, como se muestra en la Tabla 4, se encontró que el conjugado de EPO de acción prolongada es más estable en una formulación líquida que contiene el 5 % de manitol y cloruro de sodio 150 mM en tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 6,5) cuando se complementó con un 0,01 % de polisorbato 80 que con un 0,1 % de polisorbato 80.

#### Ejemplo 5: Comparación de formulaciones líquidas para conjugados de EPO de acción prolongada (I)

20 Con respecto a la estabilidad de almacenamiento, la formulación líquida de EPO disponible en el mercado Recormon (Roche) se comparó con la formulación líquida para el conjugado de EPO de acción prolongada de la presente invención. La composición de Recormon, aunque está por demostrar, incluye fosfato de sodio como tampón, polisorbato 20 como tensioactivo, cloruro de sodio como sal y urea, CaCl, glicina, leucina, isoleucina, treonina, ácido glutámico y fenilalanina como agentes estabilizantes.

25 Para las formulaciones líquidas de conjugados de EPO de acción prolongada de la presente invención, se utilizó polisorbato 80 como agente tensioactivo en diversas concentraciones del 0,1 al 0,005 %, cloruro de sodio como sal a concentraciones de 150 y 200 mM, y manitol o urea como agente estabilizante a diversas concentraciones del 1 al 10 % (p/v). El conjugado de EPO de acción prolongada de la presente invención se almacenó a 40 °C durante dos semanas en las composiciones enumeradas en la Tabla 5, seguido por análisis por cromatografía de fase inversa y cromatografía de exclusión por tamaños (SE-HPLC). Los resultados se resumen en la Tabla 6, a continuación. La tasa de retención del conjugado de EPO de acción prolongada en comparación con el valor inicial del mismo se expresó como RP-HPLC (%) y SE-HPLC (%).

[Tabla 5]

N.º	Nombre	Conc.	Tampón	Tensioactivo	Agente estabilizante	Sal
1	Recormon	138 µg/ml	Fosfato de sodio	P.S 20	Urea, CaCl, Gly, Leu, Ile, Thr, Glu, Phe	NaCl
2	Conjugado de EPO de acción prolongada	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM a pH 6,5	0,005 % de P.S80	10 % de manitol	NaCl 200 mM
3	Conjugado de EPO de acción prolongada	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM a pH 6,5	0,005 % de P.S80	1 % de manitol	NaCl 150 mM
4	Conjugado de EPO de acción prolongada	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM a pH 6,5	0,01 % de P.S80	5 % de manitol	NaCl 150 mM
5	Conjugado de EPO de acción prolongada	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM a pH 6,5	0,1 % de P.S80	5 % de manitol	NaCl 150 mM
6	Conjugado de EPO de acción prolongada	200 µg/ml	Citrato de sodio 10 mM a pH 6,5	0,01 % de P.S80	5 % de manitol	NaCl 150 mM
7	Conjugado de EPO de acción prolongada	200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM a pH 6,5	0,01 % de P.S80	Urea 25 mM, 5 % de manitol	NaCl 150 mM

[Tabla 6]

	RP-HPLC (%)			SE-HPLC (%)		
	Inicio	Semana 1	Semana 2	Inicio	Semana 1	Semana 2
1	100	95,7	92,7	100	99,5	98,3
2	100	98,7		100	99,3	
3	100	98,3	93,3	100	99,8	99,0
4	100	98,4	93,7	100	100,7	100,0
5	100	95,9	91,8	100	97,4 (relaves)	91,5
6	100	98,8	93,9	100	100,7	100,1
7	100	98,6	79,0	100	100,4	99,5

5 Durante las dos semanas de almacenamiento, como se ve en la Tabla 6, todas las formulaciones líquidas de la presente invención garantizaban una mayor estabilidad de la EPO que Recormon, excepto la formulación n.º 5 que tiene un 0,1 % de polisorbato 80 como tensioactivo y la formulación n.º 7 que tiene urea como agente estabilizante.

**Ejemplo 6: Búsqueda de agentes estabilizantes capaces de dotar estabilidad de almacenamiento al conjugado de EPO de acción prolongada**

10 Para buscar agentes estabilizantes que puedan estabilizar los conjugados de EPO de acción prolongada durante el almacenamiento a largo plazo, se prepararon formulaciones líquidas para el conjugado de EPO de acción prolongada con las composiciones de la Tabla 7, a continuación. A este respecto, la glicina y la metionina se agregaron individualmente a una composición de tensioactivo-cloruro de sodio-maltosa para examinar el efecto de los aminoácidos en la estabilidad de almacenamiento a largo plazo. En las formulaciones líquidas, la concentración de EPO se fijó en 200 µg/ml en tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 6,5).

