

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de las ciencias biofarmacéuticas. En particular, se refiere a una composición liofilizada de pegaspargasa y a un proceso para la preparación de la misma.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La administración de fármacos proteicos sigue siendo un gran desafío para la industria biofarmacéutica debido a la inestabilidad inherente de las proteínas exhibidas *in vivo*. Mientras que las proteínas administradas por vía oral son susceptibles a su digestión en el tracto digestivo, las proteínas inyectadas parenteralmente generalmente se encuentran propensas a la eliminación renal y la proteólisis. Otros problemas que normalmente se asocian con fármacos proteicos son baja solubilidad, vida media circulante corta, inmunogenicidad, agregación, etc. Como resultado, la sostenibilidad de la proteína en el cuerpo se ve comprometida. Se han probado varios enfoques para lograr la sostenibilidad de las proteínas *in vivo*, como la alteración de la secuencia de aminoácidos para disminuir la inmunogenicidad y eliminar los sitios de escisión proteolíticos, la conjugación de proteínas a proteínas séricas, la fusión con anticuerpos, la incorporación en liposomas para liberación lenta, la conjugación con polímeros naturales o sintéticos, etc.

La conjugación de proteínas terapéuticas con polímeros como el polietilenglicol (PEG) se ha utilizado con éxito en las industrias biofarmacéuticas durante mucho tiempo y se acepta como una modificación segura de las proteínas para aumentar la vida media circulante, reducir la inmunogenicidad, y una divulgación en este sentido puede ser encontrada en el documento US 4.179.337. Este proceso de conjugación se denomina pegilación. El PEG ha sido clasificado por los organismos reguladores como el USFDA y la OMS en virtud de los compuestos "Generalmente reconocidos como seguros" (GRAS).

El PEG es un polímero lineal o ramificado y es soluble en agua (la solubilidad aumenta con el aumento del peso molecular), lipofílico y no tóxico. La propiedad

lipofílica del PEG lo hace apto para la funcionalización del grupo terminal para una rápida conjugación con proteínas terapéuticas. Cada molécula de PEG generalmente se une a 2-3 moléculas de agua por unidad de óxido de etileno. La pegilación, por lo tanto, enmascara la superficie de la proteína y aumenta el tamaño molecular del polipéptido, evitando así el acceso de anticuerpos o células procesadoras de antígenos y también reduce la degradación por enzimas proteolíticas, lo que resulta en un aumento de la vida media circulatoria. Además, el aumento de tamaño (debido al aumento de los radios hidrodinámicos) prolonga su tiempo circulatorio al reducir el aclaramiento renal.

En muchos tipos de células cancerosas, como las involucradas en la leucemia linfoblástica aguda (LLA), las células cancerosas no pueden sintetizar el aminoácido L-asparagina *de novo* (porque carecen o tienen niveles bajos de la enzima asparagina sintetasa, que cataliza la transformación enzimática del aminoácido L-aspartato en L-asparagina) y lo toma de la sangre para el crecimiento celular. La L-asparaginasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de L-asparagina a L-aspartato con la liberación de amoníaco. La L-asparaginasa agota los niveles de L-asparagina de la sangre, evitando así su absorción por las células cancerosas/ tumorales, lo que finalmente conduce a la muerte de las células. La L-asparaginasa se puede obtener de varias fuentes que incluyen bacterias, levaduras, hongos, actinomicetos y plantas. Es útil en el tratamiento de tumores o cánceres que dependen de la L-asparagina para la síntesis de proteínas. Se usa particularmente para el tratamiento de leucemias, como la leucemia linfoblástica aguda y se usa típicamente en combinación con otras terapias antitumorales o contra el cáncer, aunque se puede emplear solo en ciertas situaciones clínicas.

Sin embargo, L- asparaginasa en sí, sufre de las desventajas habituales de ser una proteína, tales como las de alta tasa de aclaramiento, una vida media corta, una degradación proteolítica y la posibilidad de inducir una respuesta inmunitaria de origen no humano en pacientes tratados con esta enzima. Estas deficiencias limitan el uso de esta enzima para tratamientos más prolongados o dosis repetidas. Como se discutió anteriormente, estos problemas pueden superarse mediante pegilación. La L-asparaginasa (de *E. coli*) se modifica conjugándola covalentemente con monometoxipolietilenglicol (mPEG) de 5 kDa. La pegaspargasa resultante tiene las

ventajas de ser sustancialmente no antigénica y exhibe una tasa reducida de eliminación de la circulación.

La pegaspargasa, generalmente presentada como una composición líquida en un paquete de 5 ml de concentración de 750 UI/ml, fue inicialmente aprobada para la indicación de leucemia linfoblástica aguda en pacientes que han desarrollado hipersensibilidad a las formas nativas de L-asparaginasa, por la FDA de EE. UU. en 1994 y se comercializó con la marca Oncaspar®. Posteriormente, en 2006, Oncaspar® obtuvo la aprobación para el tratamiento de primera línea de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) como un componente de un régimen de quimioterapia con múltiples fármacos. Oncaspar® se fabricó mediante pegilación de un monometoxipolietilenglicol (mPEG) succinimidil succinato PEG de 5 kDa (también denominado SS-PEG). La asparaginasa pegilada se describe los documentos de patente US 5.122.614; US 5.324.844; US 5.612.460; y en las solicitudes US20120100121A1 y CN105802946A.

A pesar de tener todas estas ventajas, se ha reportado que la composición líquida de la pegaspargasa tiene problemas como estabilidad térmica, requisitos estrictos para el mantenimiento de la cadena de frío, vida útil más corta, etc. Se ha reportado que las proteínas pegiladas, especialmente aquellas que están unidas con el conector succinato, tienden a degradarse en su composición líquida para dar como resultado PEG libre y proteína succinilada como resultado de la hidrólisis del enlace éster entre el PEG y el conector succinato en una composición acuosa. El acceso a tales fármacos críticos en la práctica clínica requiere composiciones que puedan almacenarse durante un período prolongado que también puedan mantener variaciones de temperatura durante la fabricación y durante la distribución a las clínicas.

La mayoría de las veces, los problemas de estabilidad asociados con las proteínas en la composición líquida pueden superarse presentándolas en una composición sólida.

La eliminación de agua a menudo resulta eficaz, ya que todas las principales reacciones de degradación (desamidación, hidrólisis, proteólisis, etc.) se producen en la solución acuosa. El método más común utilizado para la transformación de

líquido a sólido es el secado por congelación o la liofilización. La liofilización es un proceso que puede ayudar a estabilizar la pegaspargasa y superar los desafíos. Más de la mitad de los terapéuticos de origen biológico que se comercializan se presentan como composición liofilizada.

El ciclo de liofilización consta principalmente de tres pasos: congelación, secado primario y secado secundario con un paso de recocido opcional entre la congelación y el secado primario. El proceso de liofilización no está libre de estrés y no siempre garantiza una vida útil prolongada del producto biofarmacéutico. El estrés asociado con las etapas de liofilización puede causar degradaciones tanto físicas (desnaturalización, agregación, precipitación, etc.) como químicas (oxidación, reacción de Maillard, agregación covalente, etc.) de la proteína. Estas vías de degradación que eventualmente conducen a la pérdida de su bioactividad y no son mutuamente excluyentes, ya que a menudo una conduce a la otra y ambas vías de degradación están unidas de alguna manera.

El diseño de un ciclo de liofilización depende de la concentración de la proteína, la naturaleza y la cantidad de agentes de carga, estabilizadores y otros excipientes presentes en la composición. Parámetros térmicos importantes como la temperatura de transición vítrea aparente (T_g'), la temperatura de cristalización del agente de carga, etc., generalmente se determinan para las composiciones anteriores al diseño del proceso, ya que sirven punto como de orientación para configurar los parámetros de temperatura y presión para cada paso, incluyendo la rampa y el tiempo de residencia en cada etapa del ciclo de liofilización.

Las proteínas pegiladas presentan otras complejidades que deben abordarse para determinar el proceso de liofilización final, como el estado del PEG, si es amorfo o cristalino, la cantidad de agua libre disponible para la interacción, la temperatura de almacenamiento, los parámetros de liofilización, la proporción de proteína a PEG, todos influyen en la actividad de la proteína liofilizada después de la liofilización, y no existe una solución universal para todos los productos pegilados.

Por lo tanto, es importante elaborar un proceso y una composición únicos para cada proteína, ya que el proceso y la composición adecuados para una proteína pueden no ser efectivos para otra.

Los documentos de patente US 6.180.096 y US 7.632.491B2 describen una composición de interferón 2b pegilado con un ciclo de liofilización más largo y un alto contenido de humedad. El documento US 8.367.054 B2 describe una composición para Peg-interferón 2b con un ciclo de liofilización más corto. Estos documentos dan a conocer la importancia del proceso de liofilización y sugieren que hay un cambio en la calidad del producto basado en el ciclo de liofilización.

El documento CN105796507A describe una composición estable de pegaspargasa que contiene sorbitol, un agente protector, un agente regulador y un tensioactivo. Sin embargo, la composición aborda la estabilidad en forma líquida y la protección durante la congelación. Dicha solicitud falla en proporcionar una composición liofilizada estable.

El documento internacional PCT, WO2018017190, describe una composición liofilizada estable al almacenamiento, comprendiendo la composición una polialquilen óxido-asparaginasa que comprende un grupo polialquilen óxido unido covalentemente por un enlazador a L-asparaginasa; un amortiguador; una sal y un azúcar.

Sin embargo, el proceso revelado en WO'190 es largo (~ 5 días) y no es económico. Además, utiliza grandes cantidades de excipientes, lo que no se prefiere, ya que puede aumentar el costo de excipiente en un 50% y por lo tanto el costo del producto final.

La pegaspargasa se clasifica como un medicamento huérfano y tiene un precio elevado. Este proceso de preparación del producto estable al almacenamiento añade el costo de la liofilización, así como los excipientes adicionales que harán que el producto sea más costoso.

