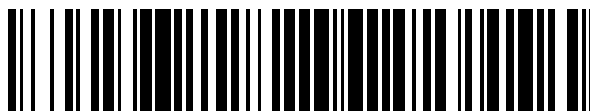


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 605**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/20 (2006.01)
A61P 27/04 (2006.01)
A61P 27/14 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2016** **PCT/EP2016/059398**
87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016** **WO16174082**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2016** **E 16722558 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019** **EP 3288536**

54 Título: **Composiciones que comprenden anakinra**

30 Prioridad:

28.04.2015 EP 15165421

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FLORIN-ROBERTSSON, EBBA;
FRANSSON, JONAS y
MOORE, BARRY D.

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 744 605 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden anakinra

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden anakinra, tampón y, opcionalmente, al menos un osmolito y, opcionalmente, excipientes adicionales. Además, la presente invención se refiere al uso de dichas composiciones para el tratamiento de trastornos oftálmicos.

Antecedentes de la invención

10 La familia de la interleuquina-1 es un grupo de proteínas que están involucradas en la regulación de respuestas inmunitarias e inflamatorias. Los miembros del grupo median un intervalo de enfermedades, como por ej., artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, diabetes, leucemia y psoriasis.

15 La anakinra es una forma recombinante de una proteína antagonista del receptor de interleuquina-1 (IL-1Ra) natural, que funciona como un inhibidor competitivo para la unión al receptor de IL-1. La IL-1Ra tiene una función de equilibrio con respecto a otras variantes proinflamatorias de la IL-1 (Clin. Therapeutics 2004, 26, 1960-1975). Una deficiencia de la IL-1Ra podría, de este modo, ser un factor de riesgo para un número de enfermedades autoinmunitarias. Los síntomas de esas enfermedades pueden ser solucionados mediante el tratamiento con anakinra.

20 Los componentes en una formulación del medicamento proteínico pueden incluir agentes tampones, agentes de tonicidad, antioxidantes, estabilizantes, tensioactivos, agentes de la densidad, agentes quelantes y conservantes. Kineret®, una formulación de anakinra a pH 6,5 adecuado para inyección, contiene citrato de sodio, cloruro de sodio, EDTA disódico, polisorbato 80 y agua. La selección del citrato de sodio como componente tampón para la anakinra en la formulación de Kineret® se basó en los estudios detallados que evalúan la estabilidad a corto y largo plazo de anakinra. Se evaluaron varios posibles componentes tampones, siendo uno el fosfato de sodio, y se identificó al citrato de sodio como el que proporciona la óptima estabilidad con respecto a la agregación de anakinra (WO 2005/097195). La agregación de anakinra fue una preocupación importante para la selección del componente tampón, de los estabilizantes y de la temperatura de almacenamiento. La concentración del citrato de sodio se minimizó tanto como fue posible tomando en cuenta su efecto irritante local al cabo de la inyección.

30 Anakinra también ha sido formulada sin citrato de sodio a fin de evitar los problemas que se informaron con respecto a la tolerancia local en el sitio de la inyección subcutánea (WO 2012/108828). Los componentes apropiados en una formulación del medicamento proteínico, y sus respectivos niveles, se determinan, por ejemplo, mediante el uso previsto.

35 Los productos de medicamentos líquidos de moléculas biológicas con una composición y pH especificados previamente se pueden producir mediante diversos procedimientos. La forma más común es preparar soluciones de reserva con composiciones y pH especificados y, posteriormente, mezclar estas soluciones para obtener un vehículo. El vehículo se mezcla con la proteína activa en una solución acuosa hasta una composición final con un pH predefinido.

40 La IL-1 cumple, además, una función en un número de trastornos oculares como por ej., el inicio y el mantenimiento de la inflamación y el dolor vinculados con la enfermedad del ojo seco, y el enrojecimiento y la picazón vinculados con la conjuntivitis alérgica. Se ha mostrado que la IL-1Ra tiene la capacidad de prevenir y tratar ciertos trastornos oculares relacionados con la IL-1 (documento WO 2009/025763, Amparo et. Al., JAMA Ophthalmology 2013, 131, 6, 715-723). En el documento WO 2014/160371 se divulgan formulaciones estables de una proteína citoquina quimérica IL-1 β /IL-1Ra para la administración tópica en el ojo.

45 Un desafío con las formulaciones del medicamento proteínico es, en general, la baja estabilidad de la proteína activa. Por lo tanto, existe la necesidad de una formulación del antagonista del receptor de la interleuquina-1 oftálmico.

Descripción de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar novedosas composiciones de anakinra con estabilidad mejorada.

50 Otro objeto de la presente invención es proporcionar novedosas composiciones de anakinra adecuadas para su uso en el tratamiento, dicho tratamiento incluye, preferiblemente, la administración tópica de estas

composiciones de anakinra.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar novedosas composiciones de anakinra con bajas concentraciones de anakinra, como por ej., desde 0,01 mg/ml hasta 30 mg/ml de anakinra.

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 muestra el contenido de monómero de anakinra en las soluciones de anakinra después del almacenamiento a 35 °C, que se formularon en diferentes concentraciones de tampones HEPES, en comparación con las soluciones de anakinra después del almacenamiento a 35 °C que se formularon en tampón de citrato. La figura 1A muestra los datos con el osmolito taurina que se agrega y la figura 1B muestra los datos con el osmolito hidroxiprolina que se agrega. Otros detalles se proporcionan en el ejemplo 7.

10 La figura 2 muestra el contenido de monómero de anakinra en 25 mg/ml de soluciones de anakinra después del almacenamiento a 35 °C, que se formularon en tampones de citrato HEPES o tampones de citrato con osmolitos. Otros detalles se proporcionan en el ejemplo 8.

15 La figura 3 muestra el contenido de monómero de anakinra en soluciones de anakinra después del almacenamiento a 35 °C que se formularon en tampones de HEPES o de citrato. Otros detalles se proporcionan en el ejemplo 9.

20 Una composición que comprende anakinra y tampón, según se define en esta divulgación, es ventajosa en el sentido de que exhibe estabilidad en ciertas condiciones. Las condiciones que puede experimentar un producto comercial de anakinra incluyen almacenamiento a largo plazo en condiciones refrigeradas, almacenamiento a corto plazo en condiciones ambiente, y tensión mecánica durante el transporte, todas estas son condiciones que ha desarrollado la composición anterior para resistir.

25 Por el término «anakinra» se entiende una forma recombinante del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) que tiene la secuencia de 152 aminoácidos como se muestra en las posiciones 26-177 en la Secuencia de Referencia NCBI NP_776214.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov). Además, el término «anakinra» debe entenderse como que incluye las formas modificadas de anakinra, por ej., variantes de aminoácidos que tienen al menos 90 %, 95 %, 97 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de anakinra. El experto en la técnica entenderá que se pueden realizar muchas combinaciones de supresiones, inserciones, inversiones y sustituciones dentro de la secuencia de aminoácidos de anakinra, siempre que la molécula resultante («la variante anakinra») sea biológicamente activa, por ej., posee la capacidad de inhibir la IL-1. Variantes particulares de anakinra se describen, por ej., en las Patentes Estadounidenses Nos. 5.075.222, 6.858.409 y 6.599.873.

30 El término «anakinra» incluye, además, las proteínas de fusión que comprenden anakinra. La anakinra se puede formatear para que tenga un tamaño hidrodinámico más grande, por ejemplo, mediante la unión de grupos de polialquilenglicol (por ej., un grupo de polietilenglicol (PEG)), albúmina de suero, transferrina, receptor de transferrina o, al menos, la parte de unión a la transferrina.

35 Por «tampón» se entiende una entidad química que se utiliza para evitar cambios en el pH. El uso de un tampón constituye un medio para mantener el pH a un valor casi constante en una amplia variedad de aplicaciones químicas. El HEPES, o ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico, es un agente tampón químico orgánico zwitteriónico que proporciona a la composición, como se divulga en la presente memoria, propiedades ventajosas en comparación con otros tampones. En particular, el uso de un tampón HEPES puede proporcionar una composición estable. Otro tampón que puede ser utilizado en la composición como se describe en la presente memoria es el tampón de citrato de sodio. El citrato de sodio es la sal sódica del ácido cítrico, y se ha demostrado, previamente, que proporciona composiciones de anakinra para inyección con estabilidad mejorada. Sin embargo, como se muestra en los ejemplos adjuntos, el citrato de sodio, en combinación con HEPES, estabiliza, de manera sorprendente, las composiciones que comprenden anakinra a una concentración de aproximadamente 2 hasta 30 mg/ml en ciertas condiciones, como por ej., a temperaturas de almacenamiento elevadas. En particular, el tampón de HEPES solo, estabiliza, de manera sorprendente, las composiciones que comprenden anakinra a una concentración de aproximadamente 2 hasta 30 mg/ml en ciertas condiciones, como por ej., a temperaturas de almacenamiento elevadas. El tampón HEPES es un tampón conocido en la técnica; sin embargo, no se utiliza, en general, en el campo farmacéutico de administración tópica de agentes farmacéuticos al ojo.

50 En un aspecto de la invención, se proporciona una composición, que comprende: 0,01 mg/ml hasta 30 mg/ml de anakinra; tampón, que se selecciona de HEPES y una mezcla de HEPES y citrato de sodio; y opcionalmente, al menos, un osmolito.

En una realización de este aspecto, dicha composición comprende, al menos, un osmolito.

En una realización de este aspecto, dicho tampón es un tampón HEPES.

En una realización de este aspecto, dicho tampón estabiliza el pH de la composición en un pH de desde 6 hasta 7.

En una realización de este aspecto, se proporciona una composición que comprende:

- 5 0,01 mg/ml hasta 30 mg/ml de anakinra; tampón, que se selecciona de HEPES y una mezcla de HEPES y citrato de sodio, en donde dicho tampón estabiliza el pH de la composición a un pH de desde 6 hasta 7, y opcionalmente, al menos un osmolito. Típicamente la concentración de anakinra es 0,05 mg/mL hasta 30 mg/mL, como por ej., aproximadamente 0,1 mg/ml to 30 mg/ml, como por ej., aproximadamente 0,5 mg/ml to 30 mg/ml, como por ej., aproximadamente 1 mg/ml to 30 mg/ml, como por ej., aproximadamente 1,5 mg/ml to 30 mg/ml, como por ej., aproximadamente 2 mg/ml to 30 mg/ml, como por ej., aproximadamente 5 mg/ml, como por ej., aproximadamente 10 mg/ml como por ej., aproximadamente 15 mg/ml como por ej., aproximadamente 20 mg/ml o como por ej., aproximadamente 25 mg/ml.

En una realización de este aspecto, se proporciona una composición que comprende:

- 15 2 mg/ml hasta 30 mg/ml de anakinra; tampón, que se selecciona de HEPES y una mezcla de HEPES y citrato de sodio, en donde dicho tampón estabiliza el pH de la composición a un pH de desde 6 hasta 7, y opcionalmente, al menos un osmolito.

En una realización de este aspecto, dicho tampón es una mezcla de citrato de sodio y HEPES.

- 20 En este contexto, se debe entender por osmolito una entidad química la cual tiene la posibilidad de modificar la osmolalidad de una solución y proporcionar un efecto estabilizante. La osmolalidad es una propiedad coligativa, la cual depende del número de moles de todas las entidades disueltas en 1000 g de disolvente. Ejemplos no limitantes de osmolitos son L-prolina, D-treonina, L-serina, mioinositol, maltitol, D-rafinosa, pentahidrato, hidroxiprolina, taurina, glicina betaína, sacarosa, manitol, L-prolina, D-treonina, L-serina y metionina.

