

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 755**

51 Int. Cl.:

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| <b>A61K 47/10</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 47/18</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 47/02</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 9/19</b>  | (2006.01) |
| <b>A61P 7/04</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 47/38</b> | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2000 E 09075396 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **09.12.2009 EP 2130554**

54 Título: **Nuevas formulaciones de factor VIII libres de albúmina**

30 Prioridad:

**22.02.1999 US 255279**  
**01.12.1999 US 452752**

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

**05.02.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF CONNECTICUT (50.0%)**  
**263 FARMINGTON AVENUE**  
**FARMINGTON, CT06030-6207, US y**  
**BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BESMAN, MARC;**  
**BJORNSON, ERIK;**  
**JAMEEL, FEROZ;**  
**KASHI, RAMESH;**  
**PIKAL, MICHAEL;**  
**TCHESALOV, SERGUEI y**  
**CARPENTER, JOHN**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

**ES 2 394 755 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

Nuevas formulaciones de factor VIII libres de albúmina

5 El factor VIII es una proteína que se encuentra en el plasma sanguíneo y que actúa como cofactor en la cascada de reacciones que conduce a la coagulación de la sangre. Una deficiente cantidad de actividad de factor VIII en la sangre da como resultado el trastorno de coagulación conocido como hemofilia A, una condición heredada que afecta esencialmente a los varones. Actualmente la hemofilia A se trata con preparaciones terapéuticas de factor VIII procedentes de plasma humano o fabricadas por medio de la tecnología de ADN recombinante. Estas preparaciones se administran como respuesta a un episodio de hemorragia (terapia a demanda) o a intervalos frecuentes y regulares para impedir hemorragias incontroladas (profilaxis).

10 El factor VIII es conocido por ser relativamente inestable en las preparaciones terapéuticas. En el plasma humano, el factor VIII forma normalmente un complejo con otra proteína plasmática, el factor von Willebrand (vWF), que está presente en el plasma en un exceso molar importante con respecto al factor VIII y que se piensa protege a éste de una degradación prematura. Otra proteína plasmática circulante, la albúmina, también puede desempeñar un papel en la estabilización del factor VIII *in vivo*. Por tanto, las preparaciones de factor VIII que se comercializan actualmente implican primero la utilización de albúmina y/o de vWF para estabilizar el factor VIII durante el proceso de fabricación y el almacenamiento.

15 Sin embargo, la albúmina y el vWF utilizados en las preparaciones de factor VIII actualmente comercializadas proceden de plasma sanguíneo humano y la utilización de este material tiene algunos inconvenientes. Debido a que generalmente se añade un gran exceso molar de albúmina en comparación con el factor VIII para aumentar la estabilidad del factor VIII en estas preparaciones, es difícil caracterizar la proteína factor VIII en sí misma en estas preparaciones. La adición de albúmina procedente de seres humanos al factor VIII también parece ser un inconveniente en relación con las preparaciones de factor VIII obtenidas de forma recombinante. Esto se debe a que las preparaciones de factor VIII derivadas de forma recombinante, en ausencia de esta albúmina añadida, no contendrían de otro modo proteínas derivadas del ser humano y se reduciría el riesgo teórico de transmisión viral.

25 Se han descrito varios intentos para formular el factor VIII sin albúmina o vWF (o con niveles relativamente bajos de estos excipientes). Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.565.427 (EP 508 194), de Freudenberg (cedida a Behringwerke), describe preparaciones de factor VIII que contienen una combinación particular de tensioactivos y aminoácidos, de forma específica arginina y glicina, junto con excipientes tales como cloruro de sodio y sacarosa. Se describe el agente tensioactivo, polisorbato 20 o polisorbato 80, como estando presente en cantidades de entre el 0,001 y el 0,5% (volumen/volumen), mientras que la arginina y la glicina están presentes en cantidades de entre 0,01 y 1 mol/l. La sacarosa está presente en cantidades de entre el 0,1 y el 10%. El Ejemplo 2 de esta patente afirma que soluciones de (1) un 0,75% de sacarosa, glicina 0,4M y NaCl 0,15M y (2) citrato de sodio 0,01M, glicina 0,08M, lisina 0,016M, cloruro cálcico 0,0025M y cloruro sódico 0,4M no eran estables en solución por encima de 16 horas, mientras que soluciones de (3) un 1% de sacarosa, arginina 0,14M, cloruro sódico 0,1M y (4) un 1% de 30 sacarosa, glicina 0,4M, arginina 0,14M, cloruro sódico 0,1M y un 0,05% de Tween 80 mostraban estabilidad.