Por lo tanto, existe la necesidad de una composición óptima de pegaspargasa liofilizada estable al almacenamiento que mantenga la propiedad física y la actividad biológica durante su vida útil y un proceso de liofilización para dicha composición.

OBJETO DE LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición óptima liofilizada estable al almacenamiento que comprende pegaspargasa que exhibe estabilidad fisicoquímica y actividad biológica durante su vida útil y un proceso de liofilización para tal composición.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición óptima, liofilizada y estable al almacenamiento que comprende pegaspargasa que exhibe estabilidad fisicoquímica y actividad biológica durante su vida útil y un proceso de liofilización para tal composición.

La composición de la presente invención es estable durante períodos prolongados en un intervalo significativo de temperaturas, sin la presencia de ninguna cantidad significativa de impurezas/degradantes.

La presente invención también se refiere a un proceso de liofilización escalable y económicamente viable para la producción de la composición de pegaspargasa estable al almacenamiento.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa la estructura de la masa resultante para las composiciones dentro del alcance de la presente invención.

La Figura 2 muestra los datos analíticos que demuestran la integridad y pureza de la pegaspargasa, antes y después de la liofilización (Figura 2 (B)) según lo evaluado por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) y cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño (SE-HPLC) respectivamente.

La Figura 3 muestra los datos analíticos evaluados por electroforesis en gel de poliácridamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) comparando la estabilidad de la composición líquida de la técnica anterior de pegaspargasa (Figura 3 (A)) con la composición liofilizada de la presente invención (Figura 3 (B)).

La Figura 4 muestra los datos analíticos evaluados por electroforesis en gel de poliácridamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) que demuestra la presencia de

impurezas de alto peso molecular presentes en la composición liofilizada de pegaspargasa de la técnica anterior con la composición liofilizada de la presente invención mediante tinción de Coomassie (Figura 4 (A)), tinción con yodo (Figura 4 (B)). La Figura 4 (C) y la Figura 4 (D) muestran el análisis de Western Blot de las muestras contra el anticuerpo anti-asparaginasa y el anticuerpo anti-PEG respectivamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

COMPOSICIÓN

La presente invención proporciona una composición óptima, liofilizada y estable al almacenamiento que comprende pegaspargasa que exhibe estabilidad fisicoquímica y actividad biológica durante su vida útil y un proceso de liofilización para tal composición.

La composición liofilizada de la presente invención comprende como ingrediente activo pegaspargasa. La composición liofilizada de la presente invención comprende pegaspargasa, un crioprotector, un agente de carga, un amortiguador y puede contener opcionalmente otros excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen, pero no se limitan a, una sal.

La composición liofilizada de la presente invención comprende una asparaginasa pegilada que comprende un grupo óxido de polialquileno unido covalentemente por un enlazador a la asparaginasa.

La composición de la presente invención se basa en asparaginasa pegilada. La asparaginasa pegilada también conocida como pegaspargasa comprende un mono-metoxi polietilenglicol (mPEG) de peso molecular preferiblemente entre 4 y 6 kDa, más preferiblemente entre 4,5 y 5,5 kDa y más preferiblemente entre 4,8 y 5,2 kDa que está unido covalentemente por un conector succinato a través de un enlace amida a uno o más grupos de amina primaria (amina terminal y ϵ -aminoácido de la cadena lateral de lisina) de la L-asparaginasa.

La L-asparaginasa se puede obtener de forma natural a partir de *E. coli* u otras fuentes bacterianas como *Erwinia chrysanthemi* o mediante ingeniería genética en *E. coli* mediante tecnología recombinante.

La reacción de conjugación de mPEG y L-asparaginasa da como resultado la unión covalente de 1-12 mPEG por monómero de L-asparaginasa, preferiblemente entre 5 y 10 mPEG por monómero de L-asparaginasa, más preferiblemente entre 7 y 10 mPEG por monómero de L-asparaginasa y lo más preferiblemente entre 7 y 9 mPEG por monómero de L-asparaginasa.

La cantidad de pegaspargasa de la invención puede estar presente en una concentración (porcentaje en peso total) del 2 al 32% de la composición; más preferiblemente entre el 5 y el 20% y lo más preferiblemente entre el 6 y el 14%.

El proceso de liofilización aquí descrito es nuevo e inventivo en términos de la cantidad óptima de excipientes utilizados en el proceso. Los excipientes de la presente invención hacen que la composición de la presente invención sea fisicoquímicamente estable y biológicamente activa durante la vida útil. Los excipientes también permiten el diseño de un ciclo de liofilización corto y económico para obtener el producto de la presente invención. La composición de la presente invención que contiene pegaspargasa y excipientes como se establece en este documento es sinérgica.

La composición de la presente invención incluye un crioprotector. El crioprotector se puede seleccionar entre azúcar, poliol, polímero y aminoácido. Más preferiblemente, el crioprotector de la presente invención es azúcar. Lo más preferiblemente, el crioprotector es sacarosa. El crioprotector puede estar presente en un intervalo del 9 al 91% de la composición; más preferiblemente entre 20 y 60% y más preferiblemente entre 32 y 41% de la composición de la presente invención.

Sin estar limitado por la teoría, la composición de la presente invención prevé un crioprotector que puede servir tanto como crioprotector o como lioprotector para reducir la carga de los excipientes durante el ciclo. También puede servir como estabilizador.

La composición de la presente invención comprende un agente de carga. El agente de carga de la presente invención se selecciona del grupo que comprende azúcar,

poliol, polímero y aminoácido, preferiblemente el agente de carga es un aminoácido seleccionado del grupo que comprende glicina, histidina, arginina; preferiblemente, el aminoácido es glicina. El agente de carga de la invención puede estar presente en el intervalo del 1 al 78% de la composición; más preferiblemente entre 20 y 60% y más preferiblemente entre 38 y 50% de la composición de la presente invención.

La composición de la presente invención comprende un tampón. El tampón puede seleccionarse del grupo que comprende un tampón de fosfato tal como tampón de fosfato de sodio (dihidrogenofosfato de sodio - hidrogenofosfato de disodio) o regulador de fosfato de potasio (dihidrogenofosfato de potasio - hidrogenofosfato de dipotasio), TRIS, amortiguador de citrato; preferiblemente, la composición de la presente invención comprende un amortiguador de fosfato. El pH del producto antes de la liofilización y después de la reconstitución del producto liofilizado puede ser de 6 a 8. El tampón de la presente invención puede estar presente en el intervalo del 3 al 33% de la composición; más preferiblemente entre 3 y 5% y más preferiblemente entre 4 y 6% de la composición de la presente invención.

La composición de la presente invención puede comprender opcionalmente sal, seleccionada del grupo que comprende de cloruro de sodio, cloruro de potasio, preferiblemente cloruro de sodio. La cantidad de sal en la composición puede estar en el intervalo del 0 al 40%, preferiblemente del 0 al 10%, más preferiblemente del 0 al 0,5% de la composición de la presente invención. Sin estar limitado por la teoría, la composición de la presente invención se caracteriza porque comprende poca cantidad de sal o ninguna sal, es decir, la composición de la presente invención puede comprender una sal en una cantidad muy baja a diferencia de las composiciones de la técnica anterior y también puede estar libre de sal.

La composición de la presente invención tiene una osmolalidad preferiblemente en el intervalo de 250 a 600 mOsm/kg, más preferiblemente entre 250 y 500 mOsm/kg y lo más preferiblemente entre 250 y 450 mOsm/kg.

PROCESO DE LIOFILIZACIÓN

Se afirma que los procesos de liofilización son únicos para los excipientes y el ingrediente activo, y los procesos deben desarrollarse por separado para cada

composición. Además, los procesos de la técnica anterior son prolongados, utilizan una alta proporción de excipientes y no son económicos.

El proceso liofilizado de la presente invención formula el material farmacéutico activo de manera que el producto liofilizado obtenido tenga las siguientes características:

- a. La masa resultante no se pega al lateral del vial
- b. El contenido de humedad es constante
- c. Vida útil prolongada (a temperatura ambiente)
- d. Se disuelve fácilmente en su reconstitución, produce una solución clara
- e. La actividad de la proteína está intacta
- f. No hay alteración en la estructura de la proteína
- g. El pH se mantiene
- h. La solución reconstituida se encuentra dentro del rango de Osmolalidad aceptable para la administración parenteral

El ciclo de liofilización consta principalmente de tres pasos: congelación, secado primario y secado secundario con un paso de recocido opcional entre la congelación y el secado primario. Cada uno de estos pasos ha sido optimizado para la composición de la presente invención. Además, se prevé que el proceso, tal como se establece en el presente documento, también será aplicable a las composiciones similares que comprenden pegaspargasa como ingrediente activo.

El tiempo total del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 2880 min (48 h) a 5790 min (96,5 h), más preferiblemente de 3120 min (52 h) a 4980 min (83 h), más preferiblemente de 3120 min (52 h) a 4200 min (70 h). El proceso liofilizado en la presente invención incluye preferentemente una variación de la temperatura de -60 °C a 30 °C, más preferiblemente de -50 °C a 30 °C, preferiblemente de -40 °C a 25 °C. La variación de presión del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 0,037 Torr a 760 Torr.

PRE-LIOFILIZACIÓN

La concentración de pegaspargasa presente en la composición antes de la liofilización está preferiblemente en el rango de 4 a 25%, más preferiblemente en el rango de 6 a 20%, más preferiblemente en el rango de 8 a 16% de la composición. El volumen de llenado antes de la liofilización está preferiblemente en el rango de 0,5 a 5 ml, más preferiblemente en el rango de 0,5 a 4 ml, aún más preferiblemente en el rango de 0,5 a 3 ml.

Sobre la base del volumen de llenado así como del volumen posterior a la reconstitución, es necesario añadir la concentración adecuada de aditivos (si los hubiera) de modo que la concentración deseada de los aditivos se obtenga después de la reconstitución del producto liofilizado antes de su administración.

