



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 140**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 47/16 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97919693 .8**
86 Fecha de presentación : **25.04.1997**
87 Número de publicación de la solicitud: **0909564**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.1999**

54 Título: **Preparación de una solución de eritropoyetina estabilizada con aminoácidos.**

30 Prioridad: **26.04.1996 JP 8-131226**
30.10.1996 JP 8-303956

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA**
5-1, Ukima 5-chome
Kita-ku, Tokyo 115, JP

72 Inventor/es: **Yamazaki, Tadao;**
Morita, Toshiari y
Nagai, Hiroshi

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 267 140 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

Preparación de una solución de eritropoyetina estabilizada con aminoácidos.

5 Esta invención se refiere a una preparación en disolución de eritropoyetina.

La eritropoyetina (más adelante en la presente memoria denominada como EPO) es una hormona glicoproteína ácida que promueve la diferenciación y proliferación de células progenitoras eritroides. Esta hormona se segrega principalmente por el riñón. Los eritrocitos están presentes abundantemente en la sangre durante ciertos periodos, y después son destruidos por el bazo, etc. (su vida media en humanos es de aproximadamente 120 días). Sin embargo, las células rojas de la sangre son suministradas constantemente por la médula ósea, de manera que el número de eritrocitos totales periféricos se mantiene constante en un estado normal. EPO juega un papel central en mantener dicha homeostasis de eritrocitos en el organismo vivo.

15 Se obtuvo EPO urinario humano de alta pureza mediante purificación de un gran volumen de orina procedente de pacientes con anemia aplásica. Esto permitió la clonación de los genes EPO humanos. Hoy día, se ha hecho posible producir una gran cantidad de EPO humano recombinante en células animales por tecnología de ingeniería genética. El solicitante de esta invención ha tenido éxito en producir una preparación (preparación liofilizada) de EPO purificado, y lo suministra al mercado en forma de agentes para aliviar la anemia renal y otras.

20 El diseño de fármacos para suministrar al mercado con preparaciones de EPO estables requiere que se supriman los cambios químicos (hidrólisis, reacción de intercambio de disulfuro, etc.) o los cambios físicos (desnaturalización, aglutinación, adsorción, etc.) observados con EPO. Los productos ahora en el mercado contienen albúmina de suero humano o gelatina purificada que generalmente se usa como un agente estabilizante. Estas sustancias se han añadido en estos productos para suprimir los cambios químicos o físicos. Debido a que la albúmina de suero humano es un producto sanguíneo que depende de la donación de sangre para su suministro, se ha cuestionado la necesidad de su adición. Con respecto a la adición de una proteína diferente a la albúmina o la gelatina como un agente estabilizante, es difícil evitar completamente el riesgo de contaminación viral.

30 Los fármacos de péptidos a menudo se liofilizan para estabilizarlos. Sin embargo, la liofilización aumenta los costes de fabricación, e implica un riesgo aumentado debido a problemas mecánicos.

35 Por las razones anteriores, está aumentando la demanda de una preparación de EPO como una alternativa a una preparación liofilizada, estando exenta la preparación de EPO de la inclusión de una proteína como un agente estabilizante, y estable durante el almacenamiento a largo plazo.

40 El documento EP-A-0.178.665 se refiere a una preparación de eritropoyetina que contiene uno o más agentes estabilizantes seleccionados entre el grupo que consiste en polietilén glicol, proteína, azúcar, aminoácido, sal inorgánica, sal orgánica, y un agente reductor que contiene azufre, en el que el agente estabilizador de aminoácido incluye glicina, alanina y lisina.

45 El documento EP-A-0.430.200 se refiere a un método para producir una composición farmacéutica para la administración subcutánea o intramuscular que comprende un polipéptido y al menos un aminoácido o una de sus sales, derivado u homólogos.

50 El documento EP-A-0.306.824 se refiere a una preparación de proteína humana farmacéuticamente aceptable que tiene una larga vida de anaquel que comprende una proteína humana, un tampón fisiológicamente aceptable y opcionalmente agentes quelantes, agentes de ajuste de la isotonicidad, cloruro cálcico y otros ingredientes usados generalmente para propósitos de inyección, en el que dicha preparación contiene 5 a 50 g/l de urea, 1 a 50 g/l de aminoácido así como 0,05 a 5 g/l de agente humectante no iónico.

55 El documento WO-A-9.303.744 se refiere a un procedimiento para producir medicamentos conservados que contienen proteínas humanas para propósitos de infusión o inyección, Dicho medicamento puede contener eritropoyetina así como aminoácidos específicos como agentes estabilizantes.

Los inventores han llevado a cabo estudios extensos. Como resultado, han encontrado que EPO se puede transformar en una preparación en disolución de EPO estable exenta de albúmina sérica humana y gelatina purificada añadiendo un cierto aminoácido como un agente estabilizante. Este hallazgo les ha conducido a completar la presente invención.