35 La Patente de Estados Unidos Nº 5.763.401 (EP 818 204), de Nayer (cedida a Bayer), también describe una formulación terapéutica de factor VIII sin albúmina que comprende sacarosa 15-60mM, NaCl hasta 50mM, cloro de calcio hasta 5mM, glicina 65-400mM e histidina hasta 50mM. Las siguientes formulaciones específicas se identificaron como estables: (1) NaCl 150mM, cloruro de calcio 2,5mM y manitol 165mM; y (2) 1% de sacarosa, cloruro de sodio 30mM, cloruro de calcio 2,5mM, histidina 20mM y glicina 290mM. Se descubrió que una formulación que contenía cantidades más elevadas de azúcares (10% de maltosa, NaCl 50mM, cloruro de calcio 2,5mM e histidina 5mM) presentaba poca estabilidad en estado liofilizado en comparación con la formulación (2).

40 La Patente de Estados Unidos Nº 5.733.873 (EP 627 924), de Osterberg (cedida a Pharmacia & Upjohn), describe formulaciones que incluyen entre 0,01 y 1 mg/ml de un agente tensioactivo. Esta patente describe formulaciones que contienen los siguientes intervalos de excipientes: polisorbato 20 u 80 en una cantidad de al menos 0,01 mg/ml, preferentemente de 0,02 a 1,0 mg/ml; al menos NaCl 0,1M, al menos una sal de calcio 0,5mM y al menos histidina 1mM. Más en particular, se describen las siguientes formulaciones específicas: (1) histidina 14,7 - 50 - 65mM, NaCl 0,31 - 0,6M, cloruro de calcio 4mM, un 0,001 - 0,02 - 0,025% de polisorbato 80, con o sin un 0,1% de PEG 4000 o 45 sacarosa 19,9mM; y (2) 20 mg/ml de manitol, 2,67 mg/ml de histidina, 18 mg/ml de NaCl, cloruro de calcio 3,7mM y 50 0,23 mg/ml de polisorbato 80.

También se han realizado otros intentos para utilizar concentraciones mayores o menores de cloruro de sodio. La Patente de Estados Unidos Nº 4.877.608 (EP 315 968), de Lee (cedida a Rhone-Poulenc Rorer), muestra formulaciones con concentraciones relativamente bajas de cloruro de sodio, a saber: formulaciones que comprenden NaCl 0,5mM - 15mM, cloruro de calcio 5mM, histidina 0,2mM - 5mM, clorhidrato de lisina 0,01 - 10mM 55 y hasta un 10% de azúcares. Los "azúcares" pueden consistir en hasta un 10% de maltosa, un 10% de sacarosa o un 5% de manitol.

La US 5.605.884 (EP 0 314 095), de Lee (cedida a Rhone-Poulenc Rorer), muestra la utilización de formulaciones con concentraciones relativamente altas de cloruro de sodio. Estas formulaciones incluyen NaCl 0,35M - 1,2M, cloruro de calcio 1,5 - 40mM, histidina 1mM - 50mM y hasta un 10% de un "azúcar" tal como manitol, sacarosa o maltosa. Se ilustra una formulación que comprende NaCl 0,45M, cloruro de calcio 2,3mM e histidina 1,4mM.