CICLO DE LIOFILIZACIÓN

PASO – 1 - CONGELACIÓN

El proceso liofilizado en la presente invención incluye preferentemente la temperatura más baja del paso de congelación de -10°C a -60°C, más preferiblemente de -20°C a -50°C, aún más preferiblemente de -35°C a -45°C. El tiempo total del paso de congelación del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 150 min a 500 min, más preferiblemente de 200 min a 400 min, preferiblemente de 240 min a 350 min. El tiempo necesario para alcanzar la temperatura de congelación más baja del paso de congelación del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 20 min a 180 min, más preferiblemente de 30 min a 120 min, preferiblemente de 45 min a 90 min. El tiempo de residencia a la temperatura de congelación más baja del paso de congelación del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 120 min a 480 min, más preferiblemente de 250 min a 360 min, preferiblemente de 200 min a 300 min.

PASO – 2 – SECADO PRIMARIO

El proceso liofilizado en la presente invención incluye preferentemente la temperatura de inicio del paso de secado primario de 10°C a -50°C, más preferiblemente de 0°C a -45°C, más preferiblemente de -30°C a -40°C. El tiempo total del paso de secado primario del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 35 a 80 h, más preferiblemente de 40 a 75 h, preferiblemente de 50 a 60 h. El tiempo necesario para alcanzar la temperatura de inicio del paso de secado primario del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 100 min a 1000 min, más preferiblemente de 250 min a 500 min, preferiblemente de 300 min a 400 min. La presión al comienzo del paso de secado primario del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 50 mTorr a 200 mTorr. La temperatura máxima al final del paso de secado primario del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 5°C a 25°C, más preferiblemente de 8°C a 22°C, preferiblemente de 10°C a 20°C. El tiempo de residencia a la temperatura máxima del paso de secado primario del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 5 a 72 h, más preferiblemente de 8 a 24 h, preferiblemente de 10 a 14 h. La presión al final del paso de secado primario del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 37 mTorr a 112 mTorr, más preferiblemente de 50 mTorr a 90 mTorr, más preferiblemente de 60 mTorr a 80 mTorr.

El paso de secado primario del proceso de liofilización en la presente invención también podría incluir uno o más pasos intermedios de secado. La temperatura del paso intermedio de secado del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de -5°C a 15°C, más preferiblemente de 0°C a 10°C, lo más preferiblemente de 3°C a 7°C. El tiempo de residencia en el paso intermedio de secado del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 2 a 24 h, más preferiblemente de 5 a 12 h, lo más preferiblemente de 8 a 10 h. La presión en el paso intermedio de secado del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 75 mTorr a 200 mTorr, más preferiblemente de 100 mTorr a 120 mTorr.

PASO - 3 – SECADO SECUNDARIO

Al final del ciclo de secado primario, el polvo seco normalmente retiene el 10% de la humedad que necesita ser eliminada por la incorporación de un ciclo secundario. Este es el último ciclo del proceso de liofilización y elimina el agua descongelada, es decir, el agua asociada con el estado amorfo para secar aún más el producto y reducir el contenido de humedad residual.

El proceso liofilizado en la presente invención incluye preferentemente la temperatura del paso de secado secundario de 10°C a 37°C, más preferiblemente de 15°C a 35°C, más preferiblemente de 20°C a 30°C. El tiempo total del paso de secado secundario del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 3 a 24 h, más preferiblemente de 4 a 16 h, más preferiblemente de 4 a 7 h. El tiempo de residencia del paso de secado secundario del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 3 a 24 h, más preferiblemente de 4 a 16 h, mucho más preferiblemente de 4 a 7 h. La presión del paso de secado secundario del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 37 mTorr a 50 mTorr.

POST-LIOFILIZACIÓN

El volumen de reconstitución por vial, post liofilización puede ser de 1 a 5,5 ml, dependiendo de la dosis deseada después de la reconstitución y la concentración inicial de la muestra de pre-liofilización. La concentración de pegaspargasa después de la reconstitución del producto liofilizado en el volumen requerido está en el rango de $750 \pm 20\%$ UI/ml.

UTILIDAD

En otro aspecto de la invención se observa que la composición de la presente invención es estable durante períodos prolongados a pesar de la fluctuación de temperatura que se produce durante la manipulación y el transporte, ya que el producto es estable a temperatura ambiente, así como a 30 °C y 37 °C para un intervalo de tiempo sustancial. Sin estar limitado por la teoría, se propone que el uso óptimo de los diversos ingredientes en dicha relación mantiene la estabilidad de la composición durante y después de la liofilización lo que hace un producto más estable. La composición de la presente invención permite lograr un producto

lío filizado que mantenga la integridad física, la actividad biológica y la estabilidad química.

Además, la composición de la presente invención contiene pegaspargasa que tiene una pureza superior al 95% después de la liofilización. Con este mayor porcentaje de pureza, la composición está bien estabilizada, y el deterioro encontrado es mínimo tanto en condiciones de estabilidad aceleradas como en tiempo real.

La composición de la presente invención también es sinérgica desde el punto de vista de que cuando los ingredientes se constituyen juntos, según los principios del presente documento, producen una composición que tiene una actividad y estabilidad apropiadas durante su vida útil.

VENTAJAS DE LA COMPOSICIÓN DE LA PRESENTE INVENCION

1. La composición de la presente invención es tal que proporciona el apoyo mecánico deseado a la estructura de la masa resultante impartiendo así estabilidad a la composición de la pegaspargasa y aumenta su capacidad para manejar el estrés del proceso de liofilización, dando como resultado un producto estable al almacenamiento.
2. El proceso de la presente invención es tal que el tiempo de liofilización se reduce considerablemente frente a otros procesos del arte anterior, allanando así el camino hacia un proceso económicamente viable disminuyendo en casi 2 días, el tiempo de ejecución del liofilizador y de utilización de las instalaciones. El proceso de liofilización optimizado para la novedosa composición de pegaspargasa como se detalla en esta invención se completa en menos de 3 días, lo que supone una notable mejora en el proceso de liofilización de casi 5 días (112,5 horas).
3. La composición de la presente invención permite el uso de ninguna o baja concentración de sal en la composición de pegaspargasas liofilizadas, proporcionando ventajas en términos de temperatura eutéctica y de transición vítrea.
4. La novedosa composición mencionada en la presente invención produce un producto estable al almacenamiento incluso a mayor temperatura. La estabilidad de la pegaspargasa liofilizada a 30 °C durante 18 meses y 37 °C durante 3 meses demuestra claramente la mejora de la termoestabilidad con

respecto a la formulación líquida. El deterioro físico, químico y biológico de la composición objeto se minimiza tanto en condiciones de almacenamiento aceleradas como en tiempo real. Esto es particularmente importante para los países en desarrollo, ya que esta novedosa composición de pegaspargasa liofilizado permite variaciones de temperatura durante el transporte y la manipulación.

5. La composición de la pegaspargasa liofilizada en la presente invención ha sido desarrollada conjuntamente con el proceso de liofilización reduciendo así el estrés de la condición de liofilización en el producto. El alto porcentaje de pureza de pegaspargasa en la novedosa composición y ausencia de producto degradado, que a menudo se produce como resultado del estrés inducido por el proceso de liofilización de la proteína, hace que el producto sea menos inmunogénico (debido a la presencia de impurezas relacionadas con el producto – principalmente productos degradados). Además, la presente invención no da lugar a ninguna agregación inducida por el estrés que dé lugar a especies de mayor peso molecular como se observó en el caso de otros productos de arte anterior; cuando se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Cabe señalar que la composición líquida del producto de arte anterior no mostró la presencia de especies de mayor peso molecular. La novedosa composición de pegaspargasa liofilizada, desarrollada utilizando un novedoso proceso liofilizado que atiende a la composición como se detalla en la presente invención, no muestra ninguna especie de mayor peso molecular.
6. Basándose en la cantidad óptima de excipientes y el proceso optimizado de liofilización, la presente invención da como resultado un producto liofilizado estable al almacenamiento a un costo óptimo.

La presente invención se ilustra aquí a modo de ejemplos. Los ejemplos proporcionan una descripción de una composición de la presente invención y protección de pegaspargasa durante la liofilización y el almacenamiento. Los ejemplos son la ilustración de una modalidad de la presente invención y no pueden interpretarse de ninguna manera como limitante.

Ejemplos

Como se ha reiterado anteriormente que el ciclo de liofilización y la composición deben ser co-desarrollados, ya que el proceso de liofilización que produce un producto estable al almacenamiento depende de la composición de la formulación que a su vez determina el destino del producto después de la liofilización. Los ejemplos 1 y 2 detallan la interdependencia del proceso de liofilización y la composición.

EJEMPLO 1: EFECTO DEL EXCIPIENTE

1.1 CRIOPROTECTOR

La masa de pegaspargasa se intercambió con un amortiguador salino de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4. La masa (sustancia farmacológica) se formuló con varios porcentajes en peso (de la composición) de crioprotector: sacarosa y trehalosa. Se llenó 1 ml de la masa formulada de pegaspargasa en viales de vidrio de 2 ml USP despirogenado tipo I preesterilizados (recomendado para parenteral) y se taparon hasta la mitad con un tapón de goma recubierto de bromobutilo gris de 13 mm. Los viales se taparon hasta la mitad y se sometieron al proceso de liofilización.

Para el paso de congelación del proceso de liofilización, la congelación inicial se llevó a cabo a -40 °C durante 1 hora que se alcanzó a una velocidad de congelación de 1,08 °C/min, donde los viales se mantuvieron durante 3 horas. En el paso de secado primario, la temperatura se llevó a -5 °C a una velocidad de 0,028 °C/min por debajo de 112 mTorr y se mantuvo a esa temperatura durante 6 h. La temperatura se aumentó, aún más, a 0 °C a una velocidad de 0,006 °C/min y se mantuvo a 0 °C durante 6 h bajo presión de 112 mTorr. Por último, la temperatura se incrementó aún más, a 20 °C a una velocidad de 0,03 °C/min y se mantuvo a 20 °C durante 5 h bajo presión de 112 mTorr. En el paso de secado secundario, la presión se redujo aún más a 37 mTorr y la temperatura se incrementó a 25 °C a una velocidad de 0,17 °C/min y se mantuvo durante 5 h. El tiempo total para el proceso de liofilización es de 76,5 h.