- 25 En una realización de este aspecto, dicha composición comprende, al menos, un osmolito. Dicho, al menos, un osmolito se puede seleccionar de taurina, prolina, hidroxiprolina, manitol y metionina. En otra realización, dicho al menos un osmolito se selecciona de taurina, prolina e hidroxiprolina. En otra realización, dicho al menos un osmolito es taurina. En otra realización, dicho al menos un osmolito es hidroxiprolina. En otra realización, dicho al menos un osmolito representa una mezcla de taurina e hidroxiprolina.

- 30 En una realización de este aspecto, dicho al menos un osmolito representa 15 mg/ml hasta 40 mg/ml de taurina, como por ej., 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mg/ml de taurina. Otras realizaciones incluyen las concentraciones de taurina como se establece en los ejemplos.

En una realización de este aspecto, dicho al menos un osmolito representa 15 mg/ml hasta 40 mg/ml de hidroxiprolina, como por ej., 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mg/ml de hidroxiprolina. Otras realizaciones incluyen las concentraciones de hidroxiprolina como se establece en los ejemplos.

- 35 En una realización de este aspecto, dicha composición comprende, además, uno o más de un agente quelante, un tensioactivo y un regulador de la tonicidad.

Un «agente quelante» es una entidad química que puede formar dos o más enlaces coordinados separados entre un ligando de polidentato (múltiples uniones) y un único átomo central. Usualmente, estos ligandos son compuestos orgánicos, ejemplos de los cuales son el ácido aminopolicarboxílico sintético, como por ej., ácido etilen diamina tetraacético (EDTA) y ácido dietilen triamina pentaacético (DPTA); fosfonatos; agentes naturales, como por ej., los anillos de porfirina de clorofila y hemoglobina; polisacáridos, ácido polinucleicos; aminoácidos, como por ej., ácido glutámico e histidina; diácidos orgánicos como por ej., malato y polipéptidos como por ej., fitoquelatina. Además, muchas especies microbianas producen pigmentos hidrosolubles que se utilizan como agentes quelantes, que se denominan sideróforos. Por ejemplo, las especies de *Pseudomonas* son conocidas por secretar pioquelina y pioverdina que se unen al hierro. Otro ejemplo es la enterobactina, que es producida por *E. coli*, el cual es el agente quelante más fuerte conocido. El ácido cítrico tiene propiedades quelantes y, por lo tanto, se utiliza para capturar iones multivalentes y, en consecuencia, como ejemplo suavizan el agua en jabones y detergentes para el lavado de ropa.

- 50 En una realización, dicha composición comprende un agente quelante. Dicho agente quelante se puede seleccionar de EDTA, DPTA, fosfonato, un agente quelante natural, un sideróforo, un polisacárido, un ácido polinucleico, un aminoácido, un diácido orgánico y un polipéptido. Ejemplos específicos de estos agentes quelantes se definen anteriormente. En una realización de este aspecto, dicho agente quelante es EDTA.

Por el término «tensioactivo» se entiende un compuesto que reduce la tensión superficial (o la tensión interfacial)

entre una fase líquida y una fase gaseosa, entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Los tensioactivos son anfifílicos, lo que significa que contienen grupos hidrófobos y grupos hidrofílicos. Los tensioactivos se dispersarán en el agua y adsorberán en interfaces entre el aire y el agua o en la interfaz entre el aceite y el agua, en el caso donde el agua se mezcla con aceite.

- 5 En una realización, dicha composición comprende, al menos, un tensioactivo. Ejemplos no limitantes de tensioactivos adecuados para su uso en dicha composición incluyen, pero sin estar limitados, polímeros de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno, como por ej., poloxámeros, los cuales son copolímeros tribloque compuestos de una cadena central de óxido de polipropileno que está flanqueada por dos cadenas de óxido de polietileno, un ejemplo de las cuales es plurónico F68, sorbitán monolaurato, sorbitol éster, éster de ácido graso poliglicerol, cocamida DEA lauril sulfato, alcanolamida, estearato de polioxietilen propilenglicol, lauril éster polioxietileno, cetil éster polioxietileno, polisorbato, como por ej., polisorbato 80 (PS80), también conocido como sorbitán monooleato polioxietileno o Tween 80™, y polisorbato 20 (PS20), glicerol monoestearato, glicerol distearato, sorbitol monopalmitato, sorbitán monooleato polioxietileno, sorbitán monolaurato polioxietileno y propilenglicol monoestearato. En una realización, dicho tensioactivo es no iónico. En una realización, dicho tensioactivo se selecciona de polisorbato 80 y plurónico F68. Preferiblemente, dicho tensioactivo es polisorbato 80.

Por el término «regulador de la tonicidad» se entiende, en general, un agente que ajusta la osmolalidad de una solución y, más específicamente, un agente que ajusta la osmolalidad a un valor de osmolalidad cercano al valor de osmolalidad de un fluido fisiológico.

- 20 En una realización, dicha composición comprende uno o más reguladores de la tonicidad. Los reguladores de la tonicidad adecuados incluyen, pero sin estar limitados: cloruro de sodio (NaCl), sorbitol, manitol, sacarosa, trehalosa, y otros azúcares. En una realización de este aspecto, dicho regulador de la tonicidad es NaCl.

En una realización, dicha composición comprende EDTA como agente quelante, polisorbato 80 como tensioactivo y NaCl como regulador de la tonicidad.

- 25 En una realización de este aspecto, dicho tampón estabiliza el pH de la composición a un pH de aproximadamente 6,5. Como se explica en otra parte en la presente memoria, la función de un tampón es mantener el pH a un valor casi constante. En esta realización, el tampón mantiene, de este modo, el pH de la composición a aproximadamente 6,5.

- 30 En una realización de este aspecto, se proporciona una composición, en donde dicha composición tiene una osmolalidad de aproximadamente 150 a 320 mOsm/kg. Cuando la osmolalidad de una solución se describe como isotónica/hipertónica o hipotónica, la denotación tonicidad significa que la presión osmótica de la solución se relaciona con la de una solución fisiológica. En general, una solución isotónica tiene una osmolalidad de aproximadamente 280 hasta 320 mOsm/kg.

- 35 En una realización, dicha composición comprende un osmolito, la concentración del cual se ajusta para proporcionar una composición isotónica. En particular, dicha composición puede tener una osmolalidad de desde 280 hasta 320 mOsm/kg. En general, las preparaciones isotónicas se prefieren para las administraciones tópicas dado que tienden, típicamente, a ser menos irritantes que las soluciones no isotónicas. Una composición isotónica, que preferiblemente tiene una osmolalidad en el intervalo definido, es adecuada para la administración ocular, dado que su osmolalidad está dentro del mismo intervalo que la osmolalidad del ojo.

- 40 No obstante, las composiciones hipotónicas pueden ser útiles, además, para administración ocular. En consecuencia, en una realización, dicha composición comprende un osmolito, en donde la concentración de dicho osmolito se ajusta para proporcionar una composición hipotónica. En particular, dicha composición puede tener una osmolalidad de desde 150 hasta 280 mOsm/kg. Una composición hipotónica puede proporcionar propiedades ventajosas cuando se administra al ojo de un paciente, en particular, si dicho paciente experimenta ojo seco. La composición puede proporcionar alivio al paciente al humedecerse el ojo.

En una realización, la composición comprende más ingredientes, como por ej., uno o más conservantes. Un conservante se puede agregar a una composición para mantener, por ejemplo, su seguridad microbiológica.

En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 2 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
- Tampón HEPES 5 mM hasta 50 mM, en donde dicho tampón estabiliza el pH de la composición en un pH de desde 6 hasta 7; y

- 1 mg/ml hasta 100 mg/ml de un osmolito que se selecciona de taurina e hidroxiprolina.

En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 2 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
- Tampón HEPES 5 mM hasta 50 mM, en donde dicho tampón estabiliza el pH de la composición en un pH de desde 6 hasta 7;
- 1 mg/ml hasta 100 mg/ml de un osmolito que se selecciona de taurina, prolina, hidroxiprolina, manitol y metionina;
- EDTA 0,05 mM hasta 1 mM;
- 0,01 % hasta 1 % de polisorbato 80; y
- 0,1 mg/ml hasta 5 mg/ml de NaCl;

Las composiciones, como se definió anteriormente, han sido sometidas a pruebas de estabilidad y han demostrado, en dichas pruebas, propiedades beneficiosas.

En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 2 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
- Tampón HEPES 5 mM hasta 50 mM, en donde dicho tampón estabiliza el pH de la composición en un pH de desde 6 hasta 7;
- 1 mg/ml hasta 50 mg/ml de un osmolito que se selecciona de taurina, prolina e hidroxiprolina.
- EDTA 0,05 mM hasta 1 mM;
- 0,01 % hasta 1 % de polisorbato 80; y
- 0,1 mg/ml hasta 5 mg/ml de NaCl;

Las composiciones, como se definió anteriormente, han sido sometidas a pruebas de estabilidad y han demostrado, en dichas pruebas, buenas propiedades.

- En una realización de este aspecto, dicho tampón es tampón HEPES desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM. Dicho tampón HEPES puede estabilizar el pH de la composición a aproximadamente 6,5.

En una realización de este aspecto, dicho tampón es tampón HEPES aproximadamente 10 mM. Dicho tampón HEPES puede estabilizar el pH de la composición a aproximadamente 6,5.

En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 2 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
- una mezcla de tampón HEPES 5 mM hasta 50 mM y tampón de citrato de sodio 0,05 mM hasta 2 mM, en donde dicha mezcla de tampones estabiliza el pH de la composición en un pH de desde 6 hasta 7;
- 1 mg/ml hasta 100 mg/ml de un osmolito que se selecciona de taurina, prolina, hidroxiprolina, manitol y metionina;
- EDTA 0,05 mM hasta 1 mM;
- 0,01 % hasta 1 % de polisorbato 80; y
- 0,1 mg/ml hasta 5 mg/ml de NaCl;

Las composiciones, como se definió anteriormente, han sido sometidas a pruebas de estabilidad y han demostrado, en dichas pruebas, buenas propiedades.

En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 2 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
- 5 • una mezcla de tampón HEPES 5 mM hasta 50 mM y tampón de citrato de sodio 0,05 mM hasta 2 mM, en donde dicha mezcla de tampones estabiliza el pH de la composición en un pH de desde 6 hasta 7;
- 1 mg/ml hasta 50 mg/ml de un osmolito que se selecciona de taurina, prolina e hidroxiprolina.
- EDTA 0,05 mM hasta 1 mM;
- 0,01 % hasta 1 % de polisorbato 80; y
- 10 • 0,1 mg/ml hasta 5 mg/ml de NaCl;

En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 2 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
- Tampón HEPES 10 mM - 50 mM; y
- 15 mg/ml - 25 mg/ml de taurina.

15 En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 2 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
- Tampón HEPES 10 mM - 50 mM; y
- 20 mg/ml - 30 mg/ml de hidroxiprolina.

En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 20 • 2 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
- Tampón HEPES 10 mM - -50 mM;
- 10 mg/ml - 15 mg/ml de taurina; y
- 10 mg/ml - 15 mg/ml de hidroxiprolina.

25 Las composiciones, como se definió anteriormente, han sido sometidas a pruebas de estabilidad y han demostrado, en dichas pruebas, buenas propiedades.

En una realización de este aspecto, dicho tampón es una mezcla de tampón HEPES 10 mM y tampón de citrato de sodio 1,2 mM. Dicha mezcla de tampones puede estabilizar el pH de la composición a aproximadamente 6,5.