- 5 La Solicitud de Patente Internacional WO 96/22107, de Roser (cedida a Quadrant Holdings Cambridge Limited), describe formulaciones que incluyen el azúcar trehalosa. Estas formulaciones comprenden: (1) NaCl 0,1M, cloruro de calcio 15mM, histidina 15mM y trehalosa 1,27M (48%); o (2) un 0,011% de cloruro de calcio, un 0,12% de histidina, un 0,002% de Tris, un 0,002% de Tween 80, un 0,004% de PEG 3350, un 7,5% de trehalosa y un 0,13% o un 1,03% de NaCl.
- 10 Otras formulaciones terapéuticas de factor VIII de la técnica anterior suelen incluir albúmina y/o vWF con el propósito de estabilizar el factor VIII y, por tanto, no son relevantes para la presente invención. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.328.694 (EP 511 234), de Schwinn (cedida a Octapharma AG), describe una formulación que incluye un disacárido 100 - 650mM y un aminoácido 100mM - 1,0M. De forma específica, se describen las siguientes formulaciones: (1) sacarosa 0,9M, glicina 0,25M, lisina 0,25M y cloruro de calcio 3mM; y (2) sacarosa 0,7M, glicina 0,5M y cloruro de calcio 5mM.
- 15

Aunque se hayan realizado varios intentos para formular el factor VIII sin albúmina o vWF, sigue existiendo una necesidad de formulaciones terapéuticas de factor VIII que sean estables en ausencia de albúmina o de otras proteínas.

#### Sumario de la Invención

- 20 La presente invención se refiere a composiciones terapéuticas de factor VIII que son estables en ausencia de albúmina según la reivindicación 1.

La presente invención incluye una composición de factor VIII formulada sin albúmina que comprende: NaCl de 300mM a 500mM; del 1% al 4% de un agente estabilizante seleccionado de entre el grupo consistente en sacarosa, trehalosa, rafinosa, arginina; una sal de calcio de 1mM a 5mM y un agente tampón para mantener el pH aproximadamente entre 6 y 8. Preferentemente, el NaCl está presente en una concentración de aproximadamente 400mM.

25

- Se describe también un proceso para liofilizar una composición acuosa de factor VIII en un recipiente utilizando un liofilizador, donde el proceso comprende una etapa inicial de congelación, y la etapa inicial de congelación comprende además las etapas de: (a) disminuir la temperatura de la cámara del liofilizador hasta al menos -45°C aproximadamente; (b) elevar la temperatura de la cámara hasta aproximadamente entre -15°C y -25°C; y posteriormente (c) bajar la temperatura de la cámara hasta al menos aproximadamente -45°C. En este proceso, la temperatura de la cámara desciende o sube preferentemente a una velocidad de entre aproximadamente 0,5°C y aproximadamente 1,0°C por minuto. En la etapa (a) preferentemente la temperatura se mantiene durante aproximadamente 1 hora, y se baja hasta aproximadamente -55°C. En la etapa (b) preferentemente la temperatura se mantiene entre -15°C y -25°C durante 1 a 3 horas, en especial se encuentra a -22°C, y la temperatura en la etapa (c) se mantiene preferentemente durante 1 hora aproximadamente. La composición de factor VIII utilizada en este proceso comprende preferentemente entre un 4% y un 10% de un agente seleccionado de entre el grupo consistente en manitol, glicina y alanina, y también comprende preferentemente entre un 1% y un 4% de un agente seleccionado de entre el grupo consistente en sacarosa, trehalosa, rafinosa y arginina. Además, la composición de factor VIII empleada en este proceso también comprende preferentemente entre 100mM y 300mM de NaCl.
- 30
- 35
- 40

#### Descripción Detallada de la Invención

Tal como se utilizan aquí, los términos siguientes y variaciones de los mismos serán definidos como sigue, salvo indicado de otra manera:

