

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 443**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09782562 .4**

96 Fecha de presentación: **03.09.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2337580**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2011**

54 Título: **Composiciones estabilizadas para factor VIII producido de manera recombinante**

30 Prioridad:
03.09.2008 US 136402 P
03.09.2008 EP 08163554

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2012

73 Titular/es:
Octapharma AG
Seidenstrasse 2
8853 Lachen, CH

72 Inventor/es:
RIPPNER, Brita;
ÖSTERBERG, Josefin;
NILSSON, Ulrika;
IVARSSON, Elsa y
AGERKVIST, Irène

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 382 443 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones estabilizadas para factor VIII producido de manera recombinante.

5 La presente invención se refiere a formulaciones liofilizadas con capacidad para proteger el factor VIII (factor-r VIII), producido de manera recombinante, de alta pureza. La invención se refiere también a formulaciones líquidas del factor-r VIII antes de la liofilización y después de la reconstitución de la formulación sólida liofilizada a un líquido inyectable.

10 El factor VIII es una proteína esencial del plasma sanguíneo, implicada en el proceso de coagulación de la sangre. Un déficit de este factor de coagulación resulta en hemofilia A, una enfermedad potencialmente mortal que debe ser tratada mediante una terapia de reemplazo de factor VIII. Tradicionalmente, se han usado concentrados de factor VIII (factor-p VIII) purificado, derivado de plasma, para una terapia de reemplazo. Más recientemente, se dispone del factor VIII (factor-r VIII), producido de manera recombinante, que proporciona un suministro independientemente de la donación de plasma, reduciendo el riesgo de enfermedades transmitidas por virus.

15 El factor VIII es una molécula compleja y una proteína muy sensible, asociada con la pérdida de actividad con el tiempo. En la sangre, otras proteínas sanguíneas, tales como albúmina de suero humano (HSA) y el factor de von Willebrand (vWF) ayudan a preservar la actividad coagulante del factor VIII. Sin embargo, es deseable evitar la presencia de proteínas obtenidas mediante purificación de plasma sanguíneo en las formulaciones farmacéuticas del factor-r VIII, debido al riesgo de transmisión del virus. De esta manera, es esencial proporcionar composiciones de otros excipientes farmacéuticamente aceptables para proteger el factor-r VIII contra la degradación física y química y la acumulación, que causan pérdida de actividad. Una técnica, usada comúnmente para prevenir la pérdida de actividad de la proteína durante un almacenamiento a largo plazo, es preparar formulaciones farmacéuticas sólidas secas mediante liofilización (secado por congelación). Los excipientes farmacéuticos deben proteger también el factor VIII durante el procedimiento farmacéutico, durante un almacenamiento a largo plazo y después de la reconstitución de la formulación liofilizada a una solución para su administración.

20 La secuencia de ADN del factor VIII se divide en seis dominios; tres dominios A, dos dominios C y un dominio B, y la proteína contiene sitios de interacción para otros factores de coagulación, vWF, fosfolípidos e iones metálicos. La forma activa más pequeña de la proteína del factor VIII carece del dominio B y está compuesta de una cadena ligera de 80 kDa, asociada con una cadena pesada de 90 kDa (Wang W. et al, 2003). Los productos farmacéuticos de factor-r VIII, tanto de longitud completa (Kogenate[®], Bayer, Helixate[®], CSL Behring, Recombinate[®], Baxter y Advate[®], Baxter) como con dominio B eliminado (ReFacto[®], Wyeth y Xyntha[®], Wyeth), se comercializan en la actualidad.

30 En una formulación farmacéutica del factor VIII, todos los componentes deben ser seleccionados cuidadosamente. Cada excipiente proporciona una función protectora para mantener un alto rendimiento del factor VIII a lo largo de todo el procedimiento farmacéutico, el almacenamiento a largo plazo y, finalmente, la reconstitución y la administración al paciente. Además, se considera la seguridad clínica de todos los excipientes.

El propósito de la liofilización (Manning, MC et al, 1989, Tang, X. et al, 2004, Schwegman, J. J. et al, 2005) es eliminar el agua de la formulación, ya que, frecuentemente, se producen reacciones físicas y químicas adversas en la fase acuosa.

35 Se requieren criol/lioprotectores para proteger la proteína durante el procedimiento de liofilización y durante el almacenamiento, formando una matriz amorfa que rodea la proteína.

Se incluye un agente de carga para que funcione como un elemento formador de torta para proporcionar un soporte mecánico durante la liofilización y para aumentar el peso en seco del producto farmacéutico. De esta manera, el agente de carga contribuye a proporcionar una calidad uniforme y la apariencia de un producto liofilizado.

40 Puede añadirse un agente tampón para mantener el pH a un valor adecuado para la proteína y para el uso terapéutico del producto.

45 Debido a la alta potencia del factor VIII, la concentración de factor VIII en soluciones terapéuticas es baja. Además, el factor VIII se absorbe fácilmente en las superficies, lo que convierte la absorción superficial en una fuente principal de pérdida de actividad durante la fabricación y después de la reconstitución del producto. Para los productos de factor VIII, comercializados en la actualidad, se afirma, normalmente, que un agente tensoactivo es usado por encima de su concentración micelar crítica (cmc), que es la concentración de la solución a la que el agente tensoactivo forma agregados micelares. Los valores cmc de los detergentes no iónicos, que contienen polioxietileno, son dependientes de la temperatura, en el sentido de que el valor cmc se hace mayor a temperaturas más bajas (Alexandridis, P. et al, 1994, Nilsson, M. et al, 2007). El valor cmc de Poloxamer 188 es al menos de 20-30 mg/ml a 37°C (Kabanov, A.V. et al, 1995, Alexandridis, P. et al, 1994, Moghimi, S.M. et al, 2004) y aumenta a 100 mg/ml a 20°C (Nakashima, K. et al, 1994). De esta manera, según estos informes, el valor cmc de Poloxamer 188 se encuentra dentro del intervalo de 20-100 mg/ml a 25°C.