60 Esto es, la presente invención proporciona una preparación en disolución de eritropoyetina que contiene un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en histidina, triptófano, y serina como un agente de estabilización o estabilizante, y también se refiere al uso de uno o más aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en triptófano, serina, arginina e histidina como un agente estabilizante para una preparación en disolución de eritropoyetina, en la que dicha preparación en disolución de eritropoyetina no contiene urea.

65 En esta memoria descriptiva "para estabilizar; que estabiliza" se refiere al almacenamiento, o la preparación en disolución de eritropoyetina, por ejemplo, durante más de dos años a 10°C, o durante más de seis meses a 25°C, o

ES 2 267 140 T3

durante más de dos semanas a 40°C manteniendo la tasa residual de eritropoyetina al 90% o más alta, preferiblemente 95% o más alta, más preferiblemente 98% o más alta.

5 La Fig.1 es un gráfico que muestra la relación entre la concentración de hidrocloreuro de L-arginina y la tasa de eritropoyetina residual;

La Fig. 2 es un gráfico que muestra la relación entre la concentración de hidrocloreuro de L-lisina y la tasa de eritropoyetina residual;

10 La Fig. 3 es un gráfico que muestra la relación entre la concentración de hidrocloreuro de L-histidina y la tasa de eritropoyetina residual; y

15 La Fig. 4 muestra un modelo de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida que ilustra el efecto supresor de degradación del producto en preparaciones en las que se han añadido diversos aminoácidos (un electroforetograma), en el cual:

banda 1: marcador de peso molecular,

20 banda 2: preparación exenta de aminoácido,

banda 3: preparación que contiene L-leucina,

banda 4: preparación que contiene L-fenilalanina

25 banda 5: preparación que contiene L-triptófano

banda 6: preparación que contiene L-serina

30 banda 7: preparación que contiene L-cisteína

banda 8: preparación que contiene L-glutamato monosódico monohidrato,

banda 9: preparación que contiene hidrocloreuro de L-arginina, y

35 banda 10: preparación que contiene hidrocloreuro de L-histidina.

EPO que se ha de usar en la preparación en disolución de la presente invención tiene sustancialmente la misma actividad biológica que el de los mamíferos, especialmente, EPO humano, e incluye EPO de procedencia natural y EPO obtenido por recombinación genética. EPO procedente de recombinación genética incluye EPO que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el EPO de procedencia natural, o EPO con esta secuencia de aminoácidos en la que se ha eliminado uno o más de los aminoácidos, o en el que se ha sustituido uno o más de los aminoácidos, o en el que se ha añadido uno o más aminoácidos, y que, sin embargo, retiene la actividad biológica mencionada anteriormente. EPO en la presente invención se puede producir por cualquiera de los métodos, por ejemplo, un método que comprende extracción a partir de la orina humana, seguido por separación y purificación, de diversas maneras; y un método que implica la producción en *E. coli*, levadura, o células de ovario de hámster chino, seguido por extracción, separación y purificación de diversas maneras.

50 El aminoácido añadido como un estabilizante en la presente invención incluye aminoácidos libres, y sus sales tales como las sales sódicas, sales potásicas e hidrocloreuros. La preparación en disolución de la presente invención puede tener uno o más de estos aminoácidos añadidos en combinación. Los aminoácidos son formas DL y DL de triptófano, serina, arginina e histidina y sus sales. Más preferiblemente son L-triptófano, L-arginina y L-histidina y sus sales. Son particularmente preferibles L-histidina y sus sales.

55 La preparación en disolución de la presente invención, preferiblemente está sustancialmente exenta de proteína como un agente estabilizante.

60 Para la cantidad de aminoácido añadido a la preparación en disolución, de la presente invención, puede establecerse un intervalo preferido mediante un método de ensayo (que se describe más adelante) dependiendo del tipo de aminoácido usado. Generalmente, la cantidad de aminoácido añadido es 0,001 a 50 mg/ml, pero preferiblemente 0,1 a 40 mg/ml, más preferiblemente 1 a 10 mg/ml para arginina, preferiblemente 0,5 a 10 mg/ml, más preferiblemente 1,0 a 4,0 mg/ml, y lo más preferiblemente 1,0 a 2,0 mg/ml de histidina. Como se describirá más adelante, la mayor tasa residual de EPO se obtuvo cuando se añadieron hidrocloreuro de L-arginina e hidrocloreuro de L-lisina en una cantidad para cada uno de aproximadamente 1 a 5 mg/ml como aminoácido libre, o cuando se añadió hidrocloreuro de L-histidina en una cantidad, como aminoácido libre, de 1 a 10 mg/ml en un ensayo acelerado realizado durante dos 65 semanas, o 0,5 a 5 mg/ml en un ensayo acelerado de 6 meses a 25°C.

La cantidad de EPO contenida en la preparación en disolución de la presente invención se puede determinar según el tipo de enfermedad que se ha de tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, y así sucesivamente.