- Factor VIII:* La molécula de factor VIII existe naturalmente y en preparaciones terapéuticas en forma de una distribución heterogénea de polipéptidos que tienen su origen en un único producto genético (véase por ejemplo, Andersson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2979-2983, mayo 1986). El término "factor VIII" tal como se emplea aquí se refiere a todos estos polipéptidos procedentes del plasma sanguíneo o producidos por medio de la utilización de técnicas de ADN recombinante. Los ejemplos disponibles de preparaciones terapéuticas comerciales que contienen factor VIII incluyen aquellas que se venden bajo los nombres comerciales de HEMOFIL M y RECOMBIMATE (disponibles de Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, Illinois, U.S.A.). Otras preparaciones actualmente en desarrollo comprenden principalmente una única subpoblación de moléculas de factor VIII que carecen de la parte del dominio B de la molécula.
- 45
- 50

*Unidad Internacional, IU:* Unidad Internacional, o IU, es una unidad de medida de la actividad (potencia) de coagulación sanguínea del factor VIII tal como se mide en un ensayo estándar, por ejemplo uno de los siguientes:

Ensayo en una etapa. Los ensayos en una etapa son conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en Lee, Martin L y col., *An Effect of Predilution on Potency Assays of Factor VIII Concentrates*, Thrombosis Research (Pergamon Press Ltd.) **30**, 511-519 (1983).

5 Ensayo cromogénico. Los ensayos cromogénicos pueden comprarse en el mercado, por ejemplo Coatest Factor VIII, disponible de Chromogenix AB, Molndal, Suecia.

*Recocido:* El término recocido se empleará para indicar una etapa del proceso de liofilización de una preparación farmacéutica que está sometida a liofilización, antes del secado por congelación de la preparación, donde la temperatura de la preparación se eleva desde una temperatura inferior hasta una temperatura superior y luego se enfría de nuevo después de un período de tiempo.

10 *Agente de carga:* Con el propósito de esta solicitud, los agentes de carga son aquellas entidades químicas que proporcionan una estructura a la "torta" o masa sólida residual de una preparación farmacéutica después de que haya sido liofilizada y que la protegen contra posibles deterioros. Un agente de carga cristalizante será un agente de carga tal como el ya descrito que puede cristalizarse durante la liofilización, y que es distinto de cloruro de sodio. El HES no está incluido en este grupo de agentes de carga cristalizables.

15 *Secado por congelación, congelación, liofilización:* "Secado por congelación", salvo indicado de otro modo por el contexto en el cual aparece, se utilizará para indicar la parte de un proceso de liofilización en el cual se eleva la temperatura de una preparación farmacéutica para eliminar el agua de la preparación. Las etapas de "congelación" de un proceso de liofilización son aquellas etapas que tienen lugar antes de la etapa de secado por congelación. "Liofilización", salvo indicado de otro modo, se referirá a la totalidad del proceso de liofilización, incluidas tanto las etapas de congelación como las etapas de secado por congelación.

20 Salvo indicado de otro modo, los términos en porcentaje expresan porcentajes en peso/volumen y las temperaturas están en la escala Celsius.

#### Componentes de la formulación

25 Las composiciones de factor VIII de la presente invención incluyen agentes de carga, agentes estabilizantes, agentes tampón, cloruro de sodio, sales de calcio y, ventajosamente, otros excipientes. Estos excipientes se seleccionan con el fin de maximizar la estabilidad del factor VIII en las preparaciones liofilizadas. Sin embargo, las composiciones de factor VIII de la presente invención también presentan estabilidad en el estado líquido.

30 Los agentes de carga empleados en las presentes formulaciones, que forman la parte cristalina del producto liofilizado (excepto en el caso de HES), se seleccionan de entre el grupo consistente en manitol, glicina, alanina e hidroxietilalmidón (HES). El manitol, la glicina o la alanina están presentes en una cantidad del 4 al 10%, preferentemente del 6 al 9%, y en particular aproximadamente en un 8%. Cuando se utiliza HES como agente de carga, éste está presente en una cantidad del 2 al 6%, preferentemente del 3 al 5%, y en particular en un 4% aproximadamente.