Se ha demostrado que los iones metálicos están implicados en la asociación de las cadenas ligera y pesada del factor VIII

(Wang W et al, 2003) y, por lo tanto, los iones de calcio (Ca^{2+}) están presentes, normalmente, en las formulaciones de factor VIII, para mantener la asociación del complejo de las cadenas de 80 y 90 kDa.

Se han realizado considerables esfuerzos para encontrar formulaciones de factor VIII adecuadas, por ejemplo:

- 5 Una publicación de Österberg et al (1997) describe una formulación que comprende cloruro de sodio como agente de carga, en combinación con un tensoactivo, cloruro de calcio y sacarosa como estabilizador e histidina como agente tampón.
- El documento US-B-7247707 (Besman et al) divulga formulaciones libres de albúmina que comprenden de 300 a 500 mM de cloruro sódico, del 1 al 4% de un estabilizador seleccionado entre el grupo consistente en sacarosa, trehalosa, rafinosa y arginina, de 1 a 5 mM de CaCl_2 , y un agente tampón, preferentemente histidina. Se incluye también un tensoactivo en la composición, en una concentración de hasta el 0,1%.
- 10 El documento US-A-5874408 (Nayar) describe una formulación de factor VIII recombinante, que comprende glicina, histidina, sacarosa, CaCl_2 y pequeñas cantidades de cloruro de sodio. Nayar descubrió que la histidina, que se incluye como agente tampón en todas las preparaciones de factor-r VIII, disponibles comercialmente en la actualidad, tenía un efecto desestabilizador en las formulaciones liofilizadas de factor VIII. Sin embargo, este efecto fue superado mediante la adición de sales, glicina y sacarosa.
- 15 El documento US-A-4877608 (Lee et al) describe el uso de una formulación proteínica de factor VIII, altamente purificada, en una solución acuosa que consiste, esencialmente, en factor VIII terapéuticamente activo, con una actividad de al menos 130 IU/mg; de 0,4 a 1,2 M de cloruro de sodio, cloruro de potasio o sus mezclas; de 1,5 a 40 mM de cloruro de calcio y de 1 a 50 mM de histidina y, opcionalmente hasta el 10% de un azúcar seleccionado de entre el grupo que consiste en manitol, sacarosa y maltosa.
- 20 El documento US-A-2005/0256038 (White et al) enseña una composición liofilizada de factor VIII, que comprende un agente tensoactivo, cloruro de calcio, sacarosa, cloruro de sodio, citrato de trisodio y un tampón sin aminoácidos.
- El documento WO-A-99/10011 (Kanellos et al) divulga formulaciones tratadas térmicamente para factor VIII de plasma, con alta pureza. La formulación comprende una cantidad estabilizante efectiva de sacarosa, trehalosa y al menos un aminoácido. El aminoácido preferente es lisina, pero otros que pueden ser usados son isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, alanina, arginina, histidina, prolina, serina y glicina.
- 25 El documento EP-A-1016673 (Österberg et al) enseña el uso de formulaciones que comprenden un tensoactivo no iónico como un estabilizador y factor VIII que tiene una actividad específica de más de 5.000 IU/mg. Además, se afirma que la concentración de tensoactivo debería ser superior a la concentración micelar crítica, en una cantidad de al menos 0,01 mg/ml.
- El documento US-B-6887852 (Paik et al) describe una formulación liofilizada de factor VIII, que comprende una mezcla de L-arginina, L-isoleucina y ácido L-glutámico como un estabilizador. La formulación básica comprende pequeñas cantidades de cloruro de sodio, cloruro de calcio e histidina. No se añade ningún agente tensoactivo a la composición, ya que la formulación, tal como se divulga, muestra una mejor estabilidad en comparación con las formulaciones que comprenden tensoactivo.
- 30 El documento US-A-5565427 (Freudenberg) enseña el uso de una solución estable de factor VIII que comprende un detergente y un aminoácido o una de sus sales. La actividad específica de la proteína es de al menos 2.000 IU/mg.
- 35 El documento US-A-5328694 (Schwinn) divulga una solución inyectable estable que comprende factor VIII purificado derivado de plasma y una combinación de disacáridos y uno o más aminoácidos. Preferentemente, el aminoácido es glicina o lisina.
- La presente invención se refiere a composiciones de factor VIII (factor-r VIII), producido recombinantemente, de alta pureza. Las composiciones están libres de histidina. Con el fin de ejercer los máximos efectos de protección, las composiciones de la presente invención están basadas en selecciones intencionadas de excipientes, tales como un crioliprotector, un agente de carga y un agente tensoactivo. Es posible que cada excipiente añadido no pueda ejercer sus efectos protectores en todas las etapas, es decir, durante el procedimiento farmacéutico, el almacenamiento a largo plazo y durante la reconstitución y la administración.
- 40 Las formulaciones liofilizadas de la presente invención no se limitan a tener el mismo volumen de llenado y volumen de reconstitución. Para una persona con conocimientos en la materia, será evidente que el producto formulado puede ser reconstituido también a una forma más diluida.
- 45 La presente invención está relacionada con una composición según la reivindicación 1, que tiene una capacidad para proteger el factor VIII, producido de manera recombinante.
- Las composiciones de factor-r VIII, libres de histidina, según la presente invención incluyen generalmente una combinación de arginina y sacarosa; un agente de carga que es el cloruro de sodio o arginina; un agente tensoactivo; y, opcionalmente, un agente tampón de pH. La expresión "sin histidina", cuando aparece en los presentes contextos, no se referirán a
- 50