ES 2 267 140 T3

Generalmente, su cantidad es 100 a 500.000 IU/ml, preferiblemente 200 a 100.000 IU/ml, más preferiblemente 750 a 72.000 IU/ml. La preparación en disolución de la presente invención se administra normalmente por una vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección (subcutánea o intravenosa), o percutánea, transmucosa o transnasalmente, pero también es posible la administración oral.

La preparación en disolución de la presente invención puede contener, además de EPO y del aminoácido, ingredientes que se añaden normalmente a una preparación en forma de una disolución, tales como polietilén glicol; azúcares, por ejemplo, dextrano, manitol, sorbitol, inositol, glucosa, fructosa, lactosa, xilosa, manosa, maltosa, sacarosa, y rafinosa; sales inorgánicas, por ejemplo, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, fosfato sódico, fosfato potásico, e hidrogenocarbonato sódico; sales orgánicas, por ejemplo, citrato sódico, citrato potásico y acetato sódico; y, si se desea, agentes reductores que contienen azufre, por ejemplo, glutatióna, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, α -monotioglicerol, y tiosulfato sódico. La sal preferida es cloruro sódico. También se prefiere añadir un agente que evite la adsorción, tal como un éster alquílico de polioxietilén sorbitan, a la preparación en disolución de la presente invención. Ésteres alquílicos de polioxietilén sorbitan particularmente preferidos son polisorbato 20, 21, 40, 60, 65, 80, 81 y 85, y lo más preferiblemente, polisorbato 20 y/o 80. La cantidad preferida de polisorbato 20 y/o 80 añadido es 0,01 a 1 mg/ml, más preferiblemente 0,05 a 0,1 mg/ml.

La preparación en disolución de la presente invención se puede preparar disolviendo los componentes anteriormente mencionados en un tampón acuoso públicamente conocido en el campo de las preparaciones en disolución, tal como tampón fosfato y/o citrato. El tampón de fosfato preferido es un tampón fosfato monohidrógeno de sodio-fosfato dihidrógeno de sodio, mientras que el tampón de citrato preferido es un tampón de citrato sódico. El pH de la preparación en disolución de la presente invención es 5,0 a 8,0, preferiblemente 6,0 a 7,0.

La publicación de patente japonesa sin examinar número 64-71.818 describe una preparación de proteína humana caracterizada por que contiene urea, un aminoácido, y un agente humectante no iónico. Sin embargo, la preparación en disolución de la presente invención preferiblemente no contiene urea, porque no está claro que la urea contribuya a la estabilización a largo plazo de una plicoproteína tal como eritropoyetina. También se sabe que tiene lugar una reacción entre los productos de degradación de la urea y la proteína (Protein Chemistry 3, Kyoritsu Shuppan, Capítulo 12) que puede afectar adversamente a la preparación. Además, cuantos menos ingredientes se añadan a la preparación, mejores resultados se pueden esperar.

La preparación en disolución de la presente invención normalmente está contenida en un recipiente sellado de plástico o vidrio esterilizado. la preparación en disolución se puede administrar como una dosis prescrita en una ampolla, vial o jeringa desechable, o en una forma de dosificación múltiple tal como una bolsa o botella para inyección.

Se prepararon preparaciones en disolución de EPO que contenían diverso aminoácidos, y se sometieron a un ensayo acelerado llevado a cabo durante dos semanas a 40°C. Se midió el contenido de EPO en cada una de las preparaciones después del ensayo por RP-HPLC (cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa) para investigar el efecto de la adición de aminoácido en este contenido. Como resultado, se encontró que la tasa residual de EPO era más alta en las preparaciones en disolución que contenían L-leucina, L-triptófano, L-glutamato monosódico monohidrato, hidrocloreuro de L-arginina, hidrocloreuro de L-histidina, e hidrocloreuro de L-lisina que en las preparaciones en disolución que no contenían aminoácidos. Los resultados de la electroforesis en gel SDS-poliacrilamida demostraron que hidrocloreuro de L-arginina e hidrocloreuro de L-histidina eran efectivos en suprimir la formación de los productos de degradación de EPO que se observó en la preparación después del ensayo acelerado.