En una realización de este aspecto, dicho al menos un osmolito representa taurina. En particular, dicho al menos un osmolito representa 20 mg/ml hasta 40 mg/ml de taurina.

30 En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 5 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
- Tampón HEPES 10 mM, el cual estabiliza el pH de la composición a aproximadamente 6,5;
- EDTA 0,5 mM;

- 0,1 % de polisorbato 80;
- 1 mg/ml hasta 1,5 mg/ml de NaCl; y
- 30 mg /ml de taurina.

En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 5
- 5 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
 - una mezcla de tampón HEPES 10 mM y tampón de citrato de sodio 1,2 mM, el cual estabiliza el pH de la composición a aproximadamente 6,5;
 - EDTA 0,5 mM;
 - 0,1 % de polisorbato 80;
- 10
- 1 mg/ml hasta 1,5 mg/ml de NaCl; y
 - 30 mg /ml de taurina.

En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 5 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
 - Tampón HEPES 10 mM, el cual estabiliza el pH de la composición a aproximadamente 6,5; y
- 15
- aproximadamente 30 mg/ml de taurina.

En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 5 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
- Tampón HEPES 10 mM, el cual estabiliza el pH de la composición a aproximadamente 6,5; y
- aproximadamente 30 mg/ml de hidroxiprolina.

20 En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 5 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
- Tampón HEPES 10 mM, el cual estabiliza el pH de la composición a aproximadamente 6,5;
- EDTA 0,5 mM;
- 0,1 % de polisorbato 80;

- 25
- 1 mg/ml hasta 1,5 mg/ml de NaCl; y
 - aproximadamente 30 mg/ml de taurina.

En una realización de este aspecto, dicha composición comprende desde aproximadamente 15 mg/ml hasta aproximadamente 25 mg/ml de anakinra.

En una realización de este aspecto, dicha composición comprende:

- 30
- 5 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
 - una mezcla de tampón HEPES 10 mM y tampón de citrato de sodio 1,2 mM, el cual estabiliza el pH de la composición a aproximadamente 6,5;

- EDTA 0,5 mM;
- 0,1 % de polisorbato 80;
- 1 mg/ml hasta 1,5 mg/ml de NaCl; y
- 30 mg /ml de taurina.

5 En una realización, la composición, de acuerdo con los aspectos que se describen en la presente memoria, está exenta o esencialmente exenta de citrato.

En una realización, la composición, de acuerdo con los aspectos que se describen en la presente memoria, se administra por vía tópica a un sujeto, por ejemplo, un ser humano u otro mamífero. La administración tópica, por ejemplo, incluye administración ocular, es decir administración al ojo, administración dérmica o por vía mucosa

10 En un aspecto de la presente invención, las composiciones se administran por vía tópica al ojo.

En general, los medicamentos oftálmicos tópicos pueden ser administrados por los mismos pacientes. Dado que el paciente puede estar almacenando un medicamento durante un periodo de tiempo relativamente largo, y por conveniencia también debe manejar el medicamento durante algún tiempo a temperatura ambiente, la formulación puede ser sometida a temperaturas más elevadas y a mayores niveles de tensión por agitación que una formulación que normalmente es almacenada por un médico o farmacéutico antes de la administración, o de manera alternativa para un paciente que maneja un medicamento sensible a la temperatura que solo está destinado como medicamento en el hogar del paciente. Como se conoce en la técnica, las proteínas son más sensibles a la agitación y a la temperatura elevada que las pequeñas moléculas. La tensión por agitación puede provocar precipitación y la tensión térmica puede provocar precipitación y degradación química. Además, durante la carga de un compuesto en un dispositivo para administración, puede haber exposición a la tensión térmica.

Las composiciones de la presente invención son útiles en el tratamiento de trastornos tópicos, como por ej., trastornos oftálmicos, trastornos relacionados con la IL-1, trastornos oculares inflamatorios y, en particular, trastornos relacionados con la IL-1 oftálmica.

25 Los trastornos relacionados con la IL-1 incluyen el síndrome de Sjögren primario o secundario, como por ej., queratoconjuntivitis sicca vinculada con el síndrome de Sjögren, el síndrome de no-Sjögren, como por ej., la enfermedad de la glándula lacrimógena o la obstrucción del conducto lagrimal; trastornos del ojo seco, síndrome de queratitis sicca, síndrome sicca, xeroftalmia, trastorno de la película lagrimal, disminución de la producción de lágrimas, deficiencia acuosa de las lágrimas, ojo seco vinculado con la enfermedad del injerto contra huésped y disfunción de glándulas de Meibomio.

Los trastornos incluyen, además, afecciones inflamatorias de la superficie ocular de la córnea, neovascularización de la córnea, queratitis, que incluyen la queratitis ulcerativa periférica y la queratitis microbiana, cicatrización de heridas en la córnea, trasplante de córnea/queratoplastia, cirugía de implante de queratoprótesis, trasplante lamelar, trasplante endotelial selectivo.

35 Los trastornos incluyen, además, trastornos que afectan la conjuntiva como por ej., trastornos por cicatrización conjuntival y conjuntivitis, por ejemplo, conjuntivitis alérgica y conjuntivitis alérgica grave, penfigoide ampolloso y síndrome de Stevens-Johnson.

Los trastornos incluyen, además, reacciones alérgicas que afectan el ojo, como por ej., la enfermedad ocular alérgica grave (atópica), también conocida como conjuntivitis alérgica.

40 Los trastornos incluyen, además, trastornos autoinmunitarios que afectan al ojo, como por ej., oftalmia simpática, síndrome de Vogt-Koyanagi Harada (VKH), coriorretinopatía de Birdshot, penfigoide ocular cicatricial, iridociclitis heterocromática de Fuchs y varias formas de uveítis.

Los trastornos incluyen, además, retinopatía diabética, edema macular diabético, uveítis, enfermedad ocular tiroidea, ectropión/entropión, alergia a los lentes de contacto y enfermedad del ojo seco.

45 En consecuencia, en un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno oftálmico. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular en una variedad de formas, como por ej., gotas oculares, suspensiones y ungüentos.

En una realización de este aspecto, dicho trastorno oftálmico es un trastorno ocular inflamatorio.

En una realización de este aspecto, dicho trastorno oftálmico es un trastorno relacionado con la IL-1.

En una realización de este aspecto, dicho trastorno oftálmico es un trastorno relacionado con la IL-1 oftálmica.

5 En una realización de este aspecto, dicho trastorno oftálmico se selecciona del síndrome de Sjögren primario o secundario, como por ej., queratoconjuntivitis sicca vinculada con el síndrome de Sjögren, síndrome de no-Sjögren, como por ej., enfermedad de la glándula lacrimógena u obstrucción del conducto lagrimal; trastornos del ojo seco, queratitis sicca, síndrome sicca, xeroftalmia, trastorno de la película lagrimal, disminución de la producción de lágrimas, deficiencia acuosa de las lágrimas, ojo seco vinculado con la enfermedad del injerto contra huésped y disfunción de glándulas de Meibomio, afecciones inflamatorias de la superficie ocular de la

10 córnea, neovascularización de la córnea, queratitis, que incluyen la queratitis ulcerativa periférica y la queratitis microbiana, cicatrización de heridas en la córnea, trasplante de córnea/queratoplastia, cirugía de implante de queratoprótesis, trasplante lamelar, trasplante endotelial selectivo, trastornos por cicatrización conjuntival y conjuntivitis, por ejemplo, conjuntivitis alérgica y conjuntivitis alérgica grave, penfigoide ampolloso y síndrome de Stevens-Johnson, reacciones alérgicas que afectan el ojo, como por ej., enfermedad ocular alérgica grave

15 (atópica), también conocida como conjuntivitis alérgica, trastornos autoinmunitarios que afectan al ojo, como por ej., oftalmia simpática, síndrome de Vogt-Koyanagi Harada (VKH), coriorretinopatía de Birdshot, penfigoide ocular cicatricial, iridociclitis heterocromática de Fuchs y varias formas de uveítis, retinopatía diabética, edema macular diabético, enfermedad ocular tiroidea, ectropión/entropión, alergia a los lentes de contacto y enfermedad del ojo seco.

20 En una realización de este aspecto, dicho trastorno oftálmico se selecciona del síndrome de Sjögren primario o secundario, síndrome de no-Sjögren, trastornos del ojo seco, queratitis sicca, síndrome sicca, xeroftalmia, trastorno de la película lagrimal, disminución de la producción de lágrimas, deficiencia acuosa de las lágrimas, ojo seco vinculado con la enfermedad del injerto contra huésped y disfunción de glándulas de Meibomio, afecciones inflamatorias de la superficie ocular de la córnea, neovascularización de la córnea, queratitis, cicatrización de heridas en la córnea, trasplante de córnea/queratoplastia, cirugía de implante de

25 queratoprótesis, trasplante lamelar, trasplante endotelial selectivo, trastornos por cicatrización conjuntival, conjuntivitis, penfigoide ampolloso, síndrome de Stevens-Johnson, oftalmia simpática, síndrome de Vogt-Koyanagi Harada (VKH), coriorretinopatía de Birdshot, penfigoide ocular cicatricial, iridociclitis heterocromática de Fuchs, retinopatía diabética, edema macular diabético, enfermedad ocular tiroidea, ectropión/entropión,

30 alergia a los lentes de contacto y enfermedad del ojo seco.

En una realización de este aspecto, dicho trastorno oftálmico es conjuntivitis alérgica.

En un aspecto de la invención, se proporciona el uso de una composición farmacéutica en la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de un trastorno oftálmico.

En una realización de este aspecto de uso, dicho trastorno oftálmico es un trastorno ocular inflamatorio.

35 En una realización del aspecto de uso, dicho trastorno oftálmico es un trastorno relacionado con la IL-1.

En una realización del aspecto de uso, dicho trastorno oftálmico es un trastorno relacionado con la IL-1 oftálmica.

En una realización del aspecto de uso, dicho trastorno oftálmico se selecciona de un trastorno oftálmico como se define en otros aspectos en la presente memoria.

40 En un aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar un trastorno oftálmico, que comprende administrar una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico de una composición farmacéutica de la invención a un sujeto que lo necesita. Típicamente, dicho sujeto es un mamífero, como por ej., un ser humano.

En una realización de este aspecto, dicho trastorno oftálmico es un trastorno ocular inflamatorio.

En una realización de este aspecto, dicho trastorno oftálmico es conjuntivitis alérgica.

En una realización de este aspecto, dicho trastorno oftálmico es un trastorno relacionado con la IL-1.

45 En una realización de este aspecto, dicho trastorno oftálmico es un trastorno relacionado con la IL-1 oftálmica.

En una realización de este aspecto, dicho trastorno oftálmico se selecciona de un trastorno oftálmico como se define en otros aspectos en la presente memoria.

En una realización de este aspecto, dicha composición farmacéutica se administra por vía tópica. En particular, dicha composición farmacéutica se administra por vía tópica al ojo del sujeto.

5 Algunos procedimientos de producción o relleno requieren, al menos, una breve exposición de una composición a una temperatura relativamente alta. De este modo, a los fines de la producción, a menudo se requiere que una composición sea estable en la temperatura, por ej., de modo que pueda resistir las condiciones necesarias para la producción o distribución de la composición en un recipiente.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo de administración del medicamento que comprende una composición, como se define en la presente memoria.

10 En una realización, dicho dispositivo de administración del medicamento es un recipiente de múltiples uso o un recipiente de único uso.