composiciones "carentes de histidina", ya que pequeñas cantidades pueden seguir a la sustancia de fármaco a granel desde las etapas de fabricación anteriores, sino que indicará que no se ha añadido histidina durante el procesamiento farmacéutico. La histidina se usa, frecuentemente, como agente tampón en las composiciones de factor VIII y aunque algunas fuentes informan acerca de un efecto estabilizador sobre el factor VIII (documento EP-A-1016673, Österberg et al), otras fuentes informan acerca de un efecto desestabilizador en formulaciones de factor VIII (documento US-A- 5874408, Nayar). La presente invención, cuando sea apropiado, usa citrato de sodio, ácido maleico o Tris(tris(hidroximetil)aminometano) como un agente de tampón de pH. El agente tampón es, por ejemplo, citrato de sodio, presente en una cantidad para mantener un pH comprendido entre 6,5 y 7,5. Una forma adecuada del citrato de sodio es la sal dihidrato. Generalmente, las composiciones según la invención pueden estar en forma liofilizada, pero están representadas también por soluciones tales como una solución para ser liofilizada y una solución reconstituida a partir de una composición liofilizada.

Las composiciones pueden comprender además cloruro de calcio, en una cantidad de aproximadamente 0,5 a 10 mM, para mejorar la estabilización específica de la molécula de factor VIII. Las composiciones pueden comprender además otros compuestos como antioxidantes, tales como glutatión o metionina.

Se denomina agente de carga a un excipiente presente en la formulación para proporcionar un soporte mecánico a la torta liofilizada y para aumentar el peso seco. El agente de carga puede estar en un estado cristalino, como cloruro de sodio, o en un estado amorfo, como arginina.

Se denomina agente tampón de pH a un compuesto con una capacidad tamponadora en el intervalo de pH entre aproximadamente pH 5 y 9. La capacidad tamponadora se refiere a un valor pKa del agente tampón dentro de dicho intervalo de pH.

Se denomina proveedor de fuerza iónica a un compuesto iónico que está presente en la formulación para aumentar la fuerza iónica.

Un crio- y lioprotector (crio/lioprotector) es un compuesto presente en la formulación para reducir o incluso prevenir la pérdida de actividad de la proteína durante las etapas de congelación y secado de un procedimiento de liofilización y durante el almacenamiento subsiguiente del producto liofilizado.

Un agente tensoactivo hará referencia a un compuesto que es adsorbido en las superficies y las interfaces y, de esta manera, contrarresta la pérdida de actividad de factor VIII debida a la adsorción. Este tipo de pérdida de actividad puede ocurrir durante todo el procesamiento farmacéutico, así como durante la manipulación del producto reconstituido previamente a y durante la administración a un paciente. Algunos agentes tensoactivos forman agregados micelares en solución. La concentración micelar crítica de un agente tensoactivo es la concentración por encima de la cual se forman micelas.

Una composición protectora de factor VIII hace referencia a una formulación compuesta de excipientes seleccionados, en la que cada uno de los excipientes proporciona una función protectora para mantener un alto rendimiento de factor VIII en todo el procesamiento farmacéutico, almacenamiento a largo plazo y, finalmente, reconstitución y administración al paciente. El procesamiento farmacéutico se refiere, particularmente, a las últimas etapas del procedimiento de fabricación, desde la llegada de la sustancia farmacéutica a granel desde la producción hasta el final de la liofilización del producto farmacéutico formulado. Debería entenderse que las etapas del procesamiento farmacéutico son bien conocidas, en general, por una persona con conocimientos en la materia, e incluyen etapas tales como formulación, filtración estéril, llenado en viales y liofilización.

La pérdida de factor VIII activo tiene un amplio significado, que incluye, pero no se limita a, la pérdida debida a la adsorción superficial, la agregación, los cambios físicos y/o químicos de la estructura de la proteína, o la pérdida debida a los liofilizados con aspecto insatisfactorio, desechados.

El factor r VIII, en particular, es un derivado de supresión, que carece total o parcialmente del dominio B, proporcionando, de esta manera, una actividad específica que puede exceder ampliamente 5.000 IU/mg antes de la formulación. Los ejemplos de dichos derivados de supresión, que carecen total o parcialmente de sus dominios B, se divulgan y se preparan en los documentos EP-A-1136553 (Hauser et al) y EP-A-1739179 (Schröder et al), a partir de líneas celulares humanas. Se apreciará que las composiciones de la invención actual, tal como se describen en la sección siguiente, son especialmente adecuadas para proteger dichos derivados de supresión de factor VIII.

Según la presente invención, el crio/lioprotector es una combinación de arginina y sacarosa. Típicamente, la arginina puede ser una sal o un derivado de arginina, tal como clorhidrato de arginina.

El agente de carga según la presente invención tiene también la función adicional de ser un proveedor de fuerza iónica, lo que minimiza el número de componentes necesarios para un producto clínico adecuado. Los agentes de carga según la presente invención pueden ser cloruro de sodio o arginina. La arginina puede estar en una forma de sal, en particular, en forma de clorhidrato.