De los aminoácidos que demostraron así ser efectivos cuando se añadieron, se examinaron hidrocloreuro de L-arginina, hidrocloreuro de L-lisina e hidrocloreuro de L-histidina para el efecto de su concentración en la estabilización de la preparación. Esto es, se hicieron preparaciones de EPO a las que se les añadió hidrocloreuro de L-arginina, hidrocloreuro de L-lisina e hidrocloreuro de L-histidina en diversas concentraciones, y se llevó a cabo un ensayo acelerado de dos semanas a 40°C de estas preparaciones. Después de completarse el ensayo, las tasas residuales de EPO en las preparaciones tienden al máximo a concentraciones de aproximadamente 1 a 5 mg/ml en el caso de hidrocloreuro de L-arginina e hidrocloreuro de L-lisina. Con hidrocloreuro de L-histidina, la tasa máxima de EPO residual se alcanzó a una concentración de 1 a 10 mg/ml. También se llevó a cabo un ensayo acelerado de 6 meses a 25°C en preparaciones de EPO a las que se añadió hidrocloreuro de L-histidina en diversas concentraciones. La tasa residual de EPO fue máxima a concentraciones de 0,5 a 5 mg/ml. Estos hallazgos mostraron la concentración óptima de adición para hidrocloreuro de L-arginina, hidrocloreuro de L-lisina e hidrocloreuro de L-histidina. La preparación en disolución de EPO de la presente invención es una preparación segura exenta de proteínas extrañas tales como albúmina de suero humano o gelatina purificada, y sin el riesgo de contaminación viral. El aminoácido añadido a ella es más barato que estos agentes estabilizantes convencionales, y el coste incurrido durante el procedimiento de fabricación también es más bajo que para un producto liofilizado. Así, la preparación de esta invención es económicamente ventajosa. Además, la preparación en disolución de la presente invención no necesita disolverse en un tampón, ya que puede usarse como tal. Esto reduce el trabajo al usarlo en comparación con una preparación liofilizada. Debido a estas ventajas diversas, la aplicabilidad industrial de la presente invención es grande.

La presente invención se describirá ahora con mayor detalle por referencia a los siguientes ejemplos, pero no por ello se restringe su alcance.

ES 2 267 140 T3

Ejemplos

Método de ensayo

5 Un vial de vidrio de 5 ml se cargó con 1 ml de una disolución de administración que contenía los siguientes componentes/ml y ajustada a pH 6,0 con un tampón de fosfato 10 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.):

10	EPO	1.500 IU
	Agente tensioactivo no iónico (polisorbato 80, Nikko Chemical Co., Ltd.)	0,05 mg
	Cloruro sódico	8,5 mg
	Aminoácido (Sigma Chemical Company)	0 a 40 mg

15 El vial lleno se cerró, selló, y se usó como una preparación en disolución. Como un ensayo acelerado, la preparación se mantuvo durante dos semanas en una cámara termostática a 40°C. Después, la preparación se evaluó por análisis RP-HPLC (WATERS) y análisis por electroforesis en gel SDS-poliacrilamida.

20 Ejemplo 1

Efecto de la adición de diversos aminoácidos en la tasa de EPO residual

25 De acuerdo con el método de ensayo anterior, se hicieron preparaciones en disolución que contenían diversos aminoácidos tabulados anteriormente, y se sometieron a un ensayo acelerado de dos semanas a 40°C. Después, se determinaron sus tasas de EPO residual por el método de RP-HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 1

30 TABLA 1

Tasas de EPO residual después del ensayo acelerado de diversas preparaciones en disolución que contenían aminoácidos

35	Aminoácido	Cantidad añadida (mg/ml)	Tasa de EPO residual después del ensayo acelerado de dos semanas a 40°C (% del contenido inicial)
40	No añadido	0	83,9
	L-leucina	10	91,6
	L-fenilalanina	10	57,8
45	L-triptófano	5	97,0
	L-serina	10	85,2
50	L-cisteína	10	47,1
	L-glutamato monosódico monohidrato	10	93,9
	Hidrocloruro de L-arginina	10	93,6
55	Hidrocloruro de L-histidina	10	99,7
	Hidrocloruro de L-lisina	10	95,8

60 Como se muestra arriba, L-leucina, L-triptófano, L-glutamato monosódico monohidrato, hidrocloruro de L-arginina, hidrocloruro de L-histidina, e hidrocloruro de L-lisina produjeron unas tasas de EPO residual particularmente acusadas.

65 L-glutamato monosódico monohidrato, L-leucina, L-fenilalanina, L-cisteína e hidrocloruro de L-lisina no están comprendidos en la materia objeto reivindicada en la presente solicitud.

ES 2 267 140 T3

Ejemplo 2

Efecto de la adición de un aminoácido a varias concentraciones en la tasa de EPO residual

5 De acuerdo con el método de ensayo anterior, se hicieron preparaciones en disolución que contenían hidrocloreto de L-arginina a diversas concentraciones indicadas a continuación, y se sometieron al mismo ensayo acelerado de dos semanas a 40°C. Después, se determinaron sus tasas de EPO residual por el método de RP-HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

10

TABLA 2

Tasas de EPO residual después del ensayo acelerado de preparaciones que contenían hidrocloreto de L-arginina

15 Aminoácido	Cantidad añadida (mg/ml)	Tasa de EPO residual después del ensayo acelerado de dos semanas a 40°C (% del contenido inicial)
20 No añadido	0	89,6
25 Hidrocloreto de L-arginina	0,1	92,7
	1	96,7
	5	96,1
	10	93,6
	20	92,0
	30 40	91,6

35

Los resultados anteriores se representan como un gráfico en la Fig. 1.