15 Mientras se almacenaban a 40 °C durante cuatro semanas, las formulaciones líquidas para el conjugado de EPO de acción prolongada se analizaron cada semana utilizando cromatografía de fase inversa. Los resultados se resumen en la Tabla 8, a continuación. La tasa de retención del conjugado de EPO de acción prolongada en comparación con el valor inicial del mismo se expresó como RP-HPLC (%).

[Tabla 7]

N.º	Tensioactivo	sal	Agente estabilizante
1	0,005 % de polisorbato 80	NaCl 200 mM	10 % de maltosa
2	0,005 % de polisorbato 80	NaCl 200 mM	10 % de maltosa + 1 % de glicina
3	0,005 % de polisorbato 80	NaCl 200 mM	10 % de maltosa + metionina 1 mM

20

[Tabla 8]

N.º	RP-HPLC (%)			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
1	99,12	94,26	94,27	70,66
2	97,81	96,60	95,29	92,43
3	70,14	57,46	28,34	15,40

25

Durante el período de almacenamiento de cuatro semanas, como se muestra en la Tabla 8, se encontró que el conjugado de EPO de acción prolongada es el más estable en una formulación líquida que comprende cloruro de sodio en combinación con maltosa y glicina como agentes estabilizantes. Después de dos semanas de almacenamiento, se detectó una estabilidad de almacenamiento similar entre las formulaciones líquidas en las que se utilizó un 10 % de maltosa sola y en combinación con un 1 % de glicina, respectivamente. Sin embargo, el uso de un 10 % de maltosa sola disminuyó significativamente la estabilidad después del almacenamiento durante cuatro semanas. En contraste, se encontró que el uso de maltosa al 10 % en combinación con glicina al 1 % mantiene una alta estabilidad después del almacenamiento durante cuatro semanas.

30

Refiriéndose a la comparación entre las formulaciones líquidas número 2 y 3, la metionina redujo significativamente la estabilidad del conjugado de EPO de acción prolongada, lo que indica que los aminoácidos neutros,

especialmente la glicina, pueden brindar una gran contribución a la estabilidad al conjugado de EPO de acción prolongada en almacenamiento a largo plazo.

**Ejemplo 7: Ensayo de manitol y maltosa para la estabilidad de almacenamiento a largo plazo del conjugado de EPO de acción prolongada**

5 Se prepararon tres formulaciones líquidas como se indica en la Tabla 9, a continuación: una formulación líquida que comprende maltosa-glicina que mostró la mayor estabilidad del conjugado de EPO de acción prolongada en el Ejemplo 6; la misma formulación líquida, con la excepción de que se usó manitol en lugar de maltosa; y una formulación líquida que comprende manitol solo. Se analizaron para determinar la estabilidad de almacenamiento a largo plazo. En las formulaciones líquidas, la concentración de EPO se fijó en 200 µg/ml en tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 6,5).

15 Mientras se almacenaban a 40 °C durante cuatro semanas, las formulaciones líquidas para el conjugado de EPO de acción prolongada se analizaron cada semana utilizando cromatografía de fase inversa. Los resultados se resumen en la Tabla 10, a continuación. La tasa de retención del conjugado de EPO de acción prolongada en comparación con el valor inicial del mismo se expresó como RP-HPLC (%). Además, los datos de la Tabla 10 están representados en la FIG. 1 donde se extrapolan los valores de la formulación de EPO Recormon disponible en el mercado.

[Tabla 9]

	Tensioactivo	sal	Agente estabilizante
1	0,005 % de polisorbato 80	NaCl 200 mM	10 % de maltosa, 1 % de glicina
2	0,005 % de polisorbato 80	NaCl 200 mM	10 % de manitol, 1 % de glicina
3	0,005 % de polisorbato 80	NaCl 200 mM	10 % de manitol

[Tabla 10]

	RP-HPLC (%)				
	Inicio	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 5
1	100	96,6	94,7	93,9	92,0
2	100	97,8	95,5	95,8	93,5
3	100	97,8	96,0	95,1	93,4

20 Durante el período de almacenamiento de cinco semanas, como se muestra en la Tabla 10, se encontró que el conjugado EPO de acción prolongada es más estable en la formulación líquida que comprende manitol-glicina que maltosa-glicina como agentes estabilizantes. Se detectó una estabilidad de almacenamiento comparable en la formulación líquida que comprende manitol solo.

25 Estos resultados contrastan con el hecho de que la formulación líquida que comprende maltosa sola disminuyó significativamente en la estabilidad de almacenamiento en comparación con la formulación líquida que comprende maltosa y glicina, lo que indica que el manitol puede garantizar estabilidad de almacenamiento a largo plazo al conjugado de EPO de acción prolongada, incluso sin la ayuda de aminoácidos neutros. Además, se encontró que el uso de manitol en una concentración tan alta como del 5 al 15 % (p/v) permite que el conjugado de EPO se almacene y retenga una alta estabilidad incluso en ausencia de aminoácidos neutros.