Después de completar el proceso de liofilización, los viales se taparon completamente moviendo la plataforma hacia arriba. Luego, se liberó la presión introduciendo gas nitrógeno estéril en la cámara de liofilización. Los viales

lío filizados se sellaron con sellos flip off de 13 mm y se sometieron a caracterización analítica. Para el producto lío filizado, se midieron la estructura de la masa resultante, el tiempo de reconstitución, la claridad después de la reconstitución y la actividad relativa (en relación con la muestra pre-lío filizada). El resultado del proceso de lío filización sobre las distintas composiciones de pegaspargasa con crioprotector variable se tabula en la Tabla Tabla 1

TABLA 1: EFECTO DE DIFERENTES CRIO-PROTECTORES CON DIFERENTES PORCENTAJES EN LA COMPOSICIÓN DE LA FORMULACIÓN LIOFILIZADA DE PEGASPARGASA

Sr No.	Crio-protector	% Composición	Apariencia de la masa	Tiempo de reconstitución	Claridad después de la reconstitución	%Actividad relativa
1	sacarosa	35,14%	pobre	30 s	claro	89%
2		69,80%	pobre	30 s	claro	82%
3		90,24%	pobre	35 s	claro	86%
4	trehalosa	31,62%	pobre	27 s	claro	93%
5		90,24%	pobre	1:45 min	claro	80%
6	sacarosa	55,84%	pobre	32 s	claro	95%
	trehalosa	13,96%				

La estructura de la masa resultante de toda la pegaspargasa formulada, en presencia de diferentes crio-protectores con diferentes porcentajes de composición del producto lío filizado fueron insatisfactorias. Por lo tanto, se requirió la adición de agente de carga para obtener un resultado satisfactorio.

1.2 AGENTE DE CARGA

La masa de pegaspargasa se intercambió con un amortiguador salino de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4. La masa (sustancia farmacéutica) formulada con varios porcentajes en peso (de la composición) de los agentes de carga: manitol y glicina. Se llenó 1 ml de la masa formulada de pegaspargasa en viales de vidrio de 2 ml USP despirogenado tipo I preesterilizados (recomendado para parenteral) y se taparon hasta la mitad con un tapón de goma recubierto de bromobutilo gris de 13 mm. Los viales se taparon hasta la mitad y se sometieron al proceso de lío filización.

Para el paso de congelación del proceso de lío filización, la congelación inicial se llevó a cabo a -40 °C durante 1 h que se alcanzó una tasa de congelación de 1,08 °C/min, donde los viales se mantuvieron durante 3 h. En el paso de secado primario, la temperatura se llevó a -35 °C a una velocidad de 0,028 °C/min por debajo de 112

mTorr y se mantuvo a esa temperatura durante 10 h. La temperatura se aumentó, aún más, a 5 °C a una velocidad de 0,11 °C/min y se mantuvo a 5 °C durante 9 h bajo presión de 112 mTorr. Por último, la temperatura se incrementó aún más a 15 °C a una velocidad de 0,13 °C/min y se mantuvo a 15 °C durante 12 h bajo una presión reducida de 75 mTorr. En el paso de secado secundario, la presión se redujo aún más a 37 mTorr y la temperatura se incrementó a 25 °C a una velocidad de 0,33 °C/min y se mantuvo durante 5 h. El tiempo total para el proceso de liofilización es de 53 h.

Después de completar el proceso de liofilización, los viales se taparon completamente moviendo la plataforma hacia arriba. Luego la presión se liberó introduciendo gas nitrógeno estéril en la cámara de liofilización. Los viales liofilizados se sellaron con sellos flip off de 13 mm y se sometieron a caracterización analítica. Para el producto liofilizado, se midieron la estructura de la masa resultante, el tiempo de reconstitución, la claridad después de la reconstitución y la actividad y pureza relativas (en relación con la muestra pre-liofilizada). El resultado del proceso de liofilización en las distintas composiciones de pegaspargasa con agente de carga variable se tabula en la Tabla Tabla 2

TABLA 2: EFECTO DE DIFERENTES AGENTES DE CARGA CON DIFERENTES PORCENTAJES EN LA COMPOSICIÓN DE LA FORMULACIÓN LIOFILIZADA DE PEGASPARGASE

Sr. No.	Agente de carga	% Composición	Apariencia del pastel	Tiempo de reconstitución	Claridad después de la reconstitución	% Actividad	Pureza del % relativo
1	ninguno	n.a	bien	28 s	claro	69%	67%
2	glicina	51.54%	bien	26 s	claro	83%	98%
3	glicina	51.36%	bien	52 s	claro	100%	96%
4	manitol	35.96%	pobre	37 s	claro	89%	97%
5	manitol	27.44%	pobre	37 s	claro	83%	99%
	glicina	24.01%					

La estructura de la masa resultante se muestra en la Figura 1. De los datos se desprende claramente que el agente de carga glicina contribuye sustancialmente a la estructura de la masa y también mantiene la actividad dentro de los límites permitidos (600 UI/mL a 900 UI/mL). La estructura de la masa en ausencia de agente de carga para este proceso de liofilización es farmacéuticamente aceptable, pero la actividad y la pureza de la pegaspargasa es muy pobre. El uso de manitol

como agente de carga, aunque conserva la actividad y la pureza, no muestra una buena estructura de la masa para este proceso de liofilización.

1.3 EFECTO DE LA SAL

La masa de pegaspargasa se intercambió con un tampón en solución salina de fosfato de sodio de 50 mM, pH 7,4 y se formuló con sacarosa (crio-/lioprotector) y, diferentes cantidades de agente de carga – glicina con cantidad variable (% en peso de la composición) de sal. Se llenaron 2 ml de la masa formulada en viales de vidrio de 5 ml de tipo I, USP despirogenado previamente esterilizados (recomendado para parenteral) y se taparon hasta la mitad con un tapón de goma recubierto de bromobutilo gris de 20 mm. Los viales se taparon hasta la mitad y se sometieron al proceso de liofilización optimizado.

El paso de congelación del proceso de liofilización se llevó a cabo a -40 °C durante 4 h. La temperatura de congelación se alcanzó a una velocidad de congelación de 1 °C/min. En el paso de secado primario, la temperatura se llevó a -35 °C a una velocidad de 0,014 °C/min por debajo de 112 mTorr y se mantuvo a esa temperatura durante 10 h. La temperatura se aumentó, aún más, a 5 °C a una velocidad de 0,06 °C/min y se mantuvo a 5 °C durante 9 h bajo presión de 112 mTorr. La presión se redujo a 75 mTorr y la temperatura se llevó a 15 °C a una velocidad de 0,02 °C/min y se mantuvo durante 12 h. Durante el ciclo de secado secundario, la presión se redujo aún más, a 37 mTorr y la temperatura se incrementó a 25 °C a una velocidad de 0,33 °C/min y se mantuvo durante 5 h.

Después de completar el proceso de liofilización, los viales se taparon completamente moviendo la plataforma hacia arriba. Luego, se liberó la presión introduciendo gas nitrógeno estéril en la cámara de liofilización. Los viales liofilizados se sellaron con sellos flip off de 20 mm. El producto liofilizado se reconstituyó en 5 ml de agua para inyección y sometido a caracterización analítica. Para el producto liofilizado, se midieron la estructura de la masa, el tiempo de reconstitución, la claridad después de la reconstitución, la actividad relativa (en relación con el volumen de pre-liofilización), la pureza absoluta (expresada como porcentaje determinado por cromatografía líquida de alto rendimiento (SE-HPLC)) y la osmolalidad. El resultado del proceso de liofilización sobre las distintas composiciones de pegaspargasa está tabulado en el Tabla Tabla 3

TABLA 3: EL EFECTO DE NaCl Y GLICINE EN LA LIOFILIZACIÓN DE PEGASPARGASE

Sr. No	% Composición		Apariencia de la masa	Tiempo de reconstitución (s)	Claridad después de la reconstitución	% Actividad	% Pureza	Osmolalidad (mOsm/Kg)
	NaCl	glicina						
1	0,00%	48,44%	bien	40	claro	90,0%	98,0%	427
2	0,00%	46,45%	bien	39	claro	90,7%	97,7%	393
3	0,00%	44,29%	bien	42	claro	80,8%	N.d.	370
4	0,44%	48,23%	bien	44	claro	92,6%	97,6%	427
5	0,45%	46,24%	bien	35	claro	96,8%	98,2%	395
6	0,47%	44,08%	bien	30	claro	93,9%	97,9%	385
7	1,08%	47,92%	bien	35	claro	85,3%	97,6%	433
8	1,12%	45,93%	bien	33	claro	87,8%	97,6%	403
9	1,16%	43,78%	bien	32	claro	61,9%	N.d.	384

Es evidente que el proceso de liofilización optimizado se puede utilizar para la composición con una concentración baja y sin sal, sin alterar los atributos críticos del producto.

EJEMPLO 2: EFECTO DE DIFERENTE CICLO DE LIOFILIZACIÓN EN LA MISMA COMPOSICIÓN

La masa de pegaspargasa se intercambió con un amortiguador salino de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4. La masa (sustancia farmacéutica) se formuló con sacarosa (crio-/lio-protector al 34,3% de la composición) y glicina (agente de carga al 51,5% de la composición). Se llenó 1 ml del volumen formulado en viales de vidrio de 2 ml de tipo I, USP despirogenado previamente esterilizados (recomendado para parenteral) y se taparon hasta la mitad con un tapón de goma recubierto de bromobutilo gris de 13 mm. Los viales se taparon hasta la mitad y se sometieron a diversos procesos de liofilización.