15 Por «recipiente de único uso o de múltiples usos» significa un recipiente que sostiene la composición y está diseñado para administrar una o varias dosis en una ocasión específica (recipiente de único uso) o administrar varias dosis en múltiples ocasiones (recipiente de múltiples usos). Los recipientes de múltiples usos de medicamentos estériles contienen, típicamente, composiciones que incluyen uno o más conservantes, a fin de permitir la abertura del recipiente para retirar las diversas dosis en varios días, manteniendo la seguridad microbiológica de la composición.

En una realización, la composición de la invención se proporciona en un recipiente de soplado, llenado y sellado.

20 Por «recipiente de soplado, llenado y sellado» se entiende un recipiente que está fabricado de un material polimérico, el cual se forma, se llena y se sella en un procedimiento continuo sin intervención humana, en un área estéril cerrada dentro de una máquina. La tecnología se puede utilizar para producir, de manera aséptica, formas de administración líquidas farmacéuticas estériles. Por ejemplo, cargar una formulación dentro de un recipiente de soplado, llenado y sellado (BFS) puede dar lugar a la exposición de la formulación a temperaturas elevadas, además de la tensión por agitación y/o mecánica vinculada con el procedimiento de llenado.

25 La composición, como se divulga en la presente memoria, exhibe, preferiblemente, estabilidad mejorada en condiciones particulares. Por ejemplo, la estabilidad de la composición se puede evaluar mediante el uso de uno o más métodos que se describen en la presente memoria, como por ej., la evaluación del aspecto visual, espectroscopía UV, HPLC por exclusión de tamaño (SE-HPLC), HPLC de fase inversa (RP-HPLC), HPLC de intercambio catiónico (CE-HPLC), turbidez, una prueba de recuento de partículas por ensayo de oscurecimiento de la luz, una prueba de recuento de partículas microscópicas o de nivel de contenido de monómeros. Cuando se hacen evaluaciones de estabilidad basado en el aspecto visual, se evalúa, por ejemplo, la opalescencia de la composición, el color y el contenido de partículas. El experto en la técnica conoce otros métodos para evaluar la estabilidad de una composición.

35 En una realización relevante para los diversos aspectos de la invención, como se divulga en la presente memoria, la composición es estable después del almacenamiento durante un periodo de, al menos, una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas o al menos seis semanas o más, como por ej., 3, 4, 5 o 6 meses, en condiciones ambiente.

40 En una realización, la composición es estable a una temperatura de aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 40 °C, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 25 °C hasta aproximadamente 35 °C, como por ej., a una temperatura de aproximadamente 30 °C durante un periodo de tiempo de al menos dos días, tres días, cinco días, una semana, diez días, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas o seis semanas.

45 En una realización, la composición es estable a una temperatura de aproximadamente 2 °C hasta aproximadamente 15 °C, por ejemplo a una temperatura de aproximadamente 2 °C hasta aproximadamente 8 °C, durante un periodo de tiempo de al menos una semana; dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, seis semanas, ocho semanas, 16 semanas, 20 semanas, 25 semanas, 30 semanas, 35 semanas, 40 semanas, 45 semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, o más, como por ej., 1 a 5 años.

Ejemplos

Materiales y métodos generales

50 Los siguientes materiales y métodos se utilizaron en los ejemplos dados a continuación. Solución madre de anakinra: 220 mg/ml de anakinra en tampón de CSE (es decir, citrato, sal, EDTA): citrato de sodio 10 mM, cloruro

de sodio 140 mM, EDTA 0,5 mM, pH 6,5.

Los métodos de HPLC se establecieron de acuerdo con los protocolos estándares internos. Para los análisis de cromatografía por exclusión de tamaño (SE-HPLC) se utilizó una columna TSK-Gel G2000 SWXL 7,8 mm x 30 cm. La fase móvil fue tampón de CSE, el volumen / concentración de la inyección fue de 100 µl / 5 mg/ml, la longitud de onda fue 280 nm, y el caudal fue 0,5 ml/min.

Para los análisis de cromatografía líquida de alta presión de intercambio catiónico (CE-HPLC) se utilizó una columna Tosoh SP5PW Protein Pak 7,5 mm x 7,5 cm, la fase móvil A fue 20 mM de MES, pH 5,5 y la fase móvil B fue 20 mM de MES, 1M de NaCl, pH 5,5. El volumen / concentración de la inyección fue 100 µl / 5 mg/ml, la longitud de onda fue 280 nm y el caudal fue 0,5 ml/min.

Para los análisis de cromatografía líquida de alta presión de intercambio catiónico se utilizó una columna Phenomenex Jupiter C4 RP 250 x 4,6 mm. La fase móvil A fue 0,1 % de TFA en agua y la fase móvil B fue 0,1 % de TFA en 90 % de acetonitrilo. El volumen / concentración de la inyección fue 50 µl / 0,3 mg/ml, la longitud de onda fue 215 nm y el caudal fue 1 ml/min.

Se realizaron observaciones visuales sobre las composiciones por medio de la inspección de la solución en un recipiente de vidrio circular, contra un fondo negro y blanco. Se observó la opalescencia (turbidez) y las partículas visuales.

La turbidez de las composiciones se cuantificó mediante el uso de un turbidímetro HACH 2100AN. Los valores del turbidímetro se citaron en unidades de turbidez nefelométrica (NTU), donde un valor numérico representa el grado de turbidez o la opalescencia de una solución.

Ejemplo 1

Estabilidad de las composiciones de osmolito a 35 °C

La solución madre de anakinra se diluyó hasta 30 mg/ml de anakinra en composiciones de osmolito con o sin NaCl. Once osmolitos diferentes se ensayaron de la siguiente manera:

Se diluyó solución madre de anakinra con soluciones acuosas de osmolitos en agua deionizada, composiciones 1-11. Concentraciones de NaCl, citrato y EDTA después de la dilución de la solución madre de anakinra en tampón de CSE con las soluciones acuosas de osmolito: NaCl = 19,1 mM (1,12 mg/ml); citrato = 1,36 mM; EDTA = 0,07 mM, y

Se diluyó solución madre de anakinra con soluciones acuosas de osmolitos en 19,2 mM de NaCl, composiciones 12-22. Concentraciones de NaCl, citrato y EDTA después de la dilución de la solución madre de anakinra en tampón de CSE con las soluciones acuosas de NaCl - osmolito: NaCl = 38,2 mM (2,24 mg/ml); citrato = 1,36 mM; EDTA = 0,07 mM.

Las composiciones (22 en total) se ajustaron hasta pH 6,5 +/- 0,1, se almacenaron a 35 °C y se monitorearon durante 2 semanas.

Tabla 1 Composiciones de anakinra (30 mg/ml) diluidas con soluciones de osmolito. Todas las composiciones contienen tampón de citrato 1,36 mM y EDTA 0,07.

Ej.	Osmolito	Composición diluyente	Concentración de osmolito (mg/ml)	Concentración de NaCl (mg/ml)
01	L-prolina	H ₂ O	30,13	1,12
02	D-treonina	H ₂ O	31,17	1,12
03	L-serina	H ₂ O	27,51	1,12
04	mioinositol	H ₂ O	47,15	1,12
05	maltitol	H ₂ O	90,11	1,12
06	D-rafinosa pentahidrato	H ₂ O	155,76	1,12
07	hidroxiprolina	H ₂ O	34,32	1,12

Ej.	Osmolito	Composición diluyente	Concentración de osmolito (mg/ml)	Concentración de NaCl (mg/ml)
08	taurina	H ₂ O	32,79	1,12
09	glicina betaína	H ₂ O	30,65	1,12
10	sacarosa	H ₂ O	89,58	1,12
11	manitol	H ₂ O	47,68	1,12
12	L-prolina	1,12 mg /ml de NaCl	25,56	2,24
13	D-treonina	1,12 mg /ml de NaCl	26,44	2,24
14	L-serina	1,12 mg /ml de NaCl	23,33	2,24
15	mioinositol	1,12 mg /ml de NaCl	40,00	2,24
16	maltitol	1,12 mg /ml de NaCl	76,44	2,24
17	D-rafinosa pentahidrato	1,12 mg /ml de NaCl	131,98	2,24
18	hidroxiprolina	1,12 mg /ml de NaCl	29,11	2,24
19	taurina	1,12 mg /ml de NaCl	27,78	2,24
20	glicina betaína	1,12 mg /ml de NaCl	26,00	2,24
21	sacarosa	1,12 mg /ml de NaCl	75,99	2,24
22	manitol	1,12 mg /ml de NaCl	40,44	2,24

Se observaron mínimos cambios tanto en términos de contenido de monómeros por SE-HPLC como la turbidez que se midió durante el periodo de análisis de 2 semanas, no obstante, las composiciones que contienen NaCl fueron visualmente más claras que las que se prepararon con agua deionizada.

- 5 Cuatro composiciones de osmolitos proporcionaron mejoras basadas en el aspecto visual, con un contenido mínimo de partículas y ópticamente claras después de 2 semanas a 35 °C.

- 12 (prolina + NaCl),
18 (hidroxiprolina + NaCl),
19 (taurina + NaCl) y
10 22 (manitol + NaCl).

Estas cuatro composiciones fueron visualmente más claras en comparación con las otras composiciones, lo que muestra que estos cuatro osmolitos proporcionaron un efecto estabilizante sobre la anakinra.

Ejemplo 2

Formulación de anakinra en varios tampones

- 15 Formulación en el tampón de HEPES

La solución madre de anakinra se diluyó hasta 60 mg/ml de proteína en tampón de CSE y se dializó en HEPES 10 mM, 38,2 mM de NaCl, pH 6,3, 6,5 y 6,9. En todos los casos, 10 ml de solución proteínica se dializó contra 2 x 2 litros de tampón.

- 20 Después de diálisis, las composiciones se diluyeron hasta 30 mg/ml de anakinra con tampón HEPES 10 mM que contiene varios osmolitos y NaCl 38,2 mM, de modo que las composiciones serían isotónicas en un valor previsto de 280-320 mOsm/kg. Juntas, se prepararon 12 composiciones (4 osmolitos a pH 6,3, 6,5 y 6,9, respectivamente) y se almacenaron a 35 °C con análisis completo a t = 0, 2, 4 y 8 semanas. Como referencia se utilizó anakinra 30 mg/ml en CSE. Esta composición ha sido almacenada y ensayada en condiciones idénticas a las otras composiciones.

- 25 La concentración que se midió en 280 nm UV indicó ninguna pérdida de proteína durante el periodo de análisis de 8 semanas. En el almacenamiento hubo una reducción en el contenido de monómeros para todas las muestras según se midió por SE-HPLC. El contenido de monómero de anakinra que se midió por SE-HPLC

después de 4 semanas fue significativamente más alto en el tampón de HEPES en comparación con el tampón de CSE (> 99,0 % vs. 97,9 %).

Se identificó que la turbidez después de 2 semanas de almacenamiento a 35 °C fue mejor, en general, para la anakinra que se formuló en tampón de HEPES que para la anakinra que se formuló en tampón de CSE. En comparación, la turbidez de una solución de anakinra de 30 mg/ml en tampón de CSE a pH 6,5, que se almacenó durante 2 semanas a 35 °C, fue de 15,6 NTU. Los datos comparables para anakinra, que se formuló en tampón de HEPES a pH 6,5 con osmolitos, fueron de 6-9 NTU después de dos semanas de almacenamiento. Para las muestras a pH 6,3 y 6,9, los valores de turbidez fueron, en todos los casos salvo uno (prolina, pH 6,3), mejores que los valores de turbidez de anakinra en tampón de CSE al mismo pH. Para las muestras de anakinra en tampón de HEPES a pH 6,5 que incluye prolina, hidroxiprolina, taurina o manitol, la turbidez fue baja incluso después de 8 semanas, véase la tabla 2 dada a continuación.