30 **Ejemplo 8: Ensayo de tampón para la estabilidad de almacenamiento a largo plazo del conjugado de EPO de acción prolongada**

Se analizaron los tampones para determinar su capacidad para estabilizar el conjugado de EPO de acción prolongada. Además, se hizo un examen de la relación entre la estabilidad de los conjugados de EPO de acción prolongada y las dosis de sales y alcoholes de azúcar, como sigue.

35 Primero, se investigaron los efectos de los tampones sobre la estabilidad de los conjugados de EPO de acción prolongada utilizando formulaciones líquidas formuladas con polisorbato al 0,01 %, cloruro de sodio 150 mM y tampón de fosfato o citrato como se muestra en la Tabla 11 (N.º 1 y 2). Las formulaciones líquidas contenían una alta concentración (5 %) de manitol como agente estabilizante, pero ningún aminoácido, y el conjugado de EPO de acción prolongada se añadió a una concentración de 200 µg/ml. Las formulaciones se almacenaron a 40 °C durante cuatro semanas, tiempo durante el cual las formulaciones líquidas para el conjugado de EPO de acción prolongada se analizaron la Semana 1 y la Semana 4 utilizando cromatografía de fase inversa. Los resultados se resumen en la Tabla 12 (N.º 1 y 2), a continuación. La tasa de retención del conjugado de EPO de acción prolongada en

comparación con el valor inicial del mismo se expresó como RP-HPLC (%).

5 La misma formulación líquida que comprende manitol que en el Ejemplo 7, la misma formulación líquida pero que comprende tampón citrato en lugar de tampón fosfato, y la misma formulación líquida pero que comprende la mitad de las cantidades de sal y alcohol de azúcar se examinaron para determinar su efecto sobre la estabilidad del conjugado de EPO de acción prolongada.

10 En las formulaciones líquidas, la concentración del conjugado de EPO de acción prolongada se fijó en 200 µg/ml y los agentes estabilizantes se usaron como se muestra en la Tabla 11, a continuación. Las formulaciones líquidas para el conjugado de EPO de acción prolongada se almacenaron a 40 °C y se analizaron la Semana 1 y la Semana 4 utilizando cromatografía de fase inversa. Los resultados se resumen en la Tabla 12, a continuación. La tasa de retención del conjugado de EPO de acción prolongada en comparación con el valor inicial del mismo se expresó como RP-HPLC (%).

[Tabla 11]

N.º	Tampón	Tensioactivo	Sal	Agente estabilizante
1	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	0,01 % de Polisorbato 80	NaCl 150 mM	5 % de manitol
2	Citrato de sodio 10 mM, pH 6,5	0,01 % de Polisorbato 80	NaCl 150 mM	5 % de manitol
3	Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5	0,005 % de Polisorbato 80	NaCl 200 mM	10 % de manitol
4	Citrato de sodio 10 mM, pH 6,0	0,01 % de Polisorbato 80	NaCl 100 mM	5 % de manitol

[Tabla 12]

	RP-HPLC (%)		
	Inicio	Semana 1	Semana 4
1	100	98,4	93,7
2	100	98,8	93,9
3	100	98,7	94,3
4	100	99,5	95,0

15 Como se desprende de los datos de la Tabla 12, las formulaciones líquidas, si contenían manitol en ellas, garantizaban la estabilidad de almacenamiento del conjugado de acción prolongada a los niveles deseados, independientemente de los tipos de tampones utilizados en ellas. Estos resultados indican que se pueden usar tampones típicos distintos del tampón fosfato para preparar formulaciones líquidas en las que el conjugado de EPO de acción prolongada se puede almacenar de forma estable durante un largo período de tiempo.

**Ejemplo 9: Comparación de la estabilidad de almacenamiento de conjugados de EPO de acción prolongada entre formulaciones líquidas (II)**

25 Con respecto a la estabilidad de almacenamiento, la formulación líquida que se preparó con tampón fosfato (pH 6,5), cloruro de sodio, manitol y polisorbato 80, todos probados para la capacidad de estabilización en los Ejemplos 2 a 8, se comparó con la formulación líquida de EPO disponible en el mercado Recormon Roche. Las composiciones de la formulación líquida de la presente invención y Recormon se muestran en la Tabla 13, a continuación. Mientras se almacenaban a 40 °C durante cuatro semanas, las formulaciones líquidas para el conjugado de EPO de acción prolongada se analizaron la Semana 2 y la Semana 4 utilizando cromatografía de fase inversa y cromatografía de exclusión por tamaños. Los resultados se resumen en la Tabla 14, a continuación. La tasa de retención del conjugado de EPO de acción prolongada en comparación con el valor inicial del mismo se expresó como RP-HPLC (%) y SE-HPLC (%).