Según la presente invención, el crioloprotector es una combinación de arginina y sacarosa. El agente de carga y proveedor de la fuerza iónica, en particular, es cloruro de sodio. Si el cloruro de sodio actúa como agente de carga, la composición de la invención comprende, en particular, como crioloprotector 15 mg/ml de sacarosa y 15 mg/ml de arginina, con la condición de que haya presentes al menos 6 mg/ml de crioloprotector, y como un agente de carga de 10 mg/ml a 40 mg/ml de cloruro de sodio. La composición puede comprender, de manera particular, aproximadamente de 3 mg/ml a 10 mg/ml, particularmente de 4,5 mg/ml a 9 mg/ml de sacarosa, de 3 mg/ml a aproximadamente 8 mg/ml, particularmente de 4,5 mg/ml a 6,8 mg/ml de arginina y, en particular, de 15 mg/ml a 23 mg/ml de cloruro de sodio. Otros intervalos de concentración adecuados comprenden, en particular, de 4,5 a 6,8 mg/ml de sacarosa, de 4,5 mg/ml a 6,8 mg/ml de arginina y de 15 mg/ml a 23 mg/ml de cloruro de sodio. Preferentemente, arginina y sacarosa están presentes en cantidades iguales. Entonces, la composición comprende hasta aproximadamente 9 mg/ml de arginina y hasta 9 mg/ml de sacarosa. Además, la composición puede comprender cloruro de calcio, un agente tensoactivo y, opcionalmente, citrato de sodio como agente tampón de pH. En otra realización, la composición de la invención comprende sacarosa en una cantidad de 10 mg/ml a 25 mg/ml y cloruro de sodio en una cantidad de 10 mg/ml a 40 mg/ml.

Según otra realización, la composición es, como una alternativa esencialmente libre de cloruro de sodio, el crioloprotector es sacarosa y el agente de carga y proveedor de fuerza iónica es arginina. En particular, la composición comprende de 5 a 25 mg/ml de sacarosa y de 20 a 70 mg/ml de arginina. Además, esta composición puede comprender cloruro de calcio, un agente tensoactivo y, opcionalmente, citrato de sodio como agente tampón. La expresión "esencialmente libre de cloruro de sodio", cuando aparece en los contextos actuales, no debería significar composiciones "carentes totalmente de cloruro de sodio", sino que contiene trazas de NaCl, por ejemplo, <1%, ya que pequeñas cantidades de cloruro de sodio pueden seguir a la sustancia farmacéutica a granel desde etapas de fabricación anteriores, sino que indica que no se ha añadido cloruro de sodio durante el procesamiento farmacéutico.

Típicamente, la composición es proporcionada en forma liofilizada. En todavía otra realización de la invención, la composición es proporcionada en forma de una solución a liofilizar o en la forma de una solución reconstituida preparada a partir de una composición liofilizada y un diluyente.

En una realización adicional, en la composición de la invención, el agente tensoactivo es una proteína, en particular, una proteína recombinante. La proteína es, en particular, albúmina producida de manera recombinante, en una cantidad de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml. Esta cantidad es considerablemente menor que y difiere de la cantidad usada comúnmente en formulaciones tradicionales de factor VIII derivado de plasma, donde la albúmina funciona como el único crioloprotector. Sorprendentemente, la albúmina, en particular, la albúmina recombinante, es muy adecuada para su uso como agente tensoactivo en las formulaciones de factor VIII recombinante, a ser almacenadas a temperatura ambiente.

En otra realización de la invención, el agente tensoactivo es un tensoactivo no iónico, por ejemplo, copolímero de polioxietileno-polioxipropileno. Según la invención, el agente tensoactivo está presente en una concentración por debajo de la concentración micelar crítica, por ejemplo, para el copolímero de polioxietileno-polioxipropileno, menor de aproximadamente 5 mg/ml.

En una realización de la invención, la composición comprende un factor r VIII que tiene una actividad específica ≥ 5.000 IU/mg de proteína.

Según todavía una realización adicional, la composición tiene un crioloprotector y un agente de carga que es arginina, que actúa también como un proveedor de fuerza iónica. En particular, la arginina está presente en una cantidad de 20 mg/ml a 70 mg/ml. Además, esta composición puede comprender cloruro de calcio, un agente tensoactivo y, opcionalmente, citrato de sodio como agente tampón.

La totalidad de las diversas composiciones materializadas comprenden un agente tensoactivo que, en un aspecto, es un detergente no iónico, en particular, un tensoactivo polimérico, no iónico, de tipo copolímero de bloques, tal como un copolímero de polioxietileno-polioxipropileno, por ejemplo, Poloxamer 188, o un tensoactivo no iónico de tipo éster de ácido graso de polioxietileno sorbitán, por ejemplo, Polysorbate 20 o Polysorbate 80. Un tensoactivo no iónico adecuado es Poloxamer 188, que puede ser usado a una concentración por debajo de su concentración micelar crítica (cmc), preferentemente, en particular, a concentraciones por debajo de aproximadamente 5 mg/ml. Se ha informado de que el valor cmc de Poloxamer 188 está comprendido en el intervalo de 20-100 mg/ml a 25°C (Kabanov, A.V. et al, 1995, Alexandridis, P. et al, 1994, Moghimi, S.M. et al, 2004, Nakashima, K. et al, 1994).

En otro aspecto, el agente tensoactivo es una proteína, producida de manera recombinante, diferente a la proteína de factor VIII, en particular, albúmina humana recombinante, en particular, dichas composiciones comprenden albúmina, producida de manera recombinante, en una cantidad de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml. Las diversas realizaciones se describirán en mayor detalle en los ejemplos siguientes, que ilustran la invención pero no deberían ser considerados como una restricción o una limitación del alcance de la invención.