El paso de congelación de los diversos procesos de liofilización se llevó a cabo durante varios tiempos y temperaturas. En algunos casos, se llevó a cabo una congelación en un solo paso, mientras que en otros se llevó a cabo la congelación en varios pasos. En un ciclo la congelación inicial se llevó a cabo a -15 °C durante 2 h alcanzando una velocidad de congelación de 1,16 °C/min. Esto fue seguido con una nueva disminución de la temperatura a -25 °C, lograda a la velocidad de congelación de 0,33 °C/min, donde los viales se mantuvieron durante 3 h. Por último, la temperatura se redujo a -40 °C, alcanzada a la velocidad de congelación

de 0,5 °C/min, donde los viales se mantuvieron durante 2 h. La duración total del paso de congelación fue de 8,5 h. En otro ciclo, el paso de congelación del proceso de liofilización se llevó a cabo a -40 °C durante 3 h. La temperatura de congelación se alcanzó a una velocidad de congelación de 1 °C/min. La duración total del paso de congelación fue de 4 h. En otro ciclo, el paso de congelación del proceso de liofilización se llevó a cabo a 40 °C durante 6 h. La temperatura de congelación se alcanzó a una velocidad de congelación de 0,5 °C/min. La duración total del paso de congelación fue de 8 h. Sin embargo, en otro ciclo, el paso de congelación del proceso de liofilización se llevó a cabo a 40 °C durante 4 h. La temperatura de congelación se alcanzó a una velocidad de congelación de 1 °C/min. La duración total del paso de congelación fue de 5 h.

El paso de secado primario del ciclo de liofilización también se varió con respecto a la temperatura, la presión y el tiempo. En un ciclo, para el paso de secado primario, la temperatura se llevó a -5 °C a una velocidad de 0,028 °C/min por debajo de 112 mTorr y se mantuvo a esa temperatura durante 6 h. La temperatura se aumentó aún más, a 0 °C a una velocidad de 0,006 °C/min y se mantuvo a 0 °C durante 6 h bajo presión de 112 mTorr. Por último, la temperatura se incrementó aún más a 20 °C a una velocidad de 0,03 °C/min y se mantuvo a 20 °C durante 5 h bajo presión de 112 mTorr. La duración total del paso de secado primario fue de 61,5 h. En otro ciclo, para el paso de secado primario, la temperatura se llevó a -5 °C a una velocidad de 0,15 °C/min por debajo de 112 mTorr y se mantuvo a esa temperatura durante 14 h. La temperatura se incrementó, aún más, a 5 °C a una velocidad de 0,06 °C/min y se mantuvo a 5 °C durante 9 h bajo presión de 112 mTorr. Por último, la presión se redujo a 75 mTorr y la temperatura se llevó a 15 °C a una velocidad de 0,067 °C/min y se mantuvo durante 6 h. La duración total del paso de secado primario fue de 38,5 h. En otro ciclo, para el paso de secado primario, la temperatura se llevó a -35 °C a una velocidad de 0,027 °C/min por debajo de 112 mTorr y se mantuvo a esa temperatura durante 10 h. La temperatura se aumentó aún más a 5 °C a una velocidad de 0,11 °C/min y se mantuvo a 5 °C durante 9 h bajo presión de 112 mTorr. Por último, la presión se redujo a 75 mTorr y la temperatura se llevó a 15 °C a una velocidad de 0,067 °C/min y se mantuvo durante 12 h. La duración total del paso de secado primario fue de 42,5 h. En otro ciclo para el paso de secado primario, la temperatura se llevó a -35 °C a una velocidad de 0,027 °C/min por

debajo de 112 mTorr y se mantuvo a esa temperatura durante 10 h. La temperatura se incrementó, aún más, a 5 °C a una velocidad de 0,11 °C/min y se mantuvo a 5 °C durante 9 h bajo presión de 112 mTorr. La temperatura se aumentó, aún más, a 10 °C a una velocidad de 0,014 °C/min y se mantuvo a 10°C durante 24 h bajo presión de 112 mTorr. Por último, la presión se redujo a 75 mTorr y la temperatura se llevó a 15 °C a una velocidad de 0,033 °C/min y se mantuvo durante 12 h. La duración total del paso de secado primario fue de 72,5 h. Sin embargo, en otro ciclo para el paso de secado primario, la temperatura se llevó a -35 °C a una velocidad de 0.027 °C/min por debajo de 112 mTorr y se mantuvo a esa temperatura durante 6 h. La temperatura se aumentó, aún más, a 15°C a una velocidad de 0.138 °C/min y se mantuvo a 15°C durante 9 h bajo presión de 112 mTorr. Por último, la presión se redujo a 75 mTorr sobre 5 h a 15 °C y se mantuvo durante 12 h. La duración total del paso de secado primario fue de 38,5 h.

El paso secundario de secado del ciclo de liofilización también se varió con respecto a la temperatura, la presión y el tiempo. En un ciclo, para el paso de secado secundario, la presión se redujo, aún más, a 37 mTorr y la temperatura se incrementó a 25 °C a una velocidad de 0,16 °C/min y se mantuvo durante 5 h. La duración total del paso de secado secundario fue de 5,5 h. En un ciclo, para el paso de secado secundario, la presión se redujo aún más a 37 mTorr y la temperatura se incrementó a 25 °C a una velocidad de 0,33 °C/min y se mantuvo durante 5 h. La duración total del paso de secado secundario fue de 5,5 h. Sin embargo, en un ciclo, para el paso de secado secundario, la presión se redujo aún más a 37 mTorr y la temperatura se incrementó a 25 °C a una velocidad de 0,33 °C/min y se mantuvo durante 9 h. La duración total del paso de secado secundario fue de 9,5 h.

El tiempo de finalización del proceso de liofilización varió de 48 h a 83,5 h.

Después de completar el proceso de liofilización, los viales se taparon completamente moviendo la plataforma hacia arriba. Luego, se liberó la presión introduciendo gas nitrógeno estéril en la cámara de liofilización. Después, los viales liofilizados se sellaron con sellos flip off de 13 mm y se sometieron a caracterización analítica. Para el producto liofilizado, se midieron la estructura de la masa, el tiempo de reconstitución, la claridad posterior a la reconstitución, la actividad relativa (en relación con el volumen de pre-liofilización), la pureza relativa (en relación con el

volumen de liofilización previa determinado por cromatografía líquida de alto rendimiento (SE-HPLC)) y la osmolalidad. El producto liofilizado tenía una formación de masa de buena a satisfactoria, un tiempo de reconstitución aceptable (menos de 2 minutos) y la muestra reconstituida era transparente e incolora. Sin embargo, la actividad relativa y la pureza variaron considerablemente como se muestra en la Tabla 4. Este resultado se espera debido a las diferentes condiciones de estrés impartidas a la misma composición por el cambio en el proceso de liofilización.

TABLA 4: PUREZA RELATIVA Y ACTIVIDAD DE LA MISMA FORMULACIÓN CON CONDICIONES DE LIOFILIZACIÓN VARIABLES

Ciclos de liofilización	Hora (h)				%Actividad relativa	% Pureza relativa
	Congelación	Secado primario	Secado secundario	Total		
1	8,5	61,5	5,5	75,5	84%	83%
2	4,0	61,5	5,5	71,0	98%	91%
3	4,0	38,5	5,5	48,0	91%	93%
4	8,0	38,5	5,5	52,0	87%	91%
5	5,0	42,5	5,5	53,0	83%	98%
6	5,0	61,5	5,5	72,0	87%	101%
7	5,0	38,5	9,5	53,0	85%	95%

EJEMPLO 3: UN EJEMPLO ILUSTRATIVO DE LA COMPOSICIÓN DE LA PRESENTE INVENCIÓN – BAJA SAL

La masa de pegaspargasa se intercambió con un tampón en solución salina de fosfato sodio 50 mM, pH 7,4. La masa requerida se formuló con sacarosa como el crio-/lio-protector y glicina como el agente de carga y finalmente se diluyó para lograr 1875 UI/ml. La formulación final está compuesta por pegaspargasa, sacarosa, glicina, fosfato sódico monobásico, fosfato sódico dibásico y cloruro sódico al 13,67 a 7,04%, 39,60 a 36,78%, 47,52 a 44,13%, 0,95 a 0,88%, 4,42 a 4,10% y, al 0,47 a 0,43% de la composición, respectivamente. Se llenaron 2 ml de la masa formulada en viales de vidrio de 5 ml de tipo I, USP despirogenado previamente esterilizados (recomendado para parenteral) y se taparon hasta la mitad con un tapón de goma recubierto de bromobutilo gris de 20 mm. Los viales se taparon hasta la mitad y se sometieron al proceso de liofilización optimizado.

El paso de congelación del proceso de liofilización se llevó a cabo a -40 °C durante 4 h. La temperatura de congelación se alcanzó a una velocidad de congelación de 1 °C/min. En el ciclo de secado primario, la temperatura se llevó a -35 °C a una velocidad de 0,014 °C/min por debajo de 112 mTorr y se mantuvo a esa temperatura durante 10 h. La temperatura se aumentó, aún más, a 5 °C a una velocidad de 0,06 °C/min y se mantuvo a 5 °C durante 9 h bajo presión de 112 mTorr. La presión se redujo a 75 mTorr y la temperatura se llevó a 15 °C a una velocidad de 0,02 °C/min y se mantuvo durante 12 h. Durante el ciclo de secado secundario, la presión se redujo aún más, a 37 mTorr y la temperatura se incrementó a 25 °C a una velocidad de 0,33 °C/min y se mantuvo durante 5 h. El tiempo total para el proceso de liofilización es de 66,5 h.