[Tabla 13]

Nombre	Conc.	Tampón	Tensioactivo	sal	Agente estabilizante
Recormon	EPO 138 µg/ml	Fosfato de sodio	Polisorbato 20	NaCl	Urea, CaCl, Gly, Leu, Ile, Thr, Glu, Phe
EPO de acción prolongada	EPO 200 µg/ml	Fosfato de sodio 10 mM (pH 6,5)	0,005 % de Polisorbato 80	NaCl 200 mM	10 % de manitol

[Tabla 14]

Nombre	RP-HPLC (%)			SE-HPLC (%)		
	Inicio	Semana 2	Semana 4	Inicio	Semana 2	Semana 4
Recormon	100	96,1	91,6	100	98,4	93,1
EPO de acción prolongada	100	95,5	93,3	100	98,1	96,4

5 Como se desprende de los datos de la Tabla 14, la formulación líquida que contiene una alta concentración de manitol como agente estabilizante garantizó una mayor estabilidad de almacenamiento de EPO que Recormon que contenía varios tipos de aminoácidos neutros. A partir de estos resultados, se entiende que las formulaciones líquidas de la presente invención son capaces de garantizar una excelente estabilidad de almacenamiento específicamente para el conjugado de EPO de acción prolongada.

#### Ejemplo 10: Comparación de la estabilidad de almacenamiento entre varias formulaciones líquidas

10 Con respecto a la estabilidad de almacenamiento, se comparó una formulación líquida que se preparó con tampón fosfato (pH 6,5), cloruro de sodio, manitol y polisorbato 80, todos probados para la capacidad de estabilización mostrada en los Ejemplos 2 a 8, con las formulaciones líquidas que se prepararon aplicando las composiciones de diversas formulaciones disponibles en el mercado al conjugado de EPO de acción prolongada.

15 Las formulaciones líquidas utilizadas en este ejemplo se resumen en la Tabla 15, a continuación. En la Tabla 15, el N.º 1 es Aranesp, fabricado por Amgen, que se usa actualmente como agente terapéutico para la anemia; el N.º 2 es una formulación líquida que se preparó con una composición de estabilización que comprende tampón fosfato (pH 6,5), cloruro de sodio, manitol y polisorbato 80; el N.º 3 es la misma formulación líquida que en Aranesp, con la excepción de que se utilizó el conjugado de EPO de acción prolongada en lugar del fármaco; el N.º 4 es la misma formulación líquida que en Enbrel (TNFR-Fc), un agente terapéutico para la artritis reumatoide fabricado por Amgen, con la excepción de que se usó el conjugado de EPO de acción prolongada en lugar del fármaco; y el N.º 5 es una formulación líquida que contiene PBS solo.

20 Mientras se almacenaban a 40 °C durante tres semanas, las formulaciones líquidas para el conjugado de EPO de acción prolongada se analizaron cada semana utilizando cromatografía de fase inversa y cromatografía de exclusión por tamaños. Los resultados se resumen en la Tabla 17, a continuación. La tasa de retención del conjugado de EPO de acción prolongada en comparación con el valor inicial del mismo se expresó como RP-HPLC (%) y SE-HPLC (%).

25

[Tabla 15]

	Proteína	Conc.	Tampón	Tensioactivo	Agente estabilizante	Sal
1	Aranesp	200 µg/ml	fosfato de sodio 20 mM (pH 6,2)	0,005 % de PS 80	--	NaCl 140 mM
2	Conjugado de EPO de acción prolongada	0,526 mg/ml	Fosfato de sodio 10 mM (pH 6,5)	0,005 % de PS 80	10 % de manitol	NaCl 200 mM
3	Conjugado de EPO de acción prolongada	0,526 mg/ml	Fosfato de sodio 20 mM (pH 6,2)	0,005 % de PS 80	--	NaCl 140 mM
4	Conjugado de EPO de acción prolongada	0,526 mg/ml	Fosfato de sodio 25 mM (pH 6,3)	--	1 % de sacarosa 25 mM clorhidrato de L-arginina	NaCl 100 mM
5	Conjugado de EPO de acción prolongada	0,526 mg/ml	PBS			

[Tabla 16]

Número de lote	HM10760A B10098 LGL211 (lote del Centro de Investigación)
Temperatura	40 °C
Condición de almacenamiento	Jeringa de vidrio, 500 µl
Método de análisis	SEC, RPC
Frecuencia de la muestra	Inicio, 1S, 2S, 3S

[Tabla 17]