Ejemplos

5 El factor VIII usado en los experimentos es una proteína de factor VIII humana, recombinante, con dominio B eliminado, producida en la línea celular humana HEK293F según el procedimiento descrito en el documento EP 1739179 (Schröder et al.). El procedimiento de purificación consistió en cinco etapas de cromatografía y generó una preparación muy pura de proteína de factor VIII (Winge et al, solicitud de patente europea 08 158 893.1) con un patrón similar a la glicosilación humana (Sandberg et al, solicitud de patente europea 08 162 765.5).

La actividad de la proteína fue medida con un ensayo cromogénico o con el ensayo de una etapa.

El ensayo cromogénico es un procedimiento fotométrico de dos etapas, que mide la actividad biológica del factor VIII como un cofactor. El factor VIII activa el factor X a factor Xa, que, a su vez, es escindido enzimáticamente en un producto que puede ser cuantificado espectrofotométricamente.

10 El ensayo de una etapa está basado en la capacidad de una muestra que contiene factor VIII para corregir el tiempo de coagulación del plasma con déficit de factor VIII en presencia de fosfolípidos, activador de contacto e iones de calcio. El tiempo de aparición de un coágulo de fibrina es medido en una etapa.

Ejemplo 1

15 El factor VIII recombinante fue preparado según la descripción en la sección experimental anterior. Este experimento compara una formulación que tiene un crioliotector que es una combinación de arginina y sacarosa con formulaciones que tienen sacarosa o arginina como crioliotector. El cloruro de sodio funciona como agente de carga y proveedor de fuerza iónica.

Las formulaciones fueron investigadas para recuperación de factor VIII en las formulaciones liofilizadas, a una concentración inicial de 150 IU/ml. Las composiciones investigadas se muestran en la Tabla I.

TABLA I - Composición

	1A	1B	1C
Sacarosa, mg/ml	9	-	9
Arginina HCl, mg/ml	9	9	-
Cloruro de sodio, mg/ml	30	30	30
Cloruro de calcio dihidrato, mg/ml	0,5	0,5	0,5
Poloxamer 188, mg/ml	2	2	2
Citrato de sodio dihidrato, mg/ml	2	2	2

20

Alícuotas de 1,5 ml de las soluciones fueron liofilizadas en un liofilizador a escala de laboratorio. Las muestras liofilizadas fueron almacenadas durante un periodo de hasta 12 meses a +5°C, +25°C y +40°C, para evaluar la actividad de la proteína con el tiempo. Las muestras fueron reconstituidas en 1,5 ml de agua para inyecciones y fueron analizadas con el ensayo cromogénico descrito en la sección experimental anterior. Los resultados se resumen en la Tabla II.

25

TABLA II – Resultados

		Actividad de factor VIII con el tiempo (meses).							
		(% del valor inicial)							
		0	0,5	1	2	3	6	9	12
1A	5°C	100	n.a.	107	n.a.	95	116	92	90
	25°C	100	97	99	95	89	96	76	70
	40°C	100	93	102	76	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
1B	5°C	100	n.a.	106	n.a.	81	111	97	92
	25°C	100	98	99	96	84	81	62	45

ES 2 382 443 T3

	40°C	100	85	79	59	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
1C	5°C	100	n.a.	101	n.a.	86	102	88	82
	25°C	100	85	86	80	83	82	71	63
	40°C	100	70	66	56	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a. no analizado									

Los resultados del Ejemplo 1 muestran que, sorprendentemente, hay un efecto crio/lioprotector sinérgico aditivo entre la sacarosa y la arginina, ya que la formulación 1A muestra una mejor recuperación de la actividad con el tiempo en comparación con las formulaciones 1B y 1C.

5 Ejemplo 2

El factor VIII recombinante fue preparado según la descripción en la sección experimental anterior. Este experimento investiga formulaciones que tienen sacarosa como crio/lioprotector y arginina como agente de carga y proveedor de fuerza iónica. Las formulaciones fueron investigadas para la recuperación de factor VIII en formulaciones liofilizadas, a una concentración inicial de 150 IU/ml. Las composiciones investigadas se muestran en la Tabla III.

10 TABLA III – Composición

	2A	2B	2C
Sacarosa, mg/ml	10	10	10
Arginina HCl, mg/ml	50	35	70
Cloruro de calcio dihidrato, mg/ml	0,5	0,5	0,5
Poloxamer 188, mg/ml	2	2	2
Citrato de sodio dihidrato, mg/ml	2	2	2

Alícuotas de 1,5 ml de las soluciones fueron liofilizadas en un liofilizador a escala de laboratorio. Las muestras liofilizadas fueron almacenadas durante un periodo de hasta 12 meses a +5°C, +25°C y +40°C, para evaluar la actividad de la proteína con el tiempo. Las muestras fueron reconstituidas en 1,5 ml de agua para inyecciones y fueron analizadas con el ensayo cromogénico, tal como se ha descrito en la sección experimental anterior. Los resultados se resumen en la Tabla IV, como porcentajes del valor inicial.

15 TABLA IV – Resultados

		Actividad del factor VIII con el tiempo (meses), (% del valor inicial)					
		0	1	3	6	9	12
2A	5°C	100	94	80	92	89	101
	25°C	100	94	84	86	74	84
	40°C	100	90	81	n.a.	n.a.	n.a.
2B	5°C	100	99	89	90	85	105
	25°C	100	99	93	86	80	86
	40°C	100	97	82	n.a.	n.a.	n.a.
	5°C	100	97	88	93	88	97

2C	25°C	100	93	78	87	76	80
	40°C	100	90	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a. no analizado							

Los resultados del Ejemplo 2 muestran que la arginina funciona satisfactoriamente como agente de carga y proveedor de fuerza iónica, en combinación con sacarosa como crioprotector.