35 Los agentes estabilizantes empleados en las formulaciones de la presente invención se seleccionan de entre el grupo consistente en sacarosa, trehalosa, rafinosa y arginina. Estos agentes están presentes en las formulaciones de la presente invención en una cantidad del 1 al 4%, preferentemente del 2 al 3%, en particular en un 2%. El sorbitol y el glicerol fueron evaluados como posibles estabilizantes, pero se descubrió que eran estabilizantes pobres en las presentes formulaciones.

40 El cloruro de sodio mismo puede ser utilizado sin ninguno de los agentes de carga anteriormente mencionados, en cuyo caso estaría incluido en la formulación en una cantidad de entre 300mM y 500mM de NaCl, preferentemente de 350 a 450mM de NaCl, y en particular aproximadamente en 400mM de NaCl.

45 Además, en estas formulaciones están presentes tampones, ya que se piensa que la molécula de factor VIII puede verse negativamente afectada por cambios del pH durante la liofilización. El pH debe mantenerse preferentemente en el rango de entre 6 y 8 durante la liofilización, en especial a un pH aproximadamente 7. El agente tampón puede ser cualquier entidad química o combinación de entidades químicas fisiológicamente aceptables que tengan la capacidad de actuar como tampones, incluyendo histidina, Tris, BIS-Tris Propano, PIPES, MOPS, HEPES, MES y ACES. Las designaciones químicas completas de estos agentes tampón se relacionan en la Tabla 1 siguiente. Típicamente, el agente tampón está incluido en una concentración de 10 a 50mM. Cuando se añade histidina a las formulaciones, se utilizan concentraciones de más de 20mM y preferentemente de aproximadamente 25mM, solas o

50 en combinación con otros tampones como Tris. La histidina es especialmente preferente para su utilización en las composiciones de la presente invención, tal como se describe más detalladamente a continuación.

**Tabla 1 - Agentes Tampón**

|                  |   |
|------------------|---|
| Tris             | tris(hidroximetil)aminometano                       |
| BIS-Tris Propano | 1,3-bis[tris(hidroximetil)etilamino]propano         |
| PIPES            | piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico)         |
| MOPS             | ácido 3-(N-morfolin)propanosulfónico                |
| HEPES            | ácido N-2-hidroxi-etilpiperazin-N'-2-etanosulfónico |
| MES              | ácido 2-(N-morfolin)etanosulfónico                  |
| ACES             | ácido N-2-acetamido-2-aminoetanosulfónico           |

5 Con el fin de conservar la actividad del factor VIII, es importante que las formulaciones de la presente invención incluyan también calcio u otro catión divalente capaz de interactuar con el factor VIII y mantener su actividad, presumiblemente manteniendo la asociación de las cadenas pesadas y ligeras del factor VIII. Se puede utilizar una sal de calcio de 1mM a 5mM, preferentemente 3 a 4mM, y en especial aproximadamente 4mM. La sal de calcio es preferentemente cloruro de calcio, pero puede ser también otra sal de calcio como gluconato de calcio, glubionato de calcio o gluceptato de calcio.

10 Las composiciones de factor VIII de la presente invención incluyen preferentemente un agente tensioactivo, preferentemente en una cantidad del 0,1% o inferior, y con más preferencia en una cantidad de aproximadamente el 0,03%. El agente tensioactivo puede ser seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo consistente en polisorbato 20, polisorbato 80, polioles Pluronic y Brij 35 (polioxietileno-23-lauril éter). Se dispone de varios grados de polioles Pluronic (vendidos bajo el nombre comercial Pluronic, fabricado por BASF Wyandotte Corporation). Estos polioles de diversos pesos moleculares (de 1.000 a más de 16.000) y variadas propiedades fisicoquímicas han sido utilizados como agentes tensioactivos. El Pluronic F-38, con un peso molecular de 5.000, y el Pluronic F-68, con un peso molecular de 9.000, contienen ambos (en peso) un 80 por ciento de grupos polioxietileno hidrofílicos y un 20 por ciento de grupos polioxipropileno hidrofóbicos. Sin embargo, en las presentes formulaciones se prefiere el Tween-80, un polisorbato comercial, en particular un Tween-80 procedente de plantas.