			Inicio	1S	2S	3S
1	Aranesp	SEC (% de área)	99,7	99,4	98,6	Agregado
		SEC (% de área /% de área inicial) %	100,0	99,7	98,9	
		SEC (Área/Área Inicial) %	100,0	100,1	99,8	
		RPC (% de área)	94,0	92,5	91,6	
		RPC (% de área /% de área inicial) %	100,0	98,4	97,4	
		RPC (Área/Área Inicial) %	100,0	99,9	98,7	
2	Conjugado de EPO de acción prolongada	SEC (% de área)	98,8	97,8	96,6	91,6
		SEC (% de área /% de área inicial) %	100,0	99,0	97,8	92,7
		SEC (Área/Área Inicial) %	100,0	97,3	92,1	88,9
		RPC (% de área)	96,0	92,6	87,9	83,9
		RPC (% de área /% de área inicial) %	100,0	96,5	91,6	87,4
		RPC (Área/Área Inicial) %	100,0	94,4	89,9	85,4
3	Conjugado de EPO de acción prolongada	SEC (% de área)	98,8	98,0	96,7	Agregado
		SEC (% de área /% de área inicial) %	100,0	99,2	97,9	
		SEC (Área/Área Inicial) %	100,0	96,3	91,2	
		RPC (% de área)	95,0	92,3	87,5	
		RPC (% de área /% de área inicial) %	100,0	97,2	92,1	
		RPC (Área/Área Inicial) %	100,0	95,3	91,4	
4	Conjugado de EPO de acción prolongada	SEC (% de área)	98,9	96,5	Agregado	Agregado
		SEC (% de área /% de área inicial) %	100,0	97,6		
		SEC (Área/Área Inicial) %	100,0	94,2		
		RPC (% de área)	94,4	90,8		
		RPC (% de área /% de área inicial) %	100,0	96,2		
		RPC (Área/Área Inicial) %	100,0	93,3		
5	Conjugado de EPO de acción prolongada	SEC (% de área)	98,8	97,4	Agregado	Agregado
		SEC (% de área /% de área inicial) %	100,0	98,6		
		SEC (Área/Área Inicial) %	100,0	96,5		
		RPC (% de área)	94,6	91,6		
		RPC (% de área /% de área inicial) %	100,0	96,8		
		RPC (Área/Área Inicial) %	100,0	95,5		

Como es evidente a partir de los datos de la Tabla 17, en todas las formulaciones líquidas, excepto la formulación líquida que comprende tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 6,5), polisorbato 80 al 0,005 %, manitol al 10 % y cloruro de sodio 200 nM de acuerdo con la presente invención, se observó una agregación durante el almacenamiento a lo largo de las tres semanas. En consecuencia, la formulación líquida que comprende tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 6,5), 0,005 % de polisorbato 80, 10 % de manitol y cloruro de sodio 200 nM según la

presente invención es el agente más prometedor para almacenar el conjugado de EPO de acción prolongada de manera estable durante un largo periodo de tiempo.

**Ejemplo 11: Ensayo de formulaciones líquidas para el conjugado de EPO de acción prolongada para la estabilidad de almacenamiento a largo plazo y la estabilidad acelerada**

5 Para examinar la estabilidad de almacenamiento a largo plazo y su estabilidad acelerada, la formulación líquida para el conjugado de EPO de acción prolongada, preparada a partir de un estabilizante que contiene tampón de fosfato (pH 6,5), cloruro de sodio, manitol y polisorbato 80, que se demostró que garantiza la máxima estabilidad de almacenamiento, se almacenó a 4 °C durante 12 meses durante los cuales se analizó la estabilidad del conjugado de EPO de acción prolongada. Las condiciones detalladas para el almacenamiento se resumen en la Tabla 18, a  
10 continuación. Los resultados del análisis se dan en la Tabla 19 y la FIG. 2. En la Tabla 19, la tasa de retención del conjugado de EPO de acción prolongada en comparación con su valor inicial se expresó como RP-HPLC (%) y SE-HPLC (%).

Además, la formulación líquida para el conjugado de EPO de acción prolongada se analizó *in vitro* para determinar la estabilidad de almacenamiento durante el período de almacenamiento a 4 °C durante 12 meses (FIG. 3).

15 El conjugado de EPO de acción prolongada utilizado en este Ejemplo se midió *in vitro* para su titulación en una línea celular TF-1 (célula de eritroleucemia, ATCC CRL 2003). Después de descongelarse de un tanque de almacenamiento de nitrógeno, las células TF-1 se cultivaron hasta un grado predeterminado y se contaron. Una mezcla de BRP-EPO y el conjugado de EPO de acción prolongada en una proporción predeterminada se sembraron en una cantidad de 50 µl/pocillo en placas de 96 pocillos. Las células se diluyeron a una concentración de 40.000  
20 células/ml en un medio de ensayo que luego se sembró en una cantidad de 50 µl/pocillo en las placas de 96 pocillos. Después de la incubación a 37 °C durante 72 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub>, se añadió 15 µL del reactivo CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega, G358B) a cada pocillo de las placas de 96 pocillos. Se incubaron de nuevo a 37 °C durante 4 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub>. El reactivo de tinción se eliminó mediante un suave pipeteado, seguido de la medición de la absorbancia a 490 nm para calcular la CE50. La actividad específica se  
25 obtuvo a partir de los valores de CE50 calculados.

[Tabla 18]

Número de lote	HM10760A B10098 LGL071
Concentración	0,352 mg/ml de proteína
Temperatura	4 °C
Condición de almacenamiento	Jeringa de vidrio 500 ml
Método de análisis	SEC, RPC
Formulación	Na-P 10 mM (pH 6,5)/0,005 % de Polisorbato 80/10 % de Manitol/NaCl 200 mM
Frecuencia de muestreo	Inicio, 1M, 3M, 6M, 9M, 12M,

[Tabla 19]

		Inicio	1M	3M	6M	9M	12M
Almacenamiento de conjugado de EPO de acción prolongada a 4 °C	SEC (% de área)	98,1	97,8	97,9	98,2	98,0	97,9
	SEC (% de área /% de área inicial) %	100,0	99,7	99,8	100,1	99,9	99,8
	SEC (Área/Área Inicial) %	100,0	97,5	89,7	91,8	92,2	92,6
	RPC (% de área)	97,1	97,1	97,1	97,1	97,1	97,0
	RPC (% de área /% de área inicial) %	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9
	RPC (Área/Área Inicial) %	100,0	100,4	98,3	99,2	99,3	99,7
	Actividad específica (U/mg)	5,97E+04	-	6,31E+04	5,90E+04	5,88E+04	
	Inicio VS (%)	100,0	-	105,8	98,8	98,5	

Como se muestra en la Tabla 19, se encontró que el conjugado de EPO de acción prolongada era muy estable durante 12 meses en la formulación líquida que comprende la composición estabilizante de la presente invención.

5 Además, como se ha mencionado anteriormente, la formulación líquida para el conjugado de EPO de acción prolongada, que comprende la misma composición estabilizante, se almacenó a 4 °C durante 12 meses y posteriormente a 25 °C durante 6 meses durante los cuales las muestras se analizaron para determinar la estabilidad de almacenamiento. Los resultados se resumen en las Tablas 20 y 21, a continuación. En las Tablas 20 y 21, la tasa de retención del conjugado de EPO de acción prolongada en comparación con su valor inicial se expresó como RP-HPLC (%), SE-HPLC (%), contenido de proteína (%) y actividad inerte biológica (%).

[Tabla 20]

Ensayo para la estabilidad de almacenamiento a largo plazo (almacenamiento a 4 °C)									
Plazo de almacenamiento	Propiedades	pH	Prueba de identificación		Prueba de pureza			Prueba de contenido de proteínas (%)	Actividad biológica inerte (%)
			HPLC	Western Blot	SDS-PAGE	RP-HPLC (%)	SE-HPLC (%)		
comienzo	Incoloro transparente	6,3	Convenido	Adecuado	Adecuado	100,0	100,0	100,0	100,0
3 meses	Incoloro transparente	6,5	Convenido	Adecuado	Adecuado	100,0	101,1	100,0	122,7
6 meses	Incoloro transparente	6,4	Convenido	Adecuado	Adecuado	99,5	101,0	98,3	121,2
9 meses	Incoloro transparente	6,4	Convenido	Adecuado	Adecuado	99,3	101,1	103,9	131,1
12 meses	Incoloro transparente	6,5	Convenido	Adecuado	Adecuado	99,1	100,1	99,2	124,4

10

Tabla 21

Acelerado	Ensayo de estabilidad (almacenamiento a 25 °C)									
	Plazo de almacenamiento	Propiedades	pH	Prueba de identificación		Prueba de pureza			Prueba de contenido de proteínas (%)	Actividad biológica inerte (%)
				HPLC	Western Blot	SDS-PAGE	RP-HPLC (%)	SE-HPLC (%)		
Inicio	Incoloro transparente	6,3	Convenido	Adecuado	Adecuado	Adecuado	100,0	100,0	100,0	100,0
2 meses	Incoloro transparente	N.D	Convenido	Adecuado	Adecuado	Adecuado	97,6	99,7	N.D	91,3
4 meses	Incoloro transparente	N.D	Convenido	Adecuado	Adecuado	Adecuado	96,2	99,7	N.D	106,4
6 meses	Incoloro transparente	6,5	Convenido	Adecuado	Adecuado	Adecuado	92,5	94,0	100,0	101,5

5 Como se desprende de los datos de las Tablas 20 y 21, el conjugado de EPO de acción prolongada se mantuvo muy estable durante 12 meses en la formulación líquida que comprende la composición estabilizante de acuerdo con la presente invención y se encontró que tenía el 92,5 % de la actividad inicial incluso después de haber estado almacenado durante 6 meses en la formulación líquida en condiciones aceleradas. Por lo tanto, la formulación líquida para el conjugado de EPO de acción prolongada de acuerdo con la presente invención exhibe una estabilidad de almacenamiento efectiva.

Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han descrito con fines ilustrativos, los expertos en la materia apreciarán que son posibles diversas modificaciones, adiciones y sustituciones, sin apartarse del alcance y espíritu de la invención como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

10 **Aplicabilidad industrial**

15 Al estar libre de albúmina sérica humana, la formulación líquida para garantizar la estabilidad de almacenamiento específicamente para los conjugados de eritropoyetina de acción prolongada de acuerdo con la presente invención está libre de preocupaciones sobre infecciones virales. Comprende una composición simple, que tiene una ventaja económica sobre otros estabilizantes o formulaciones de liofilización. Además, dado que contiene un conjugado de EPO de acción prolongada que tiene una duración de acción más prolongada que una forma natural y también mantiene alta la actividad de la proteína durante un largo período de tiempo, la formulación líquida se puede usar como un sistema farmacológico eficaz.

## REIVINDICACIONES

1. Una formulación líquida de un conjugado de eritropoyetina de acción prolongada (EPO), que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de eritropoyetina de acción prolongada en la cual la EPO está unida covalentemente a un fragmento Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico y un estabilizante libre de albúmina que comprende tampón y manitol, en el que el estabilizante libre de albúmina comprende manitol a una concentración del 5 al 20 % (p/v) y sin aminoácidos neutros.
2. La formulación líquida según la reivindicación 1, en la que el tampón se selecciona del grupo que consiste en tampones de citrato, fosfato, tartrato, carbonato, succinato, lactato y acetato.
3. La formulación líquida según la reivindicación 1, en la que el tampón varía en una concentración de 5 a 100 mM.
4. La formulación líquida según la reivindicación 1, en la que el tampón varía en pH de 4 a 8.
5. La formulación líquida según la reivindicación 1, en la que el estabilizante libre de albúmina comprende además un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en un agente isotónico, un alcohol polihídrico, un azúcar, un tensioactivo no iónico y una combinación de los mismos.
6. La formulación líquida según la reivindicación 5, en la que el agente isotónico es una sal seleccionada del grupo que consiste en cloruro de sodio, sulfato de sodio, citrato de sodio y una combinación de los mismos.
7. La formulación líquida según la reivindicación 5, en la que el agente isotónico varía en una concentración de 5 a 200 mM.
8. La formulación líquida según la reivindicación 5, en la que el tensioactivo no iónico es un tensioactivo no iónico basado en polisorbato o basado en poloxámero.
9. La formulación líquida según la reivindicación 8, 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.
10. La formulación líquida según la reivindicación 5, en la que el tensioactivo no iónico varía en una concentración de 0,001 a 0,05 % (p/v) en base al volumen total de la formulación líquida.
11. La formulación líquida según la reivindicación 5, en la que el azúcar se selecciona de un grupo que consiste en manosa, glucosa, fucosa, xilosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, dextrano y una combinación de los mismos.
12. La formulación líquida según la reivindicación 5, en la que el azúcar varía en una concentración del 1 al 20 % (p/v) en base al volumen total de la formulación líquida.
13. La formulación líquida según la reivindicación 6, en la que el alcohol polihídrico se selecciona del grupo que consiste en propilenglicol, polietilenglicol de bajo peso molecular, glicerol, polipropilenglicol de bajo peso molecular y una combinación de los mismos.
14. La formulación líquida según la reivindicación 6, en la que el alcohol polihídrico varía en una concentración del 1 al 15 % (p/v) en la formulación líquida.
15. La formulación líquida según la reivindicación 1, en la que el estabilizante libre de albúmina comprende un tampón de fosfato a una concentración de 5 a 100 mM, manitol a una concentración del 5 al 20 % (p/v), cloruro de sodio a una concentración de 5 a 200 mM, y polisorbato 80 a una concentración del 0,001 al 0,05 % (p/v).
16. La formulación líquida según la reivindicación 1, en la que la EPO es una proteína EPO mutante modificada a partir de la EPO de tipo silvestre mediante la sustitución, eliminación o inserción de un aminoácido o aminoácidos, o un análogo peptídico que tiene una actividad similar a la de la EPO de tipo silvestre.
17. La formulación líquida según la reivindicación 1, en la que la EPO varía en una concentración de 1 a 500 µg/ml.
18. La formulación líquida según 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 los mismos.
19. La formulación líquida según la reivindicación 18, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento híbrido compuesto por dominios de diferentes orígenes del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE e IgM.
20. La formulación líquida según la reivindicación 18, el fragmento Fc de inmunoglobulina está en forma de un dímero o un multímero de inmunoglobulinas de cadena única compuesto de dominios del mismo origen.
21. La formulación líquida según la reivindicación 18, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG4.

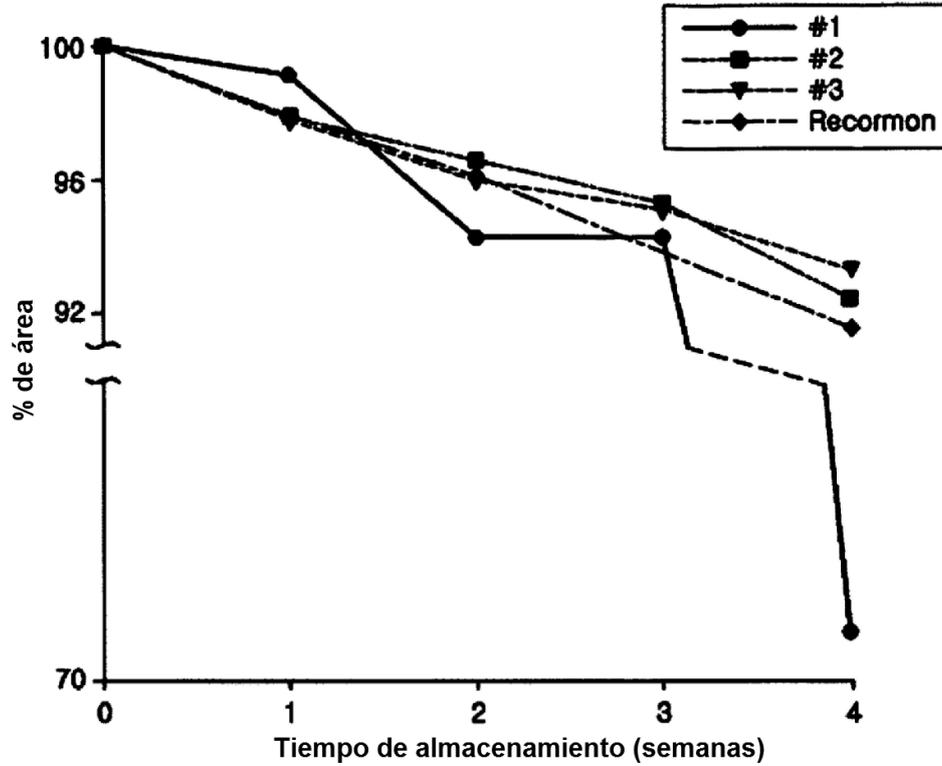
22. La formulación líquida según la reivindicación 21, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG4 aglicosilada humana.

5 23. La formulación líquida según 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 los mismos.

24. La formulación líquida según la reivindicación 23, en la que el polímero biodegradable se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, polivinil etiléter, PLA (ácido poliláctico) y PLGA (ácido poliláctico-glicólico).

10

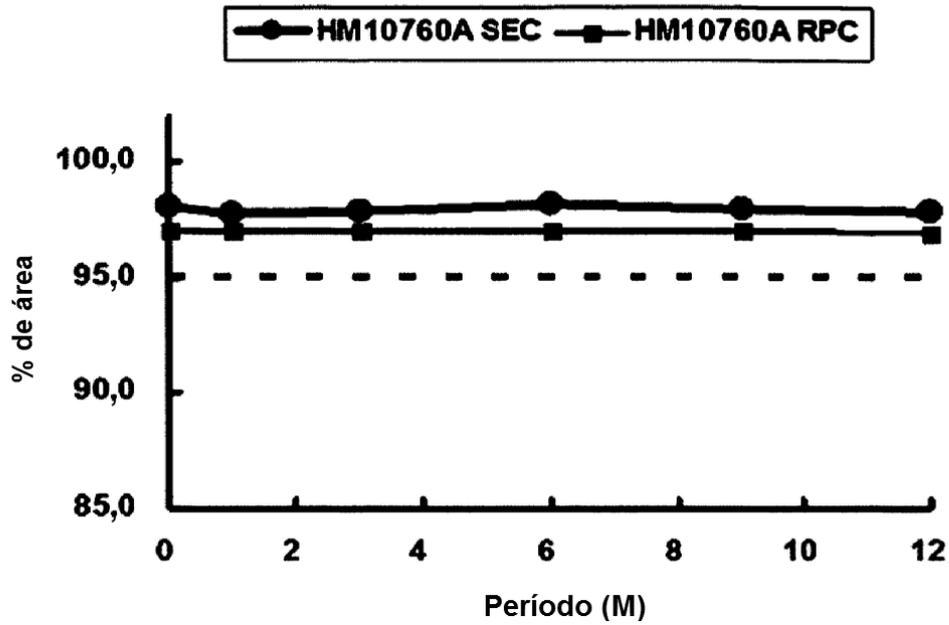
【 Figura 1 】



N.º	Sal	Estabilizante	Tensioactivo
#1	NaCl 200 mM	Maltosa al 10 %	Polisorbato 80 al 0,005 %
#2	NaCl 200 mM	Maltosa al 10 %, Glicina al 1 %	Polisorbato 80 al 0,005 %
#3	NaCl 200 mM	10 % Manitol	Polisorbato 80 al 0,005 %
Recormon			

【 Figura 2 】

### SEC & RPC



【 Figura 3 】

### Ensayo *in vitro*