Como se muestra arriba, hidrocloreto de L-arginina produjo unas tasas máximas de EPO residual en un intervalo de concentraciones de aproximadamente 1 a 5 mg/ml.

40

Después, se llevó a cabo el mismo ensayo usando hidrocloreto de L-lisina. Las cantidades de hidrocloreto de L-lisina añadidas y las tasas de EPO residual después del ensayo acelerado se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Tasas de EPO residual después del ensayo acelerado de preparaciones que contenían hidrocloreto de L-lisina

45

50 Aminoácido	Cantidad añadida (mg/ml)	Tasa de EPO residual después del ensayo acelerado de dos semanas a 40°C (% del contenido inicial)
50 No añadido	0	88,7
55 Hidrocloreto de L-lisina	0,5	93,1
	1	95,8
	5	96,3
	60 10	90,2

Los resultados anteriores se representan en un gráfico en la Fig. 2.

65 Como se muestra arriba, hidrocloreto de L-lisina produjo unas tasas máximas de EPO residual en un intervalo de concentraciones de aproximadamente 1 a 5 mg/ml.

Después, se llevó a cabo el mismo ensayo usando hidrocloreto de L-histidina. Las cantidades de hidrocloreto de L-histidina añadidas y las tasas de EPO residual después del ensayo acelerado se muestran en la Tabla 4.

ES 2 267 140 T3

TABLA 4

Tasas de EPO residual después del ensayo acelerado de preparaciones que contenían hidrocloreuro de L-histidina

Aminoácido	Cantidad añadida (mg/ml)	Tasa de EPO residual después del ensayo acelerado de dos semanas a 40°C (% del contenido inicial)
No añadido	0	91,5
Hidrocloreuro de L-histidina	0,5	95,5
	1	97,3
	5	98,1
	10	99,7

Los resultados anteriores se representan en un gráfico en la Fig. 3.

Como se muestra arriba, hidrocloreuro de L-histidina produjo unas tasas máximas de EPO residual en un intervalo de concentraciones de aproximadamente 1 a 10 mg/ml.

De acuerdo con el método de ensayo anteriormente mencionado, se hicieron preparaciones en disolución de EPO que contenían hidrocloreuro de L-histidina a diversas concentraciones indicadas a continuación, y se sometieron a un ensayo acelerado de 6 meses a 25°C. Después, se determinaron sus tasas de EPO residual por el método de RP-HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Tasas de EPO residual después del ensayo acelerado de preparaciones que contenían hidrocloreuro de L-histidina

Aminoácido	Cantidad añadida (mg/ml)	Tasa de EPO residual después del ensayo acelerado de 6 meses a 25°C (% del contenido inicial)
No añadido	0	93,2
Hidrocloreuro de L-histidina	0,5	99,3
	1	99,9
	5	97,9
	10	94,1

Como se muestra arriba, hidrocloreuro de L-histidina produjo unas tasas máximas de EPO residual en un intervalo de concentraciones de aproximadamente 0,5 a 5 mg/ml, especialmente a una concentración de 1 mg/ml.

Ejemplo 3

Efecto de la adición de diversos aminoácidos en los productos de la degradación de EPO

De acuerdo con el método de ensayo anteriormente mencionado, se hicieron preparaciones en disolución de EPO que contenían diversos aminoácidos, y se sometieron a un ensayo acelerado de dos semanas a 40°C. Después, se investigó la formación de los productos de la degradación de EPO por el método de análisis de electroforesis en gel SDS-poliacrilamida.

1) Preparación de la muestra

Después del ensayo acelerado, se añadió tampón TRIS-clorhídrico 1M (pH 6,8) que contenía SDS, glicerina, y azul de bromofenol a cada una de las preparaciones en disolución de EPO que contenían cada uno de los aminoácidos indicados en la Tabla 1 del Ejemplo 1. La mezcla se calentó durante 15 minutos a 60°C para usar como una disolución de muestra.

ES 2 267 140 T3

2) *Electroforesis*

La misma disolución (10 μ l) se sometió a electroforesis en las siguientes condiciones de operación:

- 5 a) Equipamiento: Aparato de electroforesis en gel Slab (Bio-Rad Laboratories).
- b) Gel de electroforesis: SDS-PAGEmini8-16 (gel de gradiente de concentración en concentraciones de poliacrilamida de 8 a 16%, Tefco)
- 10 c) Temperatura de electroforesis: 25°C
- d) Condiciones de electroforesis: Corriente constante 25 mA/gel

3) *Método de tinción (transferencia western)*

15 El gel de electroforesis se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Después, se usaron antisuero de conejo anti-EPO, anticuerpo de cabra IgG anti-conejo marcado con biotina, y peroxidasa de rábano biotinilado para el desarrollo del color con 3,3'-diaminobencidina-peróxido de hidrógeno como sustrato.

20 4) *Resultados*

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4. Comparada con la preparación exenta de aminoácidos (banda 2), la preparación que contenía L-glutamato monosódico monohidrato (banda 8), la preparación que contenía hidrocloreuro de L-arginina (banda 9) y la preparación que contenía hidrocloreuro de L-histidina (banda 10) mostraron el marcado efector de suprimir la formación de los productos de degradación de EPO.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación en disolución de eritropoyetina, que contiene como un agente estabilizante uno o más aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en histidina, triptófano y serina, y sus sales.
2. La preparación en disolución de la reivindicación 1, en la que el agente estabilizante es uno o más aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en L-histidina, L-triptófano, y L-serina, y sus sales.
- 10 3. La preparación en disolución de la reivindicación 1, en la que el agente estabilizante es uno o más aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en histidina y triptófano, y sus sales.
4. La preparación en disolución de la reivindicación 1, en la que el agente estabilizante es histidina y/o sus sales.
- 15 5. La preparación en disolución de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la concentración del aminoácido es 0,1 a 40 mg/ml.
6. La preparación en disolución de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la concentración de la histidina es 0,5 a 5 mg/ml.
- 20 7. La preparación en disolución de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que no incluye urea.
8. La preparación en disolución de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que no contiene una proteína como un agente estabilizante.
- 25 9. La preparación en disolución de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que contiene adicionalmente un agente tensioactivo.
10. La preparación en disolución de la reivindicación 9, en la que el agente tensioactivo es un éster alquílico de polioxietilén sorbitan.
- 30 11. La preparación en disolución de la reivindicación 9, en la que el agente tensioactivo es polisorbato 20 y/o 80.
12. La preparación en disolución de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que contiene adicionalmente una sal.
- 35 13. La preparación en disolución de la reivindicación 12, en la que la sal es cloruro sódico.
14. La preparación en disolución de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que se ha disuelto en un tampón.
- 40 15. La preparación en disolución de la reivindicación 14, en la que el tampón es un tampón de fosfato y/o un tampón de citrato.
16. Un método para estabilizar una preparación en disolución de eritropoyetina, que comprende añadir un agente estabilizante que contiene uno o más aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en triptófano, histidina y serina, y sus sales, a la preparación en disolución de eritropoyetina.
- 45 17. Un método para estabilizar una preparación en disolución de eritropoyetina, que comprende añadir un agente estabilizante que contiene uno o más aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en triptófano, serina, arginina e histidina, y sus sales, y que no contiene urea, a la preparación en disolución de eritropoyetina
- 50 18. Uso de uno o más aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en triptófano, serina, arginina e histidina, y sus sales como un agente estabilizante para una preparación en disolución de eritropoyetina, en la que dicha preparación en disolución de eritropoyetina no contiene urea.