20 Las formulaciones de factor VIII de la presente invención también incluyen preferentemente un antioxidante. Se ha descubierto que la adición de antioxidantes a las formulaciones liofilizadas de la invención mejoraba su estabilidad y ampliaba así su vida útil en depósito. Los antioxidantes empleados deben ser compatibles para su uso con una preparación farmacéutica y, además, preferentemente son solubles en agua. Cuando se añaden antioxidantes a una formulación, es preferible añadir estos antioxidantes lo más tarde posible en el proceso anterior a la liofilización, con el fin de evitar la oxidación espontánea del antioxidante. La Tabla 2 a continuación relaciona antioxidantes adecuados, los cuales están disponibles comercialmente de compañías como Calbiochem y Sigma.

**Tabla 2 - Antioxidantes**

|   |
|---|
| N-Acetil-L-Cisteína / Homocisteína                              |
| Glutación   |
| Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) |
| Ácido lipoico   |
| Metionina   |
| Tiosulfato de sodio   |
| Platino   |
| Glicina-glicina-histidina (tripéptido)                          |
| Hidroxitolueno butilado (BHT)                                   |

Entre los antioxidantes anteriores, es preferente el glutatión. Se ha descubierto que concentraciones en el rango de aproximadamente 0,05 mg/ml hasta más de 1,0 mg/ml mejoraban todas la estabilidad de las composiciones de factor VIII, y se piensa que concentraciones más altas serían también útiles (hasta llegar a cualquier efecto tóxico o a cualquier efecto de fabricación negativo, tal como un descenso en la temperatura de transición del estado vítreo del producto liofilizado).

Se ha descubierto que, en particular, la combinación de histidina y glutatión produce efectos sinérgicamente beneficiosos en la estabilidad de las composiciones de factor VIII. La histidina, aunque actúe como tampón, puede actuar también como quelante metal. Hasta el extremo en que la inactivación del factor VIII sea causada por la oxidación inducida por el metal, la histidina puede actuar así estabilizando el factor VIII, uniendo estos iones metálicos oxidantes. Se cree que al unir estos metales, el glutatión (o realmente cualquier otro antioxidante presente) es así capaz de proporcionar otra protección antioxidante, ya que se contiene el efecto oxidativo de los iones metálicos unidos mediante la histidina.

En las composiciones de la presente invención se pueden utilizar también otros agentes quelantes. Estos agentes deben unir preferentemente metales tales como cobre y hierro con una mayor afinidad que el calcio, si se estuviera empleando una sal de calcio en la composición. Uno de estos quelantes es deferoxamina, agente quelante que facilita la eliminación de  $Al^{++}$  y hierro. El mesilato de deferoxamina  $C_{25}H_{46}N_6O_8 \cdot CH_4O_3S$  puede obtenerse de Sigma (Sigma Prod. No. D9533). Es un quelante de aluminio y hierro (II) que quela el hierro (como complejo de quelato al 1:1) solamente en el estado de oxidación +3, no el estado de oxidación +2, y puede también unir el ión manganeso y demás metales. Se puede utilizar ventajosamente la deferoxamina en una cantidad de 0,25 mg/l.