Después de completar el proceso de liofilización, los viales se taparon completamente moviendo la plataforma hacia arriba. Luego, se liberó la presión introduciendo gas nitrógeno estéril en la cámara de liofilización. Los viales liofilizados se sellaron con sellos flip off de 20 mm. El producto liofilizado se reconstituyó en 5 ml de agua para inyección y someterlo a caracterización analítica (Tabla Tabla 5

TABLA 5. CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE PEGASPARGASAS LIOFILIZADOS

Prueba	Criterios de aceptación	Producto liofilizado
Apariencia	Pre-reconstitución – masa blanca a blanquecina	Cumple
	Post-reconstitución - Solución incolora	
Tiempo de reconstitución (s)	NMT 180 s	68
Claridad	Transparente, sin partículas visibles	Cumple
Volumen de relleno	Para entregar 5,0 mL (USP)	5,0 mL
pH	7,0-7,4	7,08
Potencia (Actividad)	600-900 IU/mL	680
Actividad específica	≥ 85 UI/mg de proteína	128
Pureza por segundo	≥ 85% componentes activos, ≤ agregados del 8%	94,94%
Pureza relativa		99,11%
Concentración de proteínas	4,8-8,5 mg/mL	5,33
Contenido de humedad	NMT 5%	3,5%
Osmolalidad (mOsm/kg)	270 - 600 mOsm/kg	409

La Figura 2 demuestra la integridad y pureza de la pegaspargasa pre y post liofilizada según lo determinado por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) y cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SE-HPLC), respectivamente.

La robustez del proceso del ciclo de liofilización, así como la composición, se verificaron en múltiples lotes. Para el producto liofilizado, se midieron la estructura de la masa resultante, el tiempo de reconstitución, la claridad posterior a la reconstitución, la actividad absoluta, la actividad relativa (en relación con el volumen de pre liofilización), la pureza absoluta (expresada como porcentaje determinado por cromatografía líquida de alto rendimiento (SE-HPLC)), la pureza relativa (en relación con el volumen de pre-liofilización), la osmolalidad y el contenido de humedad. Las características del producto cumplen los criterios de aceptación que se muestran en la Tabla Tabla 6 para tres lotes representativos.

TABLA 6. CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE TRES LOTES DE PEGASPARGASA LIOFILIZADA

Prueba	Criterios de aceptación	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Apariencia	Pre-reconstitución - masa blanca a blanquecina	Cumple	Cumple	Cumple
	Post-reconstitución - Solución incolora	Cumple	Cumple	Cumple
Tiempo de reconstitución (s)	NMT 180 s	59	59	66
Claridad	Transparente, sin partículas visibles	Cumple	Cumple	Cumple
Potencia (Actividad)	600-900 IU/mL	815	869	727
Actividad relativa	NLT 85 %	103,70%	101,60%	97,60%
Pureza por s	≥ 85% componentes activos, ≤ agregados del 8%	97,55%	99,73%	99,78%
Pureza relativa		100,40%	100,00%	100,00%
Contenido de humedad	NMT 5%	2,28%	2,78%	2,35%
Osmolalidad (mOsm/kg)	270 - 600 mOsm/kg	390	398	401

El producto liofilizado se sometió a un estudio de estabilidad a largo plazo a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 meses y a un estudio de estabilidad acelerado a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C} / 60\% \pm 5\%$ de humedad relativa durante 6 meses según las directrices de calidad ICH (Q1A). El resultado del proceso de liofilización en el producto de pegaspargasa en varios momentos a temperatura ambiente ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) y a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C} / 60\% \pm 5\%$ de humedad relativa se encuentra tabulado en la Tabla Tabla 7 y la Tabla Tabla 8 respectivamente.

TABLA 7. ESTUDIO DE ESTABILIDAD A LARGO PLAZO DE PEGASPARGASA LIOFILIZADA A 5 °C ± 3 °C DURANTE 24 MESES.

Prueba	Criterios de aceptación	0 día	15 días	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Apariencia	Pre-reconstitución - masa blanca a blanquecina	Cumple								
	Post-reconstitución - Solución incolora									
Tiempo de reconstitución (s)	NMT 180 s	68	58	58	52	58	59	59	57	54
Claridad	Transparente, sin partículas visibles	Cumple								
Volumen de relleno	Para entregar 5,0 mL (USP)	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL
pH	7,0-7,4	7,08	7,09	7,11	7,07	7,08	7,2	7,19	7,17	7,2
Potencia (Actividad)	600-900 IU/mL	680	687	679	673	661	650	656	675	642
Actividad específica	≥ 85 UI/mg de proteína	128	128	126	130	127	115	120	121	123
Pureza por s	≥ 85% componentes activos, ≤ agregados del 8%	94,94 %	95,96%	95,86%	95,82%	95,77 %	95,70 %	95,79%	95,40 %	93,05 %
Pureza relativa		99,11 %	100,18 %	100,07 %	100,03 %	99,98 %	99,91 %	100,00 %	99,59 %	97,14 %
Concentración de proteínas	4,8-8,5 mg/ml	5,33	5,35	5,39	5,18	5,2	5,66	5,48	5,58	5,24
Osmolalidad (mOsm/kg)	270 - 600 mOsm/kg	409	419	412	411	413	406	411	408	413

TABLA 8, ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACELERADA DE PEGASPARGASA LIOFILIZADA A 25 °C ± 3 °C / 60 % ± 5 % DE HUMEDAD RELATIVA DURANTE 6 MESES,

Prueba	Criterios de aceptación	0 día	15 días	1 meses	3 meses	6 meses
Apariencia	Pre-reconstitución - masa blanca a blanquecina	Cumple				
	Post-reconstitución - Solución incolora					
Tiempo de reconstitución (s)	NMT 180 s	68	64	63	56	62
Claridad	Transparente, sin partículas visibles	Cumple				
Volumen de relleno	Para entregar 5,0 mL (USP)	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL
pH	7,0-7,4	7,08	7,1	7,1	7,06	7,05
Potencia (Actividad)	600-900 IU/mL	680	679	681	657	622
Actividad específica	≥ 85 UI/mg de proteína	128	129	132	123	119
Pureza por s	≥ 85% componentes activos, ≤ agregados del 8%	94,94%	95,53%	95,00%	95,09%	94,06%
Pureza relativa		99,11%	99,73%	99,18%	99,27%	98,19%
Concentración de proteínas	4,8-8,5 mg/ml	5,33	5,28	5,14	5,33	5,24
Osmolalidad (mOsm/kg)	270 - 600 mOsm/kg	409	412	414	411	410

Las características del producto cumplen con los criterios de aceptación durante todo el tiempo mostrando que el producto es estable a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 meses y a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $60\% \pm 5\%$ de humedad relativa durante 6 meses. Además, la estabilidad del producto liofilizado se evaluó a temperatura elevada por lo cual, el producto se sometió a un estudio de estabilidad a largo plazo a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $65\% \pm 5\%$ de humedad relativa durante 18 meses y a un estudio de estabilidad acelerada a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\%$ humedad relativa durante 3 meses. El resultado del proceso de liofilización en el producto pegaspargasa en varios momentos a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $65\% \pm 5\%$ humedad relativa y a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\%$ de humedad relativa está tabulado en la Tabla 9 Tabla 10 respectivamente. Las características del producto cumplen con los criterios de aceptación durante todo el tiempo de ensayos mostrando que el producto es estable a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $65\% \pm 5\%$ de humedad relativa durante 18 meses y a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\%$ de humedad relativa durante 3 meses.

TABLA 9. ESTUDIO DE ESTABILIDAD A LARGO PLAZO DE PEGASPARGASA LIOFILIZADA A $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $65\% \pm 5\%$ HUMEDAD RELATIVA DURANTE 18 MESES

Prueba	Criterios de aceptación	0 día	15 días	1 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses
Apariencia	Pre-reconstitución - masa blanca a blanquecina	Cumple							
	Post-reconstitución - Solución incolora								
Tiempo de reconstitución (s)	NMT 180 s	68	57	59	58	61	58	62	61
Claridad	Transparente, sin partículas visibles	Cumple							
Volumen de relleno	Para entregar 5,0 mL (USP)	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL
pH	7,0-7,4	7,08	7,08	7,09	7,07	7,05	7,27	7,18	7,24
Potencia (Actividad)	600-900 IU/mL	680	668	687	652	611	617	629	601
Actividad específica	≥ 85 UI/mg de proteína	128	131	138	128	119	116	112	113
Pureza por s	$\geq 85\%$ componentes activos, $\leq 8\%$ agregados del	94,94%	95,31%	95,00%	94,11%	91,11%	90,10%	91,00%	87,06%
Pureza relativa		99,11%	99,50%	99,18%	98,25%	95,11%	94,06%	95,00%	90,89%
Concentración de proteínas	4,8-8,5 mg/ml	5,33	5,11	4,98	5,08	5,15	5,33	5,61	5,3
Osmolalidad (mOsm/kg)	270 - 600 mOsm/kg	409	411	415	406	409	396	409	412

TABLA 10: ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACELERADA DE PEGASPARGASA LIOFILIZADA A 37 °C ± 2 °C / 75% ± 5% HUMEDAD RELATIVA DURANTE 3 MESES

Prueba	Criterios de aceptación	0 día	15 días	1 meses	3 meses
Apariencia	Pre-reconstitución - masa blanca a blanquecina	Cumple			
	Post-reconstitución - Solución incolora				
Tiempo de reconstitución (s)	NMT 180 s	68	56	54	59
Claridad	Transparente, sin partículas visibles	Cumple			
Volumen de relleno	Para entregar 5,0 mL (USP)	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL
pH	7,0-7,4	7,08	7,09	7,09	7,1
Potencia (Actividad)	600-900 IU/mL	680	656	699	631
Actividad específica	≥ 85 UI/mg de proteína	128	125	130	125
Pureza por s	≥ 85% componentes activos, ≤ agregados del 8%	94,94%	91,16%	91,15%	90,26%
Pureza relativa		99,11%	95,17%	95,16%	94,23%
Concentración de proteínas	4,8-8,5 mg/ml	5,33	5,24	5,37	5,05
Osmolalidad (mOsm/kg)	270 - 600 mOsm/kg	409	411	419	410

EJEMPLO 4: UN EJEMPLO ILUSTRATIVO DE LA COMPOSICIÓN DE LA PRESENTE INVENCION – SIN SAL

La masa de pegaspargasa se intercambió con una solución reguladora de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4. La masa concentrada requerida se formuló con sacarosa como el crio-/lio-protector y glicina como el agente de carga y finalmente se diluyó para lograr 1875 UI/mL. La formulación final está compuesta por pegaspargasa, sacarosa, glicina, fosfato sódico monobásico y fosfato sódico dibásico al 12,57 a 9,60%, 38,71 a 37,43%, 46,45 a 44,92%, 0,93 a 0,90% y 4,32 a 4,18% de la composición respectivamente. Se llenaron 2 ml de la masa formulada en viales de vidrio de 5 ml de tipo I, USP despirogenado previamente esterilizados (recomendados para parenteral) y se taparon la mitad con un tapón de goma recubierto de bromobutilo gris de 20 mm. Los viales se taparon hasta la mitad y se sometieron al proceso de liofilización optimizado.