55

60

65

Fig. 1

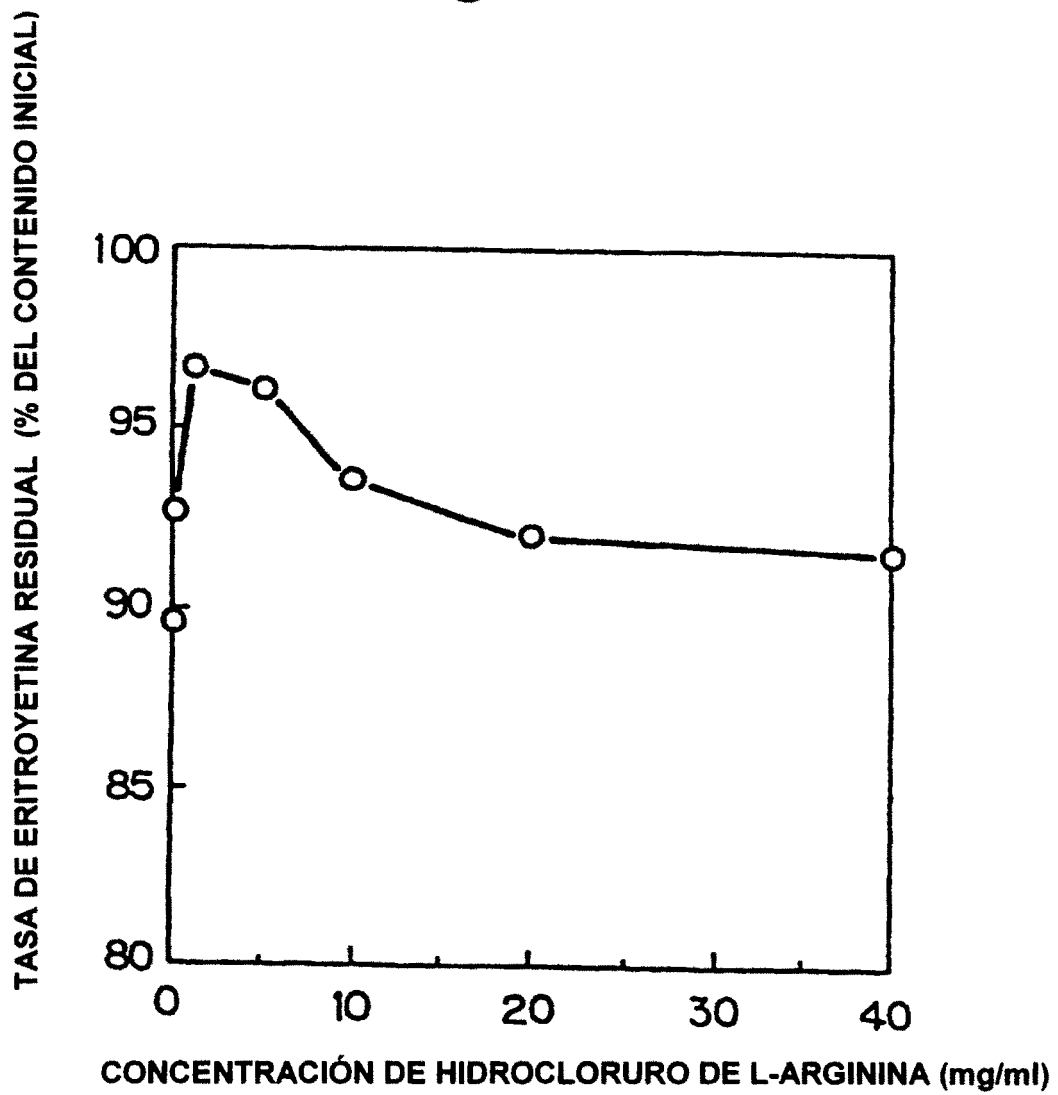


Fig. 2