El factor VIII utilizado en las presentes formulaciones puede ser tanto factor VIII derivado de plasma humano muy purificado o, con más preferencia, factor VIII producido de forma recombinante. El factor VIII recombinante puede obtenerse a partir de células de ovario de hamster chino (CHO) transfectadas con un vector que lleva una secuencia de ADN que codifica para la molécula de factor VIII. Los métodos para crear estas células CHO transfectadas se describen, entre otras, en la Patente de Estados Unidos N° 4.757.006, de Toole, Jr., aunque se conocen también en la técnica otros métodos alternativos (véase por ejemplo la Patente de Estados Unidos N° 4.868.112, también de Toole, Jr., y la Solicitud Internacional PCT WO-A-91/09122). Los métodos empleados para cultivar estas células CHO para producir el Factor VIII también son conocidos en la técnica, por ejemplo en la Solicitud de Patente Europea N° 0.362.218, Genetics Institute, "Improved method for producing Factor VIII: C-type proteins". El factor VIII recombinante, sin embargo, puede producirse también a partir de otras líneas celulares, por ejemplo células renales de hamsters bebés (BHK). La molécula misma de factor VIII, cuando se produce de forma recombinante, puede ser de factor VIII de longitud total o un derivado de delección del mismo, tal como una molécula de Factor VIII eliminada en dominio B.

Aunque las composiciones de factor VIII descritas en esta solicitud puedan liofilizarse y reconstituirse en las concentraciones indicadas, el especialista en la materia entenderá que estas preparaciones también pueden ser reconstituidas en forma más diluida. Por ejemplo, una preparación de acuerdo con la presente invención que es liofilizada y/o normalmente reconstituida en 2 ml de una solución puede reconstituirse también en un mayor volumen de diluyente, tal como 5 ml. Esto es particularmente adecuado cuando la preparación de factor VIII se va a inyectar a un paciente inmediatamente, ya que en este caso es menos probable que el factor VIII pierda actividad, lo que puede ocurrir más rápidamente en soluciones más diluidas de factor VIII.

#### 40 Formulación y Desarrollo de la Liofilización

Con el fin de lograr una estabilidad máxima, las composiciones de factor VIII de la presente invención preferentemente se liofilizan. Durante la liofilización, el factor VIII que se encuentra en una fase acuosa se convierte en una fase sólida amorfa, lo cual está pensado para proteger la proteína de una inestabilidad química y/o conformacional. La preparación liofilizada no sólo contiene una fase amorfa, sino que incluye también un componente que se cristaliza durante la liofilización. Esto está pensado para permitir la liofilización rápida de la composición de factor VIII y la formación de una torta más elegante (es decir, una torta con una retracción mínima de los lados del recipiente en el cual ha sido liofilizada). En las formulaciones de la presente invención, los agentes estabilizantes se seleccionan de forma que aparezca en primer lugar una fase amorfa del producto liofilizado, mientras que los agentes de carga (excepto HES) se seleccionan para que cristalice durante la congelación.

Tanto el factor VIII como el estabilizante preferentemente aparecen dispersos en la fase amorfa de la torta liofilizada. La masa del estabilizante preferentemente también es mayor en comparación con los demás excipientes en la forma amorfa. Además, la temperatura aparente de transición al estado vítreo ( $T_g'$ ) de la fase amorfa preferentemente es relativamente alta durante el secado por congelación, y la temperatura de transición al estado vítreo ( $T_g$ ) del sólido es, del mismo modo, preferentemente alta durante el almacenamiento. Se ha descubierto que la cristalización de cloruro de sodio en el producto era deseable ya que el cloruro de sodio amorfo reducirá la  $T_g'$  de la fase amorfa.

Para evitar el deterioro de una torta de composición particular, el secado primario se lleva a cabo preferentemente a una temperatura de producto por debajo de la temperatura aparente de transición al estado vítreo del concentrado

congelado. También puede resultar necesario un aumento del tiempo de secado para contrarrestar una disminución de la  $T_g'$ . Se puede encontrar más información sobre la liofilización en Carpenter, J.F. y Chang, B.S., *Lyophilization of Protein Pharmaceuticals, Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing and Preservation*, K.E. Avis y V.L. Wu, eds. (Buffalo Grove, IL: Interpharm Press, Inc.), pp. 199-264 (1996).