El paso de congelación del proceso de liofilización se llevó a cabo a -40 °C durante 4 h. La temperatura de congelación se alcanzó a una velocidad de congelación de 1 °C/min. En el ciclo de secado primario la temperatura se llevó a -35 °C a una velocidad de 0,014 °C/min por debajo de 112 mTorr y se mantuvo a esa temperatura durante 10 h. La temperatura se incrementó, aún más, a 5 °C a una velocidad de

0,06 °C/min y se mantuvo a 5 °C durante 9 h bajo presión de 112 mTorr. La presión se redujo a 75 mTorr y la temperatura se llevó a 15 °C a una velocidad de 0,02 °C/min y se mantuvo durante 12 h. Durante el ciclo de secado secundario, la presión se redujo aún más, a 37 mTorr y la temperatura se incrementó a 25 °C a una velocidad de 0,33 °C/min y se mantuvo durante 5 h. El tiempo total para el proceso de liofilización es de 66,5 h.

Después de completar el proceso de liofilización, los viales se taparon completamente moviendo la plataforma hacia arriba. Luego, se liberó la presión introduciendo gas nitrógeno estéril en la cámara de liofilización. Los viales liofilizados se sellaron con sellos flip off de 20 mm. El producto liofilizado se reconstituyó en 5 ml de agua para inyección y someterlo a caracterización analítica (Tabla Tabla 11

TABLA 11. CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE PEGASPARGASA LIOFILIZADA COMO COMPOSICIÓN NO SALINA

Prueba	Criterios de aceptación	Producto liofilizado
Apariencia	Pre-reconstitución - masa blanca a blanquecina	Cumple
	Post-reconstitución - Solución incolora	
Tiempo de reconstitución (s)	NMT 180 s	49
Claridad	Transparente, sin partículas visibles	Cumple
Volumen de relleno	Para entregar 5,0 mL (USP)	5,0 mL
Potencia (Actividad)	600-900 IU/mL	803
Actividad específica	≥ 85 UI/mg de proteína	144
Pureza por s	≥ 85% componentes activos, ≤ agregados del 8%	99,40%
Pureza relativa		100%
Concentración de proteínas	4,8-8,5 mg/ml	5,56
Contenido de humedad	NMT 5%	2,47%
Osmolalidad (mOsm/kg)	270 -600 mOsm/kg	434

La robustez del proceso del ciclo de liofilización, así como la composición se verificaron en múltiples lotes. Para el producto liofilizado, se midieron la estructura de la masa resultante, el tiempo de reconstitución, la claridad posterior a la reconstitución, la actividad absoluta, la actividad relativa (en relación con el volumen de pre-liofilización), la pureza absoluta (expresada como porcentaje determinado por la cromatografía líquida de alto rendimiento (SE-HPLC)), la pureza relativa (en

relación con el volumen de pre-liofilización), la osmolalidad y el contenido de humedad. Las características del producto cumplen los criterios de aceptación que se muestran en la Tabla Tabla 12 para tres lotes representativos.

TABLA 12. CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE TRES LOTES DE PEGASPARGASA LIOFILIZADA COMO COMPOSICIÓN NO SALINA

Prueba	Criterios de aceptación	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Apariencia	Pre-reconstitución - masa blanca a blanquecina	Cumple	Cumple	Cumple
	Post-reconstitución - Solución incolora			
Tiempo de reconstitución (s)	NMT 180 s	49	83	49
Claridad	Transparente, sin partículas visibles	Cumple	Cumple	Cumple
Potencia (Actividad)	600-900 IU/mL	831	849	803
Actividad relativa	NLT 85%	89%	107%	101%
Pureza por s	≥ 85% componentes activos, ≤ agregados del 8%	99%	99%	99%
Pureza relativa		99%	100%	100%
Contenido de humedad	NMT 5%	2,20%	2,37%	2,47%
Osmolalidad (mOsm/kg)	270 -600 mOsm/kg	420	444	434

El producto liofilizado sin sal se sometió a un estudio de estabilidad a largo plazo a 5 °C ± 3 °C, a 25 °C ± 2 °C / 60% ± 5%, a 30 °C ± 2 °C / 65% ± 5% de humedad relativa y a 37 °C ± 2 °C / 75% ± 5% de humedad relativa y los datos se presentan en la Tabla Tabla 13: Estabilidad de una realización de la composición de la presente invención a 1 mes¹³ para un (1) mes y en la Tabla 14: Estabilidad de una realización de la composición de la presente invención a 3 meses¹⁴ para tres (3) meses.

TABLA 13: ESTABILIDAD DE UNA REALIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA PRESENTE INVENCION A 1 MES¹³

Pruebas	Criterios de aceptación	0 día	1 mes (temperatura de almacenamiento)			
			5°C	25°C	30°C	37°C
Apariencia	Masa blanca a blanquecina intacta, firmemente unido al vial.	Masa blanca a blanquecina intacta, firmemente unido al vial.	Masa blanca a blanquecina intacta, firmemente unido al vial.			
Tiempo de reconstitución (s)	≤ 180 s	128	107	93	108	87
Claridad después	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente no se debe			

de la reconstitución	no se debe observar ninguna partícula visible	no se debe observar ninguna partícula visible	observar ninguna partícula visible			
pH	7,1 a 7,5	7,3	7,23	7,24	7,23	7,24
Contenido de proteínas (mg/ml)	NLT 5 mg/ml	5,53	5,8	6,22	6,06	5,91
Ensayo (IU/mL)	600 - 900 UI/mL	753	722	753	729	748
Actividad específica (IU/mg)	NLT 85 UI/mg	136	124	121	120	127
Osmolalidad (mOsm/kg)	NMT 460 mOsm/kg	430	434	436	439	445
Pureza por s (%)	NLT 95%	99,63	99,95	99,99	97,76	96,83
PMT/Total No. partículas por contenedor	NMT 6000	≥ 10 µm tamaño:- 232	45	30	30	40
	NMT 600	≥ 25 µm tamaño:- 020	05	03	05	03
SDS-PAGE		Aceptable				

TABLA 14: ESTABILIDAD DE UNA REALIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA PRESENTE INVENCION A 3 MESES¹⁴

Pruebas	Criterios de aceptación	0 día	3 meses (temperatura de almacenamiento)			
			5°C	25°C	30°C	37°C
Apariencia	Masa blanca a blanquecina intacta, firmemente unido al vial.	Masa blanca a blanquecina intacta, firmemente unido al vial.	Masa blanca a blanquecina intacta, firmemente unido al vial.			
Tiempo de reconstitución (s)	≤ 180 s	128	65	80	50	90
Claridad después de la reconstitución	Solución transparente no se debe observar ninguna partícula visible	Solución transparente no se debe observar ninguna partícula visible	Solución transparente no se debe observar ninguna partícula visible			
pH	7,1 a 7,5	7,3	7,29	7,29	7,29	7,28
Contenido de proteínas (mg/ml)	NLT 5 mg/ml	5,53	6,21	6,12	5,56	5,66
Ensayo (IU/mL)	600 - 900 UI/mL	753	748	719	708	763
Actividad específica (IU/mg)	NLT 85 UI/mg	136	120	116	127	135
Osmolalidad (mOsm/kg)	NMT 460 mOsm/kg	430	439	434	432	440
Pureza por s (%)	NLT 95%	99,63	99,39	99,31	97,67	95,87
PMT/Total No.	NMT 6000	≥ 10 µm tamaño:- 232	23	23	30	73

partículas por contenedor	NMT 6000	$\geq 25 \mu\text{m}$ tamaño:- 020	05	03	05	03
SDS-PAGE		Acceptable	Acceptable			

EJEMPLO 5: COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA PRESENTE INVENCIÓN CON EL ESTADO DE LA TÉCNICA

5.1 COMPOSICIÓN LÍQUIDA DEL ESTADO DE LA TÉCNICA VS COMPOSICIÓN SÓLIDA DE LA PRESENTE INVENCIÓN

La masa de pegaspargasa descrita en el estado de la técnica generalmente se presenta como composición líquida y no estable al almacenamiento a una duración de tiempo más largo y a una temperatura más alta. La presente invención revela una composición liofilizada estable al almacenamiento a varias temperaturas. Se menciona en el arte anterior que la pegaspargasa no es estable en tiempos más largos. La presente invención supera esta limitación y proporciona una composición estable al almacenamiento. El producto del arte anterior se degrada sustancialmente en 3 meses a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $60\% \pm 5\%$ de humedad relativa. Como se muestra en la Figura 3, la degradación de la formulación líquida es evidente por la presencia de múltiples bandas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $60\% \pm 5\%$ de humedad relativa para la composición líquida analizado por SDS-PAGE (Figura 3 (A)). Esta invención produce una formulación estable al almacenamiento, que es estable a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $60\% \pm 5\%$ de humedad relativa, $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $65\% \pm 5\%$ de humedad relativa y a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\%$ de humedad relativa. La estabilidad de la composición del presente documento es evidente por la presencia de una sola banda difusa con un peso molecular adecuado como se muestra en la Figura 3 (B)