Tabla 2: Turbidez de anakinra que se formuló en tampón de HEPES que incluye osmolitos.

Ej.	Osmolito	pH	Turbidez (NTU)			
			Inicio	2 semanas	4 semanas	8 semanas
23	Prolina	6,3	3,44	21	30,9	29,2
24	Hidroxiprolina	6,3	3,46	15	29,1	48,7
25	Taurina	6,3	3,4	8,57	15,1	13,6
26	Manitol	6,3	3,96	10,5	15,9	33,5
27	Prolina	6,5	2,78	6,42	12,3	15,7
28	Hidroxiprolina	6,5	2,88	9,22	17	21,1
29	Taurina	6,5	2,75	6,11	8,82	12,9
30	Manitol	6,5	3,36	6,4	8,13	11,7
31	Prolina	6,9	2,84	5,93	12,1	37,1
32	Hidroxiprolina	6,9	2,75	5,48	9,07	27,1
33	Taurina	6,9	2,49	8,64	12,3	10,3
34	Manitol	6,9	2,6	6,85	14,5	30,9

Formulación de anakinra en tampón de His HCl.

La solución madre de anakinra se diluyó hasta 60 mg/ml de anakinra en CSE y se dializó en His HCl 10 mM, NaCl 38,2 mM, pH 6,5.

Después de diálisis, las composiciones se diluyeron hasta 30 mg/ml de anakinra en varias composiciones de osmolitos (taurina, hidroxiprolina, prolina, manitol) que contiene, además, His HCl 10 mM y NaCl 38,2 mM, de modo que las composiciones serían isotónicas en un valor previsto de 280 mOsm/kg. Las composiciones se almacenaron a 35 °C y se llevó a cabo un análisis completo a t = 0, 2 y 4 semanas.

La concentración de proteína que se midió mostró ninguna pérdida de contenido de proteína después de 4 semanas a 35 °C.

El método de análisis SE-HPLC mostró una reducción en el contenido de monómero, no obstante, el contenido de anakinra e la mayoría de las composiciones en tampón His fue superior al contenido de anakinra en el tampón CSE, véase la tabla 3.

Tabla 3: Contenido de monómero de anakinra que se formuló en tampón His que incluye osmolito después del almacenamiento a 35 °C.

Ej.	Anakinra mg/ml	Osmolito	Contenido de monómero de anakinra (% por SE-HPLC)
-----	----------------	----------	---

			Inicio	2 semanas	4 semanas
35	30	Prolina	99,87	99,75	99,98
36	30	Hidroxiprolina	99,87	99,70	99,13
37	30	Taurina	99,87	99,71	99,53
38	30	Manitol	99,87	99,65	98,13

Formulación de anakinra en tampón de Tris HCl.

La solución madre de anakinra se diluyó hasta 60 mg/ml de anakinra en tampón de CSE y se dializó en Tris HCl 10, NaCl 38,2 mM, pH 6,5.

5 Después de diálisis, las composiciones se diluyeron hasta 30 mg/ml de anakinra en varias composiciones de osmolitos que contienen, además, Tris HCl 10 mM y NaCl 38,2 mM, de modo que las composiciones serían isotónicas en un valor previsto de 280 mOsm/kg. Las composiciones se almacenaron a 35 °C y se llevó a cabo un análisis completo a t = 0, 2 y 4 semanas.

10 De manera similar, las composiciones mostraron ninguna pérdida de contenido de proteína después de la medición de la concentración de proteína después de 4 semanas a 35 °C. La SE-HPLC mostró una leve disminución en el contenido de monómero al cabo del almacenamiento a 35 °C pero la disminución fue, en general, inferior que para la anakinra en tampón de CSE, véase la tabla 4.

Tabla 4: Contenido de monómero de anakinra que se formuló en tampón Tris que incluye osmolito después del almacenamiento a 35 °C.

Ej.	Anakinra mg/ml	Osmolito	Contenido de monómero de anakinra (% por SE-HPLC)		
			Inicio	2 semanas	4 semanas
39	30	Prolina	99,87	99,74	98,34
40	30	Hidroxiprolina	99,87	99,72	99,44
41	30	Taurina	99,87	99,68	99,26
42	30	Manitol	99,87	99,65	99,22

Conclusión

20 Una comparación de la estabilidad de anakinra 30 mg/ml en los tampones de CSE, HEPES, His y Tris muestra que la estabilidad después de 4 semanas es mejor en los tampones de HEPES, His y Tris que en el tampón CSE. La conclusión general es que el tampón de HEPES proporciona estabilidad óptima de anakinra y que esto se aplica, además, en presencia de un osmolito. Estas composiciones basadas en el buffer de HEPES dieron el mejor perfil de estabilidad general cuando se tomaron en consideración todos los métodos analíticos (concentración de proteína, SE-HPLC y turbidez).

Ejemplo 3

Composiciones que comprenden anakinra en tampón de HEPES, y al menos un agente osmolítico.

25 Preparación

La solución madre de anakinra congelada se descongeló y se dializó contra HEPES 10 mM, NaCl (2,24 mg/ml), EDTA (0,5 mM), polisorbato 80 (PS80: 1 mg/ml), a un pH de 6,5 junto con varios osmolitos.

30 Todas las muestras se dializaron en una escala de 2 x 12,5 ml contra 2 x 2000 ml de tampón. Después de diálisis, la solución se alicuotó y se diluyó con composición de reserva de osmolitos/NaCl/EDTA/PS80. Las concentraciones de los osmolitos variaron para obtener isotonicidad (280-320 mOsmol/kg) en las composiciones finales. Las composiciones obtenidas se establecen en la tabla 5.

El material diluido se almacenó en tubos de vidrio a 30 °C y se evaluó visualmente para turbidez a intervalos reguladores durante 2 semanas de almacenamiento. Los resultados se presentan en la tabla 5.

Tabla 5: Turbidez de las composiciones de anakinra en tampón de HEPES, 0,19 mg/ml de EDTA, 1 mg/ml de PS80, y otros componentes como se define a continuación.

Ej.	Anakinra mg/ml	Tampón	NaCl mg/mL	Osmolito	Turbidez (NTU)				
					Inicio	2 días	5 días	7 días	14 días
43	25	HEPES 10 mM	2,24	Prolina 22,1 mg/ml	4,12	4,64	5,94	7,44	10,8
44	25	HEPES 10 mM	2,24	Hidroxiprolina 25,2 mg /ml	2,29	11,6	15,6	18,7	18,5
45	25	HEPES 10 mM	2,24	Taurina 24,0 mg /ml	2,25	3,36	4,84	6,37	7,93
46	25	HEPES 10 mM	2,24	Manitol 35,0 mg /ml	2,78	3,9	5,78	6,48	10,1
47	10	HEPES 10 mM	2,24	Prolina 22,1 mg/ml	1,34	2,88	3,74	5,53	7,1
48	10	HEPES 10 mM	2,24	Hidroxiprolina 25,2 mg /ml	1,48	10,3	15,2	19	19
49	10	HEPES 10 mM	2,24	Taurina 24,0 mg /ml	1,39	2,69	4,07	4,26	5,54
50	10	HEPES 10 mM	2,24	Manitol 35,0 mg /ml	1,85	3,47	5,09	5,83	7,73
51	2	HEPES 10 mM	2,24	Prolina 22,1 mg/ml	1,2	3,69	4,53	4,73	7,2
52	2	HEPES 10 mM	2,24	Hidroxiprolina 25,2 mg /ml	0,69	15,6	20,4	21,4	22,2
53	2	HEPES 10 mM	2,24	Taurina 24,0 mg /ml	0,99	1,93	3,05	3,49	4,22
54	2	HEPES 10 mM	2,24	Manitol 35,0 mg /ml	0,96	4	5,72	6,42	9,47

5

Como puede apreciarse en la tabla 5, las composiciones de anakinra en el tampón de HEPES que comprende los osmolitos taurina, prolina y manitol mostraron los mejores resultados en términos de turbidez después de 14 días de almacenamiento. Las composiciones que incluyen el osmolito taurina mostraron resultados superiores que las composiciones que incluyen cualquiera de los otros osmolitos.

10 Ejemplo 4

Composiciones que comprenden anakinra en tampón de citrato, y al menos un osmolito

Preparación

15 La solución madre de anakinra congelada se descongeló y se diluyó con citrato de sodio 10 mM, 2,24 mg/ml de NaCl, EDTA 0,5 mM, polisorbato 80 1 mg/ml, pH 6,5 y varios osmolitos. La concentración de los osmolitos varió para obtener composiciones isotónicas (aproximadamente 300 mOsmol/kg). La dilución dio lugar a composiciones según se divulga en la tabla 6 dada a continuación.

El material diluido se almacenó en tubos de vidrio a 30 °C y se analizó a intervalos regulares durante 8 semanas

de almacenamiento.

Tabla 6: Turbidez de las composiciones de anakinra en tampón de citrato de sodio 10 mM, 1 mg/ml de PS80, 2,24 mg/ml de NaCl, 0,19 mg/ml de EDTA y los componentes que se definen a continuación.

Ej.	Anakinra mg/ml	Osmolito	Turbidez (NTU)			
			Inicio	2 semanas	4 semanas	8 semanas
55	25	Prolina 22,1 mg/ml	1,75	3,89	4,51	6,5
56	25	Hidroxiprolina 25,2 mg /ml	1,85	4,33	4,4	6,49
57	25	Taurina 24,0 mg /ml	1,72	3,44	4,83	5,54
58	25	Manitol 35,0 mg /ml	1,76	4,26	4,21	5,49
59	25	Mioinositol 34,6 mg /ml	1,9	5,75	6,75	7,89
60	25	Metionina 28,6 mg /ml	1,72	3,53	3,55	5,8
61	25	Sacarosa 66,7 mg /ml	1,69	5,36	7,16	39,1
62	15	Prolina 22,1 mg/ml	1,35	2,97	3,37	4,74
63	15	Hidroxiprolina 25,2 mg /ml	1,23	3,82	3,74	5,66
64	15	Taurina 24,0 mg /ml	1,26	1,69	3,21	4,18
65	15	Manitol 35,0 mg /ml	1,24	3,55	3,5	3,52
66	15	Mioinositol 34,6 mg /ml	1,9	4,36	5,42	7,09
67	15	Metionina 28,6 mg /ml	1,36	3,28	3,51	4,86
68	15	Sacarosa 66,7 mg /ml	1,56	4,41	7,42	21,6
69	2	Prolina 22,1 mg/ml	0,629	2,98	3,17	3,27
70	2	Hidroxiprolina 25,2 mg /ml	0,74	2,62	4,04	3,98
71	2	Taurina 24,0 mg /ml	0,588	1,12	1,69	2,81
72	2	Manitol 35,0 mg /ml	0,625	2,35	3,62	3,84
73	2	Mioinositol 34,6 mg /ml	0,616	3,71	4,01	5,38
74	2	Metionina 28,6 mg /ml	0,627	0,914	2,88	2,82
75	2	Sacarosa 66,7 mg /ml	0,682	3,38	5,81	14,1

- 5 Para las composiciones de anakinra que comprenden tampón de citrato, los osmolitos seleccionados proporcionaron algún efecto estabilizante, según el osmolito específico y la relación de uno con otro, y lo más notable, a concentración proteínica baja. Los osmolitos seleccionados son taurina, manitol, prolina, metionina e hidroxiprolina. Los osmolitos como por ej., mioinositol o sacarosa no proporcionaron un efecto estabilizante.

Ejemplo 5

- 10 **Composiciones que comprenden anakinra en una mezcla de tampón de HEPES y tampón de citrato, y al menos un osmolito**

Preparación

La solución madre de anakinra se diluyó hasta concentraciones de anakinra de 2, 15 y 25 mg/ml con una solución que consiste en HEPES 10 mM, 2,24 mg/ml de NaCl, EDTA 0,5 mM, polisorbato 80, 1 mg/ml, pH 6,5 y varios osmolitos.

- 5 La concentración de los osmolitos varió para obtener composiciones isotónicas (300 mOsmol/kg). Las composiciones resultantes contenían residuos de citrato de sodio a 0,1, 0,7 y 1,1 mM, respectivamente para los 25, 15 y 2 mg/ml de concentraciones de anakinra. La dilución dio lugar a composiciones que se presentan en la tabla 7.

- 10 El material diluido se almacenó en tubos de vidrio a 30 °C y se analizó a intervalos regulares durante 8 semanas de almacenamiento.

Tabla 7: Turbidez de las composiciones de anakinra que comprenden 2,24 mg/ml de NaCl, 0,19 mg/ml de EDTA, 1 mg/ml de PS80, y los componentes que se definen a continuación.

Ej.	Anakinra mg/ml	Tampón	Osmolito	Turbidez (NTU)			
				Inicio	2 semanas	4 semanas	8 semanas
76	25	HEPES 10 Mm + Citrato 1,1 mM	Prolina 22,1 mg/ml	1,88	3,98	5,53	8,57
77	25		Hidroxiprolina 25,2 mg /ml	2	2,68	4,29	5,53
78	25		Taurina 24,0 mg /ml	1,91	4,23	5,41	7,31
79	25		Manitol 35,0 mg /ml	1,94	3,74	4,79	4,93
80	25		Mioinositol 34,6 mg /ml	2,22	6,77	8,3	13,2
80	25		Metionina 28,6 mg /ml	1,84	2,85	3,93	5,09
81	25		Sacarosa 66,7 mg /ml	2,01	4,79	8,55	28
82	15	HEPES 10 mM + citrato 0,7 mM	Prolina 22,1 mg/ml	1,48	2,79	4,14	5,29
83	15		Hidroxiprolina 25,2 mg /ml	1,35	1,93	3,36	4,41
84	15		Taurina 24,0 mg /ml	1,36	1,57	2,23	4,44
85	15		Manitol 35,0 mg /ml	1,37	1,66	1,83	2,54
86	15		Mioinositol 34,6 mg /ml	1,38	4,64	4,96	16,5
87	15		Metionina 28,6 mg /ml	1,22	1,47	1,33	1,34
88	15		Sacarosa 66,7 mg /ml	1,37	4,75	9,99	15,3
89	2	HEPES 10 mM +	Prolina 22,1 mg/ml	0,726	0,827	2,69	3,55
90	2		Hidroxiprolina 25,2 mg /ml	1,22	0,873	3,25	3,45
91	2		Taurina 24,0 mg /ml	0,71	0,663	0,692	1,17
92	2		Manitol 35,0 mg /ml	0,709	0,692	1,73	2,6

Ej.	Anakinra mg/ml	Tampón	Osmolito	Turbidez (NTU)			
93	2	citrato 0,1 mM	Mioinositol 34,6 mg /ml	0,732	2,07	4,57	6,85
94	2		Metionina 28,6 mg /ml	0,653	0,642	1,12	0,684
95	2		Sacarosa 66,7 mg /ml	0,948	0,809	2,32	10,1

5 Los resultados confirmaron el efecto estabilizante que se observó previamente de los osmolitos, esta vez en una combinación de tampón de HEPES y tampón de citrato. Los osmolitos prolina, hidroxiprolina, taurina, manitol y metionina mostraron efectos similares sobre la turbidez de 2-25 mg/ml de soluciones de anakinra en composiciones de tampón de HEPES/citrato. Otros osmolitos como por ej., sacarosa o mioinositol no proporcionaron protección de anakinra según se exhibió en el gran aumento de turbidez después del almacenamiento.

Ejemplo 6

Estudio de tolerabilidad

10 Las composiciones de reserva de anakinra congeladas (en tampón de citrato con NaCl y EDTA) se descongelaron, se alicuotaron y se diluyeron con composiciones de reserva de HEPES / NaCl / EDTA / PS80 y varios osmolitos. Las concentraciones de los osmolitos variaron para obtener isotonicidad (280-320 mOsmol/kg) en las composiciones finales, salvo para la composición hipotónica «K» que tiene una osmolalidad de 200-250 mOsmol/kg. Las composiciones que se ensayaron se presentan en la tabla 8.

15 Tabla 8 Composiciones que se ensayaron para tolerancia local

Ítem de prueba	NaCl mg/ml	PS80 mg/ml	Dihidrato EDTA disódico mg/ml	HEPES mM	Na-citrato mM	Anakinra mg/ml	Osmolito mg/ml
A	2,24	1	0,19	10	aprox. 1	0	Taurina 24,0
B	2,24	1	0,19	10	aprox. 1	0	Prolina 21,1
C	2,24	1	0,19	10	aprox. 1	0	Hidroxiprolina 25,2
D	2,24	1	0,19	10	aprox. 1	0	Manitol 35,0
E	2,24	1	0,19	10	aprox. 1	0	Metionina 28,6
F	2,24	1	0,19	10	aprox. 1	25	Taurina 24,0
G	2,24	1	0,19	10	aprox. 1	25	Prolina 22,1
H	2,24	1	0,19	10	aprox. 1	25	Hidroxiprolina 25,2
I	2,24	1	0,19	10	aprox. 1	25	Manitol 35,0
J	2,24	1	0,19	10	aprox. 1	25	Metionina 28,6
K	2,24	1	0,19	10	aprox. 1	25	Taurina 15,0

20 Conejos albino de la cepa NZW Nueva Zelanda, de cualquier género, se dividieron en grupos de tres (3). Cada grupo se ensayó con una formulación (ítem de prueba, tabla 8). La prueba se realizó por instilación de 50 ml de la respectiva formulación en el ojo derecho. Las instalaciones se realizaron durante cinco (5) días, diariamente según se describe a continuación. Todas las instilaciones se realizaron durante un periodo de 8 horas cada día.

1° día: cinco (5) instilaciones de 50 µl en los ojos derechos dentro de 20 min.

2° día: dos veces al día 50 µl de instilaciones en el ojo derecho.

3° día: cuatro veces al día instilaciones de 50 µl en los ojos derechos.

4° día: seis veces al día instilaciones de 50 µl en los ojos derechos.

5° día: ocho veces al día instilaciones de 50 µl en los ojos derechos.

5 La evaluación del estudio se realizó mediante observaciones oculares diarias mediante el uso del sistema de puntuación Draize (Draize JH, Woodgard G and Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1944; 82: 377-390). Las observaciones se realizaron en ambos ojos.

10 1° día: Sistema de puntuación Draize con un oftalmoscopio: en la prueba previa, justo después de la primera administración, posteriormente 0.5 h, 1 h y 4 hs después de la última administración del 2° al 5° día: Sistema de puntuación Draize con un oftalmoscopio: dos veces al día antes de la primera y después de la última administración del día.

Resultados

Todas las composiciones fueron bien toleradas, en general, cuando se instilaron sobre el ojo, según se resume en la tabla 9 dada a continuación.

15 Se realizaron observaciones del enrojecimiento de la conjuntiva en una ocasión después de la instilación inicial en un animal por cada composición para las composiciones con prolina, hidroxiprolina y manitol. Este enrojecimiento fue transitorio y no se halló durante las instilaciones repetidas. Uno de los animales que se instiló con metionina (ítem de prueba E) mostró señales de opacidad de la córnea, lo cual representa, con mayor probabilidad, un trauma de la córnea que no estaba relacionado con el tratamiento. Se llegó a la conclusión de
20 que todas las composiciones que se ensayaron, pueden ser administradas por vía ocular sin ningún efecto de intolerancia grave. Además, la composición hipotónica «K», que tiene una osmolalidad de 200-250 mOsmol/kg, no proporcionó observaciones anormales.

Tabla 9: Resultados de la prueba de tolerancia local

Grupo	Ítem de prueba	Osmolito	anakinra mg/ml	Prueba de Draize Observaciones anormales (número de observaciones / número de animales tratados)	Comentarios
1	A	Taurina	0	0/3	-
2	B	Prolina	0	0/3	-
3	C	Hidroxiprolina	0	1/3	Enrojecimiento de la conjuntiva en una ocasión
4	D	Manitol	0	1/3	Enrojecimiento de la conjuntiva en una ocasión
5	E	Metionina	0	1/3	Opacidad de la córnea que aparece el día 3 y 5
7	G	Taurina	25	0/3	-
8	H	Prolina	25	1/3	Enrojecimiento de la conjuntiva en una ocasión
9	I	Hidroxiprolina	25	0/3	-
10	J	Manitol	25	0/3	-
11	K	Metionina	25	0/3	-
13	M	Hipotónica	25	0/3	-

Estabilidad de anakinra en diferentes concentraciones de HEPES con o sin osmolitos a 35 °C**Preparación**

- 5 La solución madre de anakinra congelada se descongeló, se diluyó hasta 50 mg/ml de anakinra y se dializó durante un total de -18 horas (durante toda la noche) a 2-8°C contra una solución de HEPES 10, 25 o 50 mM, NaCl 38,2 mM, a pH 6,5. Las soluciones resultantes se alicuotaron y se diluyeron con diferentes soluciones de HEPES / NaCl / osmolitos para dar las composiciones finales, como se describe en la tabla 10 dada a continuación. La concentración de los osmolitos varió para obtener composiciones isotónicas (aproximadamente 280 mOsmol/kg). Estas soluciones se utilizaron para los experimentos en los ejemplos 7, 8 y 9, dados a continuación.
- 10 Tabla 10: Composiciones finales de anakinra después de la dilución con soluciones de reserva Todas las composiciones contenían 2,23 mg/ml de NaCl y tuvieron un pH de 6,5. Las concentraciones de taurina e hidroxiprolina variaron para obtener soluciones isotónicas, a menos que se denote lo contrario en la tabla. Las muestras con citrato 10 mM también contenían EDTA 0,5 mM.