Ejemplo 3

5 El factor VIII recombinante fue preparado según la descripción en la sección experimental anterior. Este experimento compara formulaciones con Poloxamer 188 o Polysorbate 80 como un agente tensoactivo con una formulación carente de agente tensoactivo. El crioprotector es una combinación de arginina y sacarosa, y se usa cloruro de sodio como agente de carga y proveedor de fuerza iónica. Las formulaciones mostradas en la Tabla V fueron investigadas para la recuperación del factor VIII durante la etapa de liofilización, a una concentración inicial de factor VIII de 150 IU/ml.

10 TABLA V – Composición

	3A	3B	3C
Sacarosa, mg/ml	9	9	9
Arginina HCl, mg/ml	9	9	9
Cloruro de sodio, mg/ml	30	30	30
Cloruro de calcio dihidrato, mg/ml	0,5	0,5	0,5
Poloxamer 188, mg/ml	2	-	-
Polysorbate 80, mg/ml	-	0,2	-
Citrato de sodio dihidrato, mg/ml	2	2	2

15 Alícuotas de 1,5 ml de las soluciones fueron liofilizadas en un liofilizador a escala de laboratorio. Se tomaron muestras antes de la liofilización y se congelaron. Las muestras liofilizadas fueron reconstituidas en 1,5 ml de agua para inyecciones antes del análisis. La actividad del factor VIII fue analizada con el ensayo cromogénico descrito en la sección experimental anterior. Los resultados de la recuperación de la actividad en las muestras congeladas-descongeladas y durante la etapa de liofilización se muestran en la Tabla VI.

TABLA VI - Resultados, recuperación de la actividad durante la etapa de liofilización.

Actividad del factor VIII (% de la cantidad añadida)			
	Cantidad añadida	Congelado-descongelado	Reconstituido después de liofilización
3A	100	104	93
3B	100	101	97
3C	100	18	0

20 Los resultados del Ejemplo 3 muestran que un agente tensoactivo es necesario en la formulación para contrarrestar las pérdidas de proteína causadas probablemente por absorción superficial, tanto durante una etapa de congelación-descongelación como durante el procedimiento de liofilización. Este ejemplo muestra además que el agente tensoactivo polimérico, no-iónico, Poloxamer 188, cuando es usado a una concentración por debajo de la concentración micelar crítica

(cmc), protege eficazmente el factor VIII durante la liofilización. El efecto protector es tan alto como el del agente tensoactivo, no iónico tensoactivo, Polysorbate 80, usado por encima de su valor cmc.

Ejemplo 4

5 El ejemplo 3 ha mostrado que un agente tensoactivo es necesario en la formulación para evitar la pérdida de actividad del factor VIII causada por la adsorción superficial y este ejemplo investiga si puede usarse albúmina recombinante para este propósito.

10 El factor VIII recombinante fue preparado según la descripción en la sección experimental anterior. Las formulaciones mostradas en la Tabla VII fueron investigadas para la recuperación de la actividad del factor VIII en solución, a una concentración inicial de factor VIII de 140 IU/ml. Las formulaciones de proteína fueron almacenadas a +25°C y fueron analizadas en los días 0, 3, 7 y 10 con el ensayo cromogénico descrito en la sección experimental anterior. Los resultados se muestran en la Tabla VIII, como porcentajes del valor inicial.

TABLA VII - Composición

	4A	4B	4C	4D
Sacarosa, mg/ml	9	9	9	9
Arginina HCl, mg/ml	9	9	9	9
Cloruro de sodio, mg/ml	30	30	30	30
Cloruro de calcio, mg/ml	0,5	0,5	0,5	0,5
Poloxamer 188, mg/ml	2	-	-	-
Albúmina recombinante, mg/ml	-	1	2	4
Citrato de sodio, mg/ml	2	2	2	2

TABLA VIII - Resultados

Actividad del factor VIII con el tiempo (días), (% del valor inicial)				
	0	3	7	10
4A	100	93	87	83
4B	100	103	99	96

15

(Cont.)

4C	100	110	104	100
4D	100	96	95	85

Los resultados del Ejemplo 4 muestran que la albúmina recombinante puede proteger el factor VIII contra las pérdidas de actividad causadas probablemente por la adsorción superficial.

20 Ejemplo 5

25 El ejemplo 3 ha mostrado que un agente tensoactivo es necesario en la formulación para evitar una pérdida de actividad del factor VIII causada probablemente por la adsorción superficial y el Ejemplo 4 ha mostrado que la albúmina recombinante podría ser usada para prevenir una pérdida de actividad de proteína en solución. Este ejemplo investiga si la albúmina recombinante protege la pérdida de actividad de proteína debida probablemente a la adsorción superficial también en la etapa de liofilización.

5

El factor VIII recombinante fue preparado según la descripción en la sección experimental anterior. Las formulaciones carecen de detergente no iónico, pero con albúmina recombinante añadida para prevenir pérdidas de actividad. El crioloprotector es una combinación de arginina y sacarosa, y se usa cloruro de sodio como agente de carga y proveedor de fuerza iónica. Las formulaciones mostradas en la Tabla VII fueron investigadas para recuperación de factor VIII en las formulaciones liofilizadas, a una concentración inicial de factor VIII de 150 IU/ml.