5.2 COMPOSICIÓN SÓLIDA DEL ESTADO DE LA TÉCNICA VS COMPOSICIÓN SÓLIDA DE LA PRESENTE INVENCIÓN

El estado de la técnica anterior revela una composición estable al almacenamiento, pero tiene limitaciones en términos de agregados de alto peso molecular en productos liofilizados. La divulgación actual utiliza un proceso inventivo y una composición mejorada, y no tiene ninguna agregación adicional/ impurezas de alto peso molecular (véase la figura 4). La Figura 4 muestra el análisis SDS-PAGE de la composición liofilizada de la técnica anterior con la invención actual. Los geles de

SDS-PAGE confirman la presencia de impurezas de alto peso molecular como es evidente a partir de la tinción de Coomassie para la proteína (Figura 4 (A)) y la tinción de yodo (Figura 4 (B)) para PEG. Además, el análisis de Western Blot con anticuerpo anti-asparaginasa (Figura 4 (C)) y anticuerpo Anti-PEG (Figura 4 (B)) confirma la presencia de impurezas relacionadas con el producto. Esto resalta aún más la relación sinérgica del proceso de liofilización con la composición de la formulación. Cabe señalar que la composición líquida del producto de la técnica anterior no mostró la presencia de especies de mayor peso molecular.

Reivindicaciones

1. Una composición óptima, liofilizada y estable al almacenamiento que comprende pegaspargasa, un crioprotector, un agente de carga, un amortiguador, opcionalmente con excipientes farmacéuticamente aceptables.
2. La composición según la reivindicación 1, en la que la pegaspargasa es una asparaginasa pegilada que comprende un grupo óxido de polialquileno unido covalentemente por un enlazador a la asparaginasa; en el que el poli (óxido de alquileno) es mono-metoxi-polietilenglicol (mPEG) de peso molecular preferiblemente entre 4 y 6 kDa, más preferiblemente entre 4,5 y 5,5 kDa y lo más preferiblemente entre 4,8 y 5,2 kDa y está unido covalentemente por un conector succinato mediante un enlace amida a uno o más grupos amina primaria de L-asparaginasa mediante conjugación; donde la reacción de conjugación de mPEG y L-asparaginasa da como resultado la unión covalente de 1-12 mPEG por monómero de L-asparaginasa, preferiblemente entre 5-10 mPEG por monómero de L-asparaginasa, más preferiblemente entre 7-10 mPEG por monómero de L-asparaginasa y lo más preferiblemente entre 7-9 mPEG por monómero de L-asparaginasa.
3. La composición según la reivindicación 2, en la que L-asparaginasa proviene de una fuente bacteriana seleccionada del grupo formado por *E. coli* o *Erwinia chrysanthemi* u obtenida a través de *E. coli* modificada genéticamente a través de tecnología recombinante.
4. La composición tal como se reclama en la reivindicación 1, en la que la cantidad de pegaspargasa en la composición es del 2 al 32%; más preferiblemente entre 5 y 20% y preferiblemente entre 6 y 14% de la composición.
5. La composición según la reivindicación 1, en la que el crioprotector se selecciona del grupo que comprende: azúcar, poliol, polímero y aminoácido, preferiblemente un azúcar; y el azúcar es sacarosa; en donde, el crioprotector está presente en un rango de 9 a 91%;

preferiblemente de 20 a 60%, más preferiblemente de 32 a 41% de la composición.

6. La composición según la reivindicación 1, en la que el agente de carga se selecciona del grupo que comprende: azúcar, poliol, polímero y aminoácido, preferiblemente un aminoácido; y el aminoácido seleccionado del grupo que comprende glicina, histidina, arginina; preferiblemente, el aminoácido es glicina; en el que el agente de carga está presente en el intervalo del 1 al 78%; más preferiblemente del 20 al 60% y más preferiblemente entre 38 y 50% de la composición.
7. La composición según la reivindicación 1, en la que el amortiguador se selecciona del grupo que comprende: regulador de fosfato, tampón de fosfato de sodio (dihidrogenofosfato de sodio - hidrogenofosfato de disodio), amortiguador de fosfato de potasio (dihidrogenofosfato de potasio - hidrogenofosfato de dipotasio), TRIS, buffer de citrato; preferiblemente, tampón fosfato; en donde, el tampón está en el rango de 3 a 33%; más preferiblemente de 3 a 15% y más preferiblemente entre 4 y 6% de la composición.
8. La composición según la reivindicación 1, en la que el excipiente farmacéuticamente aceptable es una sal.
9. La composición según la reivindicación 8, en la que la sal se selecciona del grupo que comprende: cloruro de sodio, cloruro de potasio, preferiblemente cloruro de sodio; en el que la cantidad de sal en la composición está en el intervalo del 0 al 40%, preferiblemente del 0 al 10%, más preferiblemente del 0 al 0,5% de la composición.
10. La composición según la reivindicación 1, en la que, el pH del producto antes de la liofilización y después de la reconstitución del producto liofilizado es de 6 a 8; la osmolalidad está preferiblemente en el rango de 250 a 600 mOsm/kg, más preferiblemente de 250 a 500 mOsm/kg y más preferiblemente de 250 a 450 mOsm/kg.
11. Un proceso de preparación de la composición como se reclama en la reivindicación 1, que consiste en:

- a. congelación
 - b. opcionalmente recocado;
 - c. secado primario y
 - d. secado secundario.
12. Un proceso para la preparación de la composición según la reivindicación 11, en el que el tiempo total del proceso de liofilización es preferiblemente de 2880 min (48 h) a 5790 min (96,5 h), más preferiblemente de 3120 min (52 h) a 4980 min (83 h), lo más preferiblemente de 3120 min (52 h) a 4200 min (70 h); la variación de temperatura es de -60 °C a 30 °C, más preferiblemente de -50 °C a 30 °C, más preferiblemente de -40 °C a 25 °C y la variación de presión es preferiblemente de 0,037 Torr a 760 Torr.
13. Un proceso según la reivindicación 11, en el que la congelación se realiza a la temperatura más baja de la etapa de congelación de -10 °C a -60 °C, más preferiblemente de -20 °C a -50 °C, lo más preferiblemente de -35 °C a -45 °C; el tiempo total es preferiblemente de 150 min a 500 min, más preferiblemente de 200 min a 400 min, lo más preferiblemente de 240 min a 350 min; la temperatura de congelación más baja está preferiblemente de 20 min a 180 min, más preferiblemente de 30 min a 120 min, lo más preferiblemente de 45 min a 90 min; El tiempo de residencia a la temperatura de congelación más baja es preferiblemente de 120 min a 480 min, más preferiblemente de 250 min a 360 min, lo más preferiblemente de 200 min a 300 min.
14. Un proceso según la reivindicación 11, en el que el secado primario es de 10°C a -50°C, más preferiblemente de 0°C a -45°C, lo más preferiblemente de -30°C a -40°C; el tiempo total es preferiblemente de 35 a 80 h, más preferiblemente de 40 a 75 h, lo más preferiblemente de 50 a 60 h; el tiempo requerido para alcanzar la temperatura inicial es preferiblemente de 100 min a 1000 min, más preferiblemente de 250 min a 500 min, lo más preferiblemente de 300 min a 400 min; la presión al principio es preferiblemente de 50 mTorr a 200 mTorr; la temperatura máxima al final de la etapa de secado primario es preferiblemente de 5 °C

a 25 ° C, más preferiblemente de 8 ° C a 22 ° C, lo más preferiblemente de 10 ° C a 20 ° C; el tiempo de residencia a la temperatura máxima de la etapa de secado primario del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 5 a 72 h, más preferiblemente de 8 a 24 h, lo más preferiblemente de 10 a 14 h; La presión al final de la etapa de secado primario del proceso de liofilización en la presente invención es preferiblemente de 37 mTorr a 112 mTorr, más preferiblemente de 50 mTorr a 90 mTorr, lo más preferiblemente de 60 mTorr a 80 mTorr.

15. Un proceso según la reivindicación 11, en el que la etapa de secado secundario es a una temperatura de 10°C a 37°C, más preferiblemente de 15°C a 35°C, lo más preferiblemente de 20°C a 30°C; el tiempo total es preferiblemente de 3 a 24 h, más preferiblemente de 4 a 16 h, lo más preferiblemente de 4 a 7 h; el tiempo de residencia de la etapa de secado secundario de la liofilización es preferiblemente de 3 a 24 h, más preferiblemente de 4 a 16 h, lo más preferiblemente de 4 a 7 h; y la presión es preferiblemente de 37 mTorr a 50 mTorr.
16. Una composición liofilizada obtenida del proceso según la reivindicación 11.
17. La composición según la reivindicación 1 o 16, en la que el volumen de reconstitución por vial, después de la liofilización es de 1 a 5,5 ml, y antes de la liofilización está preferiblemente en el rango de 4 a 25%, más preferiblemente en el rango de 6 a 20%, más preferiblemente en el rango de 8 a 16% de la composición y la concentración final de pegaspargasa está en el rango de 750 ± 20% UI/ml.

RESUMEN

UNA COMPOSICIÓN LIOFILIZADA DE PEGASPARGASA

La presente invención se refiere a una composición liofilizada de pegaspargasa, novedosa, económicamente viable y estable durante el almacenamiento. La composición comprende pegaspargasa, un crioprotector, un agente de carga, un amortiguador y puede contener opcionalmente otros excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo, pero no limitado a una sal. La composición de la presente invención es estable durante períodos prolongados en un rango significativo de temperaturas, sin la presencia de ninguna cantidad significativa de impurezas. La presente invención también se refiere a un proceso de liofilización económicamente viable y escalable para la producción de la composición estable al almacenamiento de pegaspargasa.