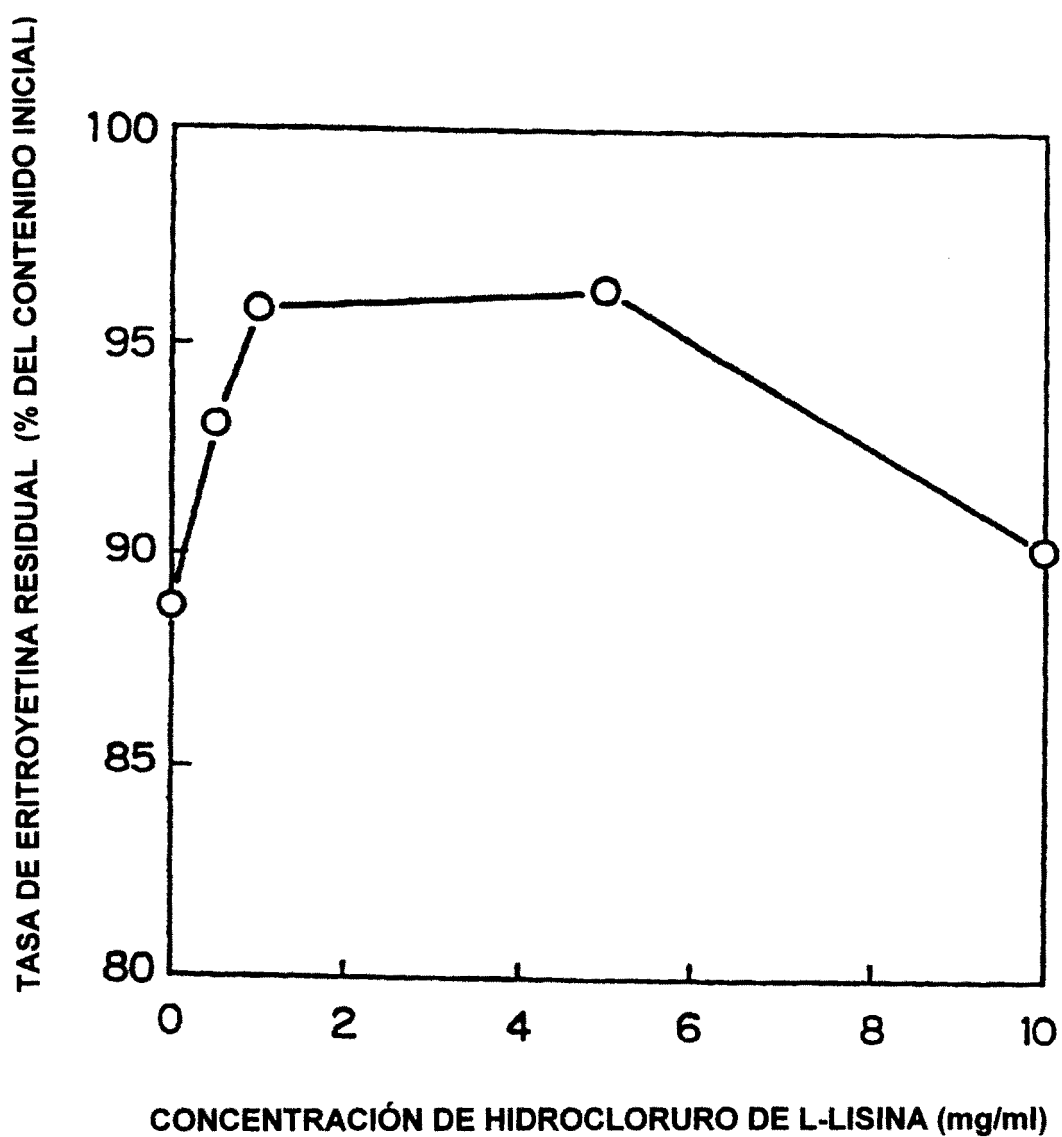


Fig. 3

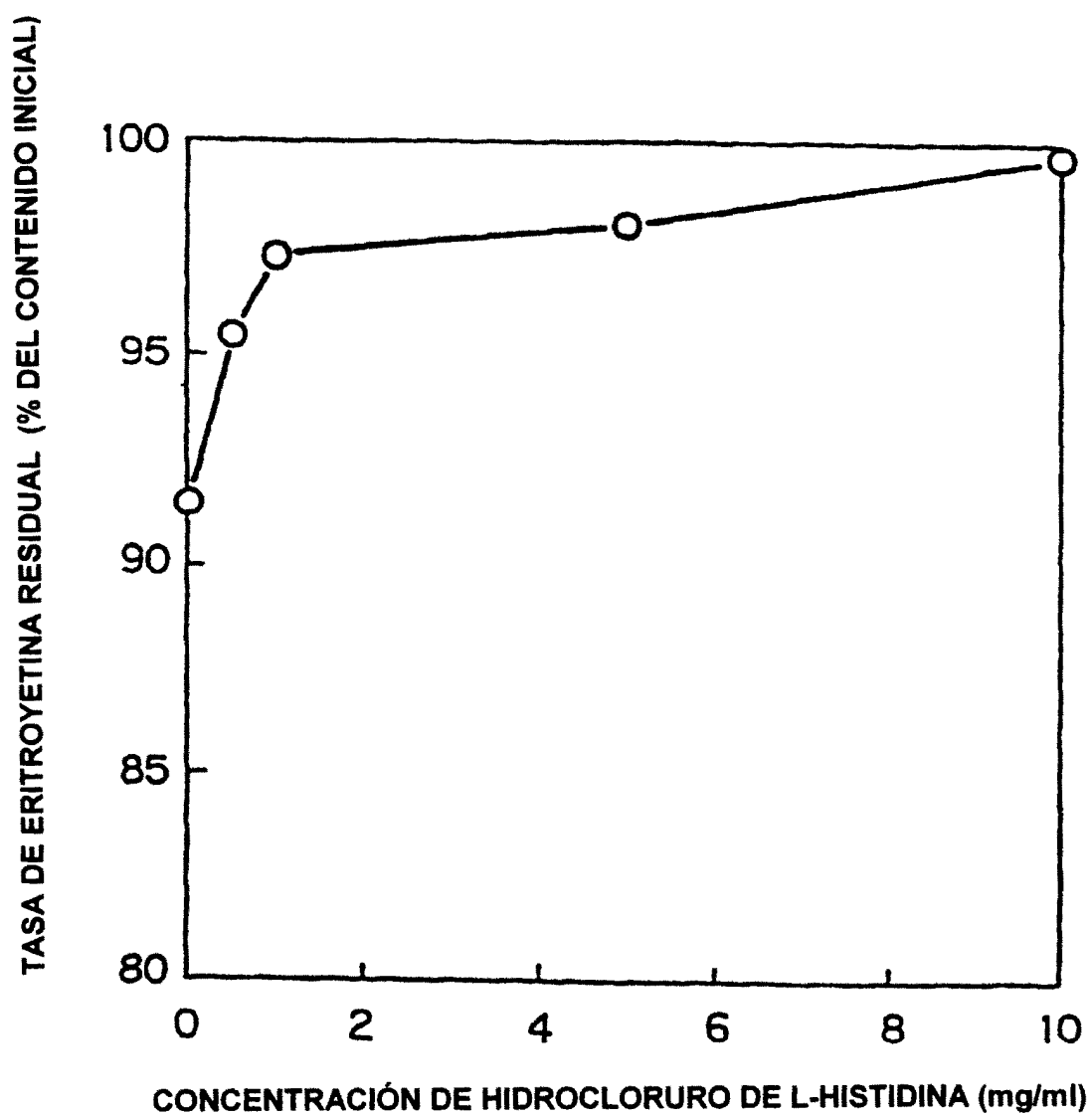


Fig. 4