10

Alícuotas de 1,5 ml de las soluciones fueron liofilizadas en un liofilizador a escala de laboratorio. Las muestras liofilizadas fueron almacenadas durante un periodo de hasta 12 meses a +5°C, +25°C y +40°C, para evaluar la actividad de la proteína con el tiempo. Las muestras fueron reconstituidas en 1,5 ml de agua para inyecciones y fueron analizadas con el ensayo cromogénico descrito en la sección experimental anterior. Los resultados se resumen en la Tabla IX.

TABLA IX- Resultados.

		Actividad del factor VIII con el tiempo (meses), (% del valor inicial)					
		0	1	3	6	9	12
4A	5°C	100	110	117	93	112	100
	25°C	100	104	95	75	74	59
	40°C	100	84	47	n.a.	n.a.	n.a.
4B	5°C	100	99	100	94	97	95
	25°C	100	100	98	92	95	92
	40°C	100	81	74	n.a.	n.a.	n.a.
4C	5°C	100	101	114	103	106	112
	25°C	100	106	105	102	102	102
	40°C	100	108	101	n.a.	n.a.	n.a.
4D	5°C	100	100	103	99	96	101
	25°C	100	99	112	103	99	99
	40°C	100	101	93	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. no analizado

15

Los resultados del Ejemplo 5 muestran que la albúmina recombinante puede reemplazar un detergente no iónico en formulaciones de factor r VIII (formulaciones 4B a 4D) para evitar pérdidas de actividad causadas probablemente por adsorción superficial en la etapa de liofilización. También muestra que la albúmina recombinante es muy adecuada para su uso como un agente tensoactivo en formulaciones de factor VIII recombinante, a ser almacenadas a temperatura ambiente.

Ejemplo 6

20

El factor VIII recombinante fue preparado según la descripción en la sección experimental anterior. Las formulaciones carecen de detergente no iónico, pero con albúmina recombinante añadida para prevenir pérdidas de actividad que pueden ser debidas a la adsorción superficial. El crioloprotector es sacarosa, y se usa cloruro de sodio como agente de carga y proveedor de fuerza iónica. Las formulaciones mostradas en la Tabla X fueron investigadas para recuperación de factor VIII en las formulaciones liofilizadas, a una concentración inicial de factor VIII de 160 IU/ml.

TABLA X – Composición

	6A	6B
Sacarosa, mg/ml	24	24

Cloruro de sodio, mg/ml	30	30
Cloruro de calcio, mg/ml	0,5	0,5
Albúmina recombinante, mg/ml	2	4
Citrato de sodio, mg/ml	2	2

5 Alícuotas de 1,5 ml de las soluciones fueron liofilizadas en un liofilizador a escala de laboratorio. Las muestras liofilizadas son almacenadas durante un periodo de hasta 6 meses a +5°C, +25°C y +40°C para evaluar la actividad de la proteína con el tiempo. Las muestras fueron reconstituidas en 1,5 ml de agua para inyecciones y fueron analizadas con el ensayo cromogénico descrito en la sección experimental anterior. Los resultados se muestran en la Tabla XI.

TABLA XI – Resultados

		Actividad de factor VIII con el tiempo (meses), (% de valor inicial)				
		0	1	2	3	6
6A	5°C	100	n.a.	n.a.	93	101
	25°C	100	96	n.a.	106	101
	40°C	100	99	89	89	n.a.
6B	5°C	100	n.a.	n.a.	95	107
	25°C	100	102	n.a.	79	104
	40°C	100	101	99	102	n.a.

n.a. no analizado

10 Los resultados del Ejemplo 6 muestran que la albúmina recombinante puede reemplazar un detergente no iónico en las formulaciones de factor r VIII, para evitar pérdidas de actividad que puedan ser causadas por adsorción superficial en la etapa de liofilización. Dichos resultados muestran también que la albúmina recombinante es muy adecuada para su uso como un agente tensoactivo en las formulaciones de factor VIII recombinante a ser almacenadas a temperatura ambiente.

Ejemplo 7

15 Este ejemplo investiga la recuperación de actividad del factor VIII en una solución que contiene histidina como un agente de tamponamiento de pH, en comparación con una solución carente de agente de tamponamiento de pH.

El factor VIII recombinante fue preparado según la descripción en la sección experimental anterior. Las soluciones mostradas en la Tabla XII fueron investigadas para la recuperación de la actividad del factor VIII en solución, a una concentración inicial de factor VIII de 100 IU/ml.

TABLA XII-Composición

	7A	7B
Cloruro de sodio, mg/ml	18	18
Cloruro de calcio dihidrato, mg/ml	0,5	0,5
Polysorbate 80, mg/ml	0,2	0,2
Histidina, mg/ml	3	-

Las formulaciones de proteínas fueron almacenadas a +25°C y fueron analizadas en el día 0 y después de 3 y 7 días con el ensayo cromogénico descrito en la sección experimental anterior. Los resultados se muestran en la Tabla XIV, como porcentajes del valor inicial.

TABLA XIV – Resultados

		Actividad de factor VIII con el tiempo (días), (% de valor inicial)		
		0	3	7
7A	25°C	100	81	72
7B	25°C	100	95	90

5

Los resultados del Ejemplo 7 muestran que una formulación libre de histidina protege el factor VIII mejor que una formulación que contiene histidina.

Ejemplo 8

10

El factor VIII recombinante fue preparado según la descripción en la sección experimental anterior. Este experimento investiga las formulaciones que tienen arginina como crioprotector, agente de carga y proveedor de fuerza iónica. Las formulaciones fueron investigadas para la recuperación del factor VIII en las formulaciones liofilizadas, a una concentración inicial de 160 IU/ml. Las composiciones investigadas se muestran en la Tabla XV.