## 5 Ejemplo Comparativo1

En varios estudios se investigaron los efectos de la concentración de factor VIII y de la adición de un estabilizante sobre la recuperación del factor VIII. Estos estudios se llevaron a cabo utilizando manitol como modelo de agente de carga y sacarosa como modelo de estabilizante. Se utilizaron en estos estudios las tres formulaciones de muestra descritas en la Tabla 3 a continuación. Todas las formulaciones empleadas en estos estudios incluían 10mM Tris, 200mM NaCl, un 8% de manitol, 4mM  $\text{CaCl}_2$  y un 0,02% de Tween-80 y se realizaron a un pH 7,0.

10

**Tabla 3**

| Nº Id. Muestra | Factor VIII Inicial (IU/ml) | % de Sacarosa |
|----------------|-----------------------------|---------------|
| IA             | 600                         | -             |
| IB             | 60                          | -             |
| IC             | 60                          | 2             |

Estas muestras fueron liofilizadas por medio del ciclo de secado por congelación mostrado en la Tabla 4 a continuación, con el fin de mantener una temperatura de producto por debajo de la temperatura aparente de transición al estado vítreo ( $T_g'$ ). Los estudios calorimétricos de exploración diferencial (DSC) indicaron la presencia de una transición a aproximadamente  $-40^\circ\text{C}$  en las formulaciones de manitol. Para mantener una temperatura de producto por debajo de este valor, la temperatura de depósito se estableció en  $-32^\circ\text{C}$  durante el secado primario. El secado primario en estas condiciones se llevó a cabo durante aproximadamente 55 horas, con un tiempo total del ciclo de aproximadamente 80 horas.

15

**Tabla 4**

| Método de Congelación / Procesamiento | Descripción  |
|---------------------------------------|--|
| <b>I</b><br>(Congelación)             | Enfriar a $+5^\circ\text{C}$ ;<br>Enfriar a $-5^\circ\text{C}$ a $1^\circ\text{C}/\text{min}$ , mantener durante 20 min;<br>Enfriar a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ a $1^\circ\text{C}/\text{min}$ , mantener durante 1 hora (hasta 3 horas);<br>Enfriar a $-45^\circ\text{C}$ a $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ , mantener durante 1 hora. |
| <b>II</b>                             | <b>Congelar según método I</b><br>Mantener a $-35^\circ\text{C}$ durante 48 horas.   |
| <b>III</b>                            | <b>Congelar según método I</b><br>Mantener a $-35^\circ\text{C}$ durante 48 horas;<br>Mantener a $-20^\circ\text{C}$ durante 48 horas.   |
| <b>IV</b><br>(Secado por congelación) | Depositar a $-32^\circ\text{C}$ durante secado primario por aprox. 55 horas (hasta 100 horas); Producto $<-40^\circ\text{C}$ durante secado primario; Rampa desde $-32^\circ\text{C}$ hasta $+40^\circ\text{C}$ a $0,2^\circ\text{C}/\text{min}$ ; Depositar a $+40^\circ\text{C}$ durante el secado secundario durante 3 horas.       |

La actividad del factor VIII de estas muestras, tal como se determina en el ensayo de coagulación de una etapa, se comparó contra un control mantenido a  $-45^\circ\text{C}$ . Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 5 a continuación.

20

Tabla 5

| Método de Procesamiento | % de Pérdida en la Actividad del Factor VIII Durante Cada Etapa |                              |   |
|-------------------------|---|------------------------------|---|
|                         | Formulación IA<br>(600 IU/ml)                                   | Formulación IB<br>(60 IU/ml) | Formulación IC<br>(60 IU/ml, 2% Sacarosa) |
| I                       | 6,7   | 37,5                         | 41,7                                      |
| II                      | 2,0   | 9,3                          | 3,9                                       |
| III                     | 7,3   | 11,6                         | 5,0                                       |
| IV (Liofilización)      | 20,0  | 24,2                         | 18,3                                      |

Estos resultados indican que la concentración