Ej.	Descripción	Anakinra mg/ml	Tampón	Concentración de osmolito (mg/ml)
96	2 mg/ml de anakinra citrato control	2	Citrato 10 mM	Ninguno
97	2 mg/mL anakinra 10 mM HEPES + taurina	2	HEPES 10 mM	24,65 mg /ml de taurina
98	2 mg/mL anakinra 25 mM HEPES + taurina	2	HEPES 25 mM	22,40 mg /ml de taurina
99	2 mg/mL anakinra 50 mM HEPES + taurina	2	HEPES 50 mM	19,27 mg /ml de taurina
100	2 mg/mL anakinra 10 mM HEPES + hidroxiprolina	2	HEPES 10 mM	25,87 mg /ml de hidroxiprolina
101	2 mg/mL anakinra 25 mM HEPES + hidroxiprolina	2	25 mM HEPES	23,50 mg /ml de hidroxiprolina
102	2 mg/mL anakinra 50 mM HEPES + hidroxiprolina	2	50 mM HEPES	20,22 mg /ml de hidroxiprolina
103	15 mg/ml de anakinra citrato control	15	10 mM de citrato	Ninguno
104	15 mg/mL anakinra 10 mM HEPES + taurina	15	10 mM HEPES	24,65 mg /ml de taurina
105	15 mg/mL anakinra 25 mM HEPES + taurina	15	25 mM HEPES	22,40 mg /ml de taurina
106	15 mg/mL anakinra 50 mM HEPES + taurina	15	HEPES 50 mM	19,27 mg /ml de taurina
107	15 mg/mL anakinra 10 mM HEPES + hidroxiprolina	15	HEPES 10 mM	25,87 mg /ml de hidroxiprolina
108	15 mg/mL anakinra 25 mM HEPES + hidroxiprolina	15	HEPES 25 mM	23,50 mg /ml de hidroxiprolina

Ej.	Descripción	Anakinra mg/ml	Tampón	Concentración de osmolito (mg/ml)
109	15 mg/mL anakinra 50 mM HEPES + hidroxiprolina	15	HEPES 50 mM	20,22 mg /ml de hidroxiprolina
110	25 mg/ml de anakinra citrato control	25	Citrato 10 mM	Ninguno
111	25 mg/mL anakinra 10 mM HEPES + taurina	25	HEPES 10 mM	24,65 mg /ml de taurina
112	25 mg/mL anakinra 25 mM HEPES + taurina	25	HEPES 25 mM	22,40 mg /ml de taurina
113	25 mg/mL anakinra 50 mM HEPES + taurina	25	HEPES 50 mM	19,27 mg /ml de taurina
114	25 mg /ml de anakinra 10 mM HEPES +hidroxiprolina	25	HEPES 10 mM	25,87 mg /ml de hidroxiprolina
115	25 mg /ml de anakinra 25 mM HEPES +hidroxiprolina	25	HEPES 25 mM	23,50 mg /ml de hidroxiprolina
116	25 mg /ml de anakinra 50 mM HEPES hidroxiprolina	25	50 mM HEPES	20,22 mg /ml de hidroxiprolina
117	15 mg/mL anakinra 10 mM HEPES NaCl	15	HEPES 10 mM	Ninguno
118	15 mg /ml de anakinra 10 mM HEPES mezcla de osmolitos	15	HEPES 10 mM	12,14 mg/ml / 12,74 mg/ml de hidroxiprolina.

Las soluciones con 2, 15 y 25 mg/ml de anakinra en tampón de HEPES de tres concentraciones diferentes y, opcionalmente, con uno de dos osmolitos se prepararon como se describe en la tabla 10 anterior. También se prepararon muestras control a las mismas concentraciones de anakinra pero se formularon en tampón de citrato. Las soluciones preparadas se almacenaron en tubos de vidrio a 35 °C y se analizaron a intervalos regulares durante 8 semanas, mediante medición del contenido de monómero de anakinra. Los resultados analíticos se divulgan en la tabla 11 y para la concentración proteínica 25 mg/ml en la figura 1.

Tabla 11: Contenido de monómero en % determinado por SEC-HPLC, como se describió anteriormente, en 2, 15 y 25 mg/ml de composiciones de anakinra en tampones de citrato o HEPES 10 mM de diferentes concentraciones. El tampón de citrato también contenía 2,24 mg/ml de NaCl y EDTA 0,19 mg/ml (0,5 mM). Las muestras de HEPES se formularon, opcionalmente, con uno de dos osmolitos diferentes. Las concentraciones de osmolitos se presentan en la tabla 10 dada a continuación.

Ej.	Anakinra (mg/ml)	Tampón	Osmolito	Contenido de monómero (%)			
				Inicio	2 semanas	4 semanas	8 semanas
96	2	Citrato 10 mM	No	99,67	99,52	99,49	98,76

ES 2 744 605 T3

Ej.	Anakinra (mg/ml)	Tampón	Osmolito	Contenido de monómero (%)			
				Inicio	2 semanas	4 semanas	8 semanas
97	2	HEPES 10 mM	Taurina	99,53	99,52	99,64	99,46
98	2	HEPES 25 mM	Taurina	97,76	99,42	99,35	99,46
99	2	HEPES 50 mM	Taurina	99,34	99,27	99,29	99,32
100	2	HEPES 10 mM	Hidroxiprolina	99,47	99,44	99,19	99,07
101	2	HEPES 25 mM	Hidroxiprolina	99,38	99,26	99,22	99,12
102	2	HEPES 50 mM	Hidroxiprolina	99,56	98,60	98,40	98,69
103	15	Citrato 10 mM	Ninguno	99,76	99,44	98,99	97,98
104	15	HEPES 10 mM	Taurina	99,71	99,15	99,26	98,81
105	15	HEPES 25 mM	Taurina	99,73	99,57	99,30	98,86
106	15	HEPES 50 mM	Taurina	99,77	99,49	99,16	98,66
107	15	HEPES 10 mM	Hidroxiprolina	99,75	99,52	99,40	98,88
108	15	HEPES 25 mM	Hidroxiprolina	99,74	99,60	99,40	99,02
109	15	HEPES 50 mM	Hidroxiprolina	99,03	99,56	98,83	98,88
110	25	Citrato 10 mM	Ninguno	99,55	99,14	98,37	96,78
111	25	HEPES 10 mM	Taurina	99,67	99,18	99,07	98,21
112	25	HEPES 25 mM	Taurina	99,72	99,37	98,94	98,12
113	25	HEPES 50 mM	Taurina	99,73	99,36	99,09	98,23
114	25	HEPES 10 mM	Hidroxiprolina	99,05	99,40	99,03	98,22
115	25	HEPES 25 mM	Hidroxiprolina	99,73	99,44	99,17	98,40
116	25	HEPES 50 mM	Hidroxiprolina	99,73	99,41	99,11	98,37
117	15	HEPES 10 mM	Ninguno	99,62	99,42	99,10	98,20
118	15	HEPES 10 mM	Taurina / hidroxiprolina	99,76	99,54	99,34	98,38

Conclusiones

Los resultados analíticos en la tabla 11 y en la figura 1 muestran que la disminución en el contenido de monómero fue más grande para la muestra con tampón de citrato. Las muestras con tampón de HEPES muestran una disminución comparativamente más pequeña en el contenido de monómero. La variación de la concentración de HEPES en el intervalo de 10 a 50 mM no afectó la estabilidad de anakinra.

Ejemplo 8

Estabilidad de anakinra en diferentes concentraciones en HEPES con osmolitos a 35 °C

Preparación

Las soluciones con 2, 15 y 25 mg/ml de anakinra en tampón de HEPES y osmolitos se prepararon como se describe en el ejemplo 7 y en la tabla 10 anterior. También se prepararon muestras control a las mismas concentraciones de anakinra pero se formularon en tampón de citrato.

Las soluciones preparadas se almacenaron en tubos de vidrio a 35 °C y se analizaron a intervalos durante 8 semanas. Los resultados analíticos se divulgan en la tabla 12 y para la concentración proteínica de 2, 15 y 25 mg/ml en la figura 2.

Tabla 12: Contenido de monómero en % de anakinra determinado por SEC-HPLC, como se describió anteriormente, en las composiciones de anakinra en tampones de citrato o HEPES. El tampón de citrato de sodio 10 mM contenía 2,24 mg/ml de NaCl, 0,19 mg/ml de EDTA (0,5 mM). El tampón de HEPES contenía los componentes que se definen a continuación. Las concentraciones de osmolitos se presentan en la tabla 10 anterior.

Ej.	Anakinra (mg/ml)	Tampón (10 mM)	Osmolito	Contenido de monómero (%)			
				Inicio	2 semanas	4 semanas	8 semanas
96	2	Citrato	Ninguno	99,67	99,52	99,49	98,76
97	2	HEPES	Taurina	99,53	99,52	99,64	99,46
100	2	HEPES	Hidroxiprolina	99,47	99,44	99,19	99,07
103	15	Citrato	Ninguno	99,76	99,44	98,99	97,98
104	15	HEPES	Taurina	99,71	99,15	99,26	98,81
107	15	HEPES	Hidroxiprolina	99,75	99,52	99,40	98,88
110	25	Citrato	Ninguno	99,55	99,14	98,37	96,78
111	25	HEPES	Taurina	99,67	99,18	99,07	98,21
114	25	HEPES	Hidroxiprolina	99,05	99,40	99,03	98,22

Conclusiones

Los resultados analíticos en la tabla 12 y en la figura 2 muestran que la disminución en el contenido de monómero fue más grande para la muestra con tampón de citrato. Las muestras con tampón de HEPES muestran una disminución comparativamente más pequeña en el contenido de monómero que esas muestras que contenían tampón de citrato. Los dos osmolitos taurina o hidroxiprolina mostraron efectos estabilizantes similares.

Ejemplo 9

Estabilidad de anakinra en composiciones de HEPES con o sin osmolitos a 35 °C

Las soluciones con 15 mg/ml de anakinra en tampón de HEPES y osmolitos se prepararon como se describe en el ejemplo 7 y en la tabla 10 anterior. También se prepararon muestras control a las mismas concentraciones de anakinra pero se formularon en tampón de citrato.

Las soluciones preparadas que contienen anakinra 15 mg/ml se formularon en HEPES 10 mM con o sin

osmolitos o en tampón de citrato 10 mM sin osmolitos, se almacenaron en tubos de vidrio a 35 °C y se analizaron a intervalos regulares durante 8 semanas de almacenamiento. Los resultados analíticos se divulgan en la tabla 13 y en la figura 3.

- 5 Tabla 13: Contenido de monómero en % determinado por SEC-HPLC, como se describió anteriormente, en 15 mg/ml de composiciones de anakinra en tampones de citrato o HEPES 10 mM. El tampón de citrato también contenía 2,24 mg/ml de NaCl y 0,19 mg/ml de EDTA (0,5 mM). Las muestras de HEPES se formularon con o sin osmolitos. Las concentraciones de osmolitos se presentan en la tabla 10 anterior.

Ej.	Anakinra (mg/ml)	Tampón	Osmolito	Contenido de monómero (%)			
				Inicio	2 semanas	4 semanas	8 semanas
103	15	citrato	No	99,76	99,44	98,99	97,98
104	15	HEPES	Taurina	99,71	99,15	99,26	98,81
107	15	HEPES	Hidroxiprolina	99,75	99,52	99,40	98,88
117	15	HEPES	No	99,62	99,42	99,10	98,20
118	15	HEPES	Taurina / hidroxiprolina	99,76	99,54	99,34	98,38

Conclusiones

- 10 Los resultados analíticos en la tabla 13 y en la figura 3 muestran que la disminución en el contenido de monómero fue más grande para el experimento 103 que contiene citrato pero sin HEPES u osmolitos. Los otros experimentos mostraron una disminución en el orden 117, 118 > 104, 107. Para los experimentos sin osmolitos, el tampón de HEPES genera menos disminución del monómero de anakinra que el tampón de citrato. En todos
- 15 los experimentos donde se incluyen HEPES y uno o dos osmolitos, la disminución en el contenido de monómero es inferior que para los experimentos con HEPES sin ningún osmolito.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
0,01 mg/ml hasta 30 mg/ml de anakinra;
tampón, que se selecciona de HEPES y una mezcla de HEPES y citrato de sodio; y
5 opcionalmente al menos un osmolito.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, al menos, un osmolito.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho tampón es tampón de HEPES.
4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho tampón estabiliza el pH de la composición a un pH de desde 6 a 7, preferiblemente a aproximadamente 6,5.
- 10 5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende 2 mg/ml hasta 30 mg/ml de anakinra.
6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho, al menos, un osmolito se selecciona de taurina e hidroxiprolina.
- 15 7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además uno o más de un agente quelante, un tensioactivo y un regulador de la tonicidad.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho agente quelante es EDTA, dicho tensioactivo es polisorbato 80 y dicho regulador de la tonicidad es NaCl.
9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la concentración de dicho osmolito se ajusta para proporcionar una composición isotónica, que tiene opcionalmente una osmolalidad de desde 280 hasta 320 mOsmol/kg.
- 20 10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la concentración de dicho osmolito se ajusta para proporcionar una composición hipotónica, que tiene opcionalmente una osmolalidad de desde 150 hasta 280 mOsmol/kg.
11. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
25 2 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
Tampón HEPES 5 mM hasta 50 mM, en donde dicho tampón estabiliza el pH de la composición a un pH de desde 6 hasta 7; y
1 mg/ml hasta 100 mg/ml de un osmolito que se selecciona de taurina e hidroxiprolina.
12. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
30 2 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra;
Tampón HEPES 5 mM hasta 50 mM, en donde dicho tampón estabiliza el pH de la composición en un pH de desde 6 hasta 7;
1 mg/ml hasta 100 mg/ml de un osmolito que se selecciona de taurina, prolina, hidroxiprolina, manitol y metionina;
35 EDTA 0,05 mM hasta 1 mM;
0,01 % hasta 1 % de polisorbato 80; y
0,1 mg/ml hasta 5 mg/ml de NaCl;