TABLA XV – Composición

	8A
Arginina HCl, mg/ml	70
Cloruro de calcio dihidrato, mg/ml	0,5
Poloxamer 188, mg/ml	2
Citrato de sodio dihidrato, mg/ml	2

15

Alícuotas de 1,5 ml de las soluciones fueron liofilizadas en un liofilizador a escala de laboratorio. Las muestras liofilizadas fueron almacenadas durante un periodo de hasta 9 meses a +5°C, +25°C y +40°C para evaluar la actividad de la proteína con el tiempo. Las muestras fueron reconstituidas en 1,5 ml de agua para inyecciones y fueron analizadas con el ensayo cromogénico descrito en la sección experimental anterior. Los resultados se resumen en la Tabla XVI, como porcentajes del valor inicial.

20

TABLA XVI - Resultados

		Actividad del factor VIII con el tiempo (meses), (% del valor inicial)					
		0	1	2	3	6	9
8A	5°C	100	88	n.a.	98	85	92
	25°C	100	83	n.a.	97	81	80
	40°C	100	85	79	85	n.a.	n.a.
n.a. no analizado							

Los resultados del Ejemplo 8 muestran que la arginina puede ser un excipiente multifuncional, ya que funciona satisfactoriamente tanto como agente de carga como proveedor de fuerza iónica, así como crioprotector.

Lista de referencias

Wang, W., Wang, Y. W. and Kelner, D. N., Coagulation factor VIII: structure and stability (Review), *Int. J. Pharm.*, 259, (2003), 1-15

Schwegman, J. J., Hardwick, L. M. and Akers, M. J., Practical Formulation and process Development of Freeze-Dried Products, *Pharm. Dev. and Techn.*, 10, (2005), 151-173

5 Tang, X. and Pikal, M. J., Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice, *Pharm. Res.*, 21 (2), (2004), 191-200

Manning, M. C., Patel, K. and Borchardt, R. T., Stability of Protein Pharmaceuticals, *Pharm. Res.*, 6 (11), (1989), 903-918

Österberg, T., Fatouros, A. and Mikaelsson, M., Development of a Freeze-Dried Albumin-Free Formulation of Recombinant Factor VIII SQ, *Pharm. Res.*, 14, (1997), 892-898

10 Alexandridis, P. et al, Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association, *Macromolecules*, 27, (1994), 2414-2425

Kabanov, A. V. et al, Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent Probes in Poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) Solutions,

Macromolecules, 28, (1995), 2303-2314

REIVINDICACIONES

1. Composición libre de histidina que comprende:
 - un factor VIII o factor r VIII de alta pureza;
 - arginina y sacarosa;
- 5 un agente tensoactivo para prevenir o al menos inhibir la adsorción superficial de factor VIII;
- una cantidad de cloruro de calcio para la estabilización específica del factor VIII.
2. Composición libre de histidina según la reivindicación 1, en la que el cloruro de sodio está presente como agente de carga si la arginina y la sacarosa trabajan como crioprotector pero no como agente de carga.
3. Composición libre de histidina según la reivindicación 1, en la que, esencialmente, no hay cloruro de sodio presente, en particular si la arginina es usada como crioprotector y agente de carga.
- 10 4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el factor r VIII es un derivado de supresión del factor VIII nativo, que carece, parcial o completamente, del dominio B del factor VIII nativo.
5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en forma liofilizada.
6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en forma de una solución a ser liofilizada o en forma de una solución reconstituida preparada a partir de una composición liofilizada y diluyente.
- 15 7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2, y 4 a 6, que comprende como crioprotector 3-15 mg/ml de sacarosa y 3-15 mg/ml de arginina, con la condición de que estén presentes al menos 6 mg/ml de crioprotector, y como agente de carga de 10 mg/ml a 40 mg/ml de cloruro de sodio.
8. Composición según la reivindicación 7, en la que el crioprotector incluye tanto arginina como sacarosa, en particular, de 3 mg/ml a 10 mg/ml, particularmente de 4,5 mg/ml a 9 mg/ml de sacarosa, de 3 mg/ml a 8 mg/ml, particularmente de 4,5 mg/ml a 6,8 mg/ml de arginina y de 10 a 40 mg/ml de NaCl, en particular de 15 mg/ml a 23 mg/ml de cloruro de sodio.
- 20 9. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que la sacarosa está presente en una cantidad de 10 mg/ml a 25 mg/ml y el cloruro de sodio está presente en una cantidad de 10 mg/ml a 40 mg/ml.
10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, que comprende un crioprotector que es sacarosa y un agente de carga que es arginina, en particular de 5 mg/ml a 25 mg/ml de sacarosa y de 20 mg/ml a 70 mg/ml de arginina.
11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en la que la arginina funciona tanto como agente de carga como crioprotector, en particular en una cantidad de 20 mg/ml a 70 mg/ml.
- 30 12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el agente tensoactivo es una proteína, en particular una proteína recombinante, tal como albúmina producida de manera recombinante, en particular en una cantidad de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml.
13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el agente tensoactivo es un tensoactivo no iónico, en particular en una concentración por debajo de la concentración micelar crítica.
- 35 14. Composición según la reivindicación 13, en la que el tensoactivo no iónico es un copolímero de polioxietileno-polioxipropileno, en particular en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml.
15. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la actividad específica del factor r VIII es ≥ 5.000 IU/mg de proteína.