13. La composición de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en la que dicho tampón es 10 mM de tampón de HEPES, el cual estabiliza el pH de la composición en aproximadamente 6,5.
14. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicho al menos un osmolito representa 15 mg/ml hasta 40 mg/ml de taurina, preferiblemente 20 mg/ml hasta 40 mg/ml.
- 5 15. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicho, al menos, un osmolito representa 20 mg/ml hasta 40 mg/ml de hidroxiprolina.
16. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende
5 mg/ml hasta 25 mg/ml de anakinra, preferiblemente desde aproximadamente 15 mg/ml hasta aproximadamente 25 mg/ml de anakinra;
- 10 Tampón HEPES 10 mM, el cual estabiliza el pH de la composición a aproximadamente 6,5; y
aproximadamente 30 mg/ml de taurina.
17. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en el tratamiento, en donde dicha composición se administra por vía tópica, como por ej., por vía tópica al ojo.
- 15 18. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en el tratamiento de un trastorno oftálmico.
19. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en el tratamiento de un trastorno ocular inflamatorio.
- 20 20. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con la IL-1 oftálmica.
- 25 21. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en el tratamiento del síndrome de Sjögren primario o secundario, síndrome de no-Sjögren, trastornos del ojo seco, queratitis sicca, síndrome sicca, xeroftalmia, trastorno de la película lagrimal, disminución de la producción de lágrimas, deficiencia acuosa de las lágrimas, ojo seco vinculado con la enfermedad del injerto contra huésped, disfunción de glándulas de Meibomio, afecciones inflamatorias de la superficie ocular de la córnea, neovascularización de la córnea, queratitis, cicatrización de heridas en la córnea, trasplante de córnea/queratoplastia, cirugía de implante de queratoprótesis, trasplante lamelar, trasplante endotelial selectivo, trastornos por cicatrización conjuntival, conjuntivitis alérgica, síndrome penfigoide, síndrome de Stevens-Johnson, oftalmia simpática, síndrome de Vogt-Koyanagi Harada (VKH), coriorretinopatía de Birdshot, penfigoide ocular cicatricial, iridociclitis heterocromática de Fuchs, retinopatía diabética, edema macular diabético, enfermedad ocular tiroidea, ectropión/entropión, alergia a los lentes de contacto y enfermedad del ojo seco.
- 30 22. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en el tratamiento de conjuntivitis alérgica.
- 35 23. Un dispositivo de administración del medicamento que comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
24. El dispositivo de la reivindicación 23, que se selecciona de un recipiente de soplado, llenado y sellado, un recipiente de único uso y un recipiente de múltiples usos.

Figuras

Figura 1A

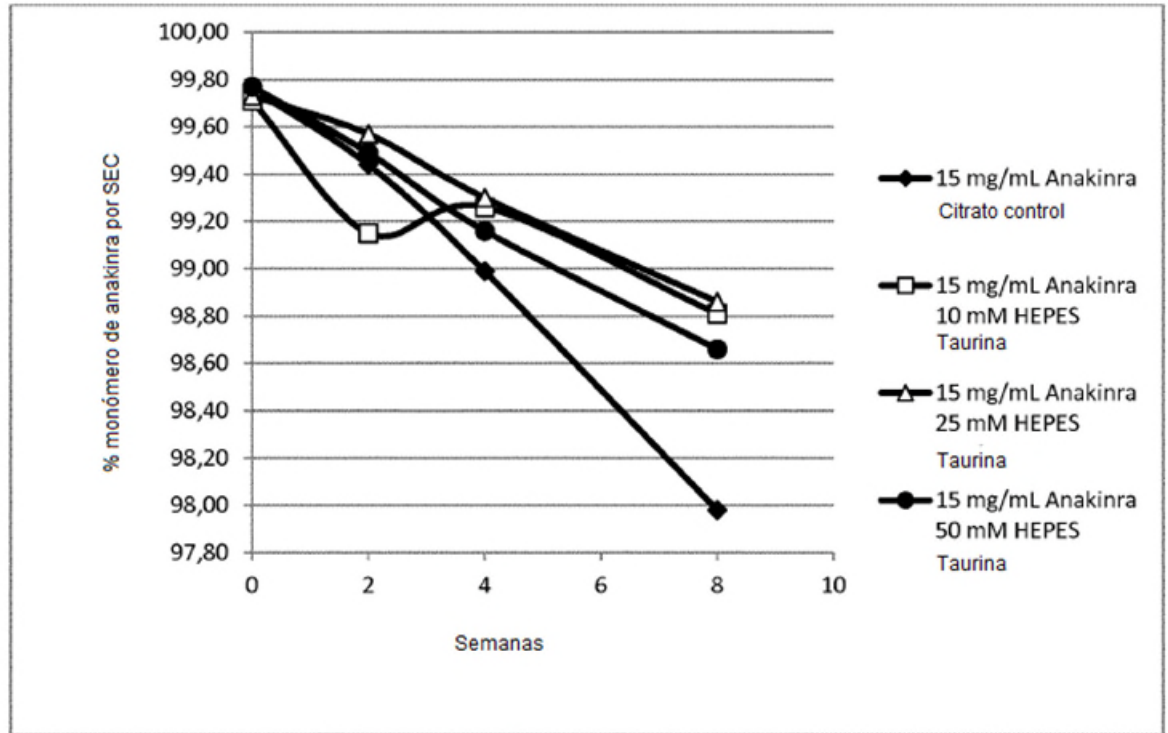


Figura 1B

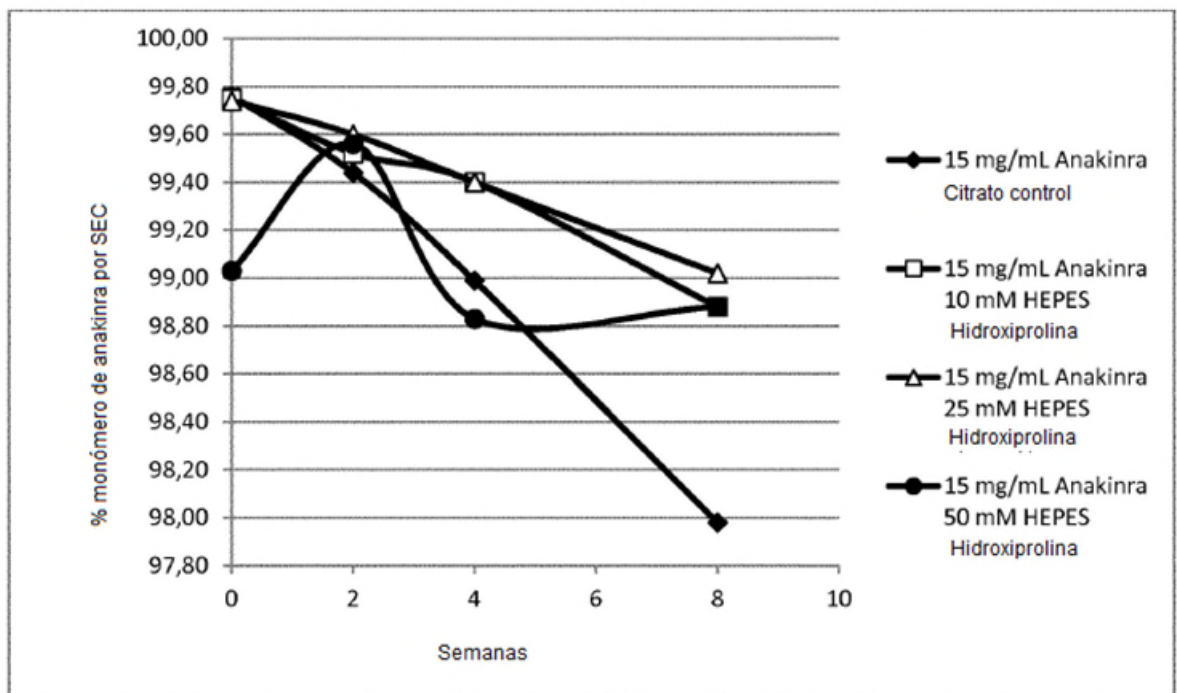


Figura 2

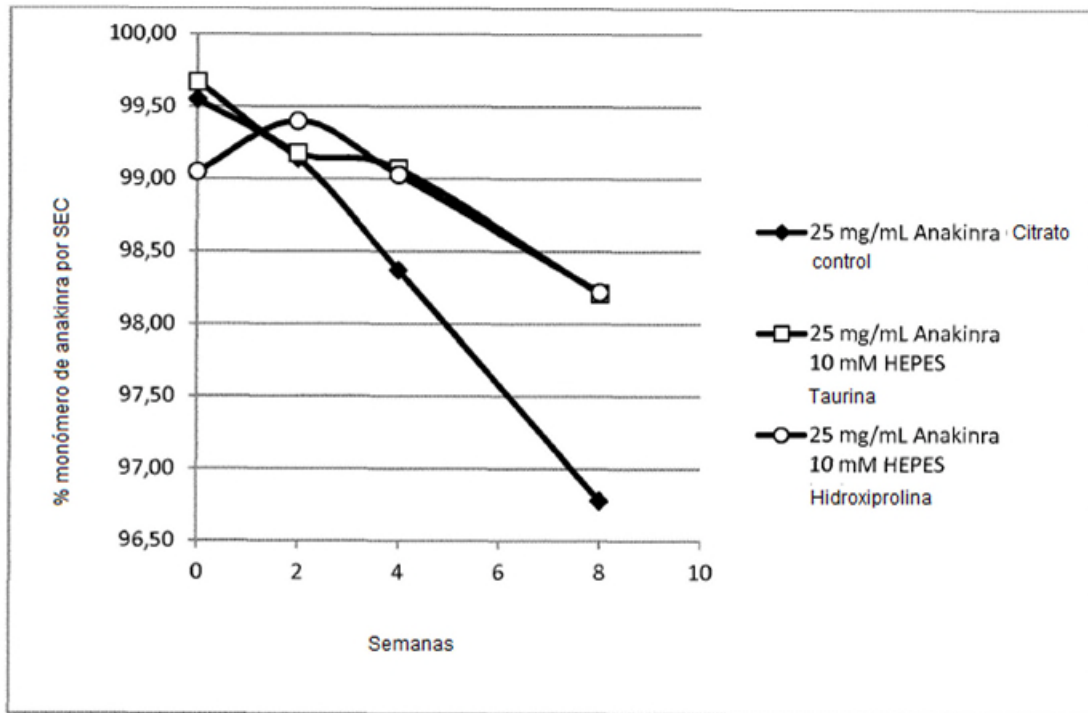


Figura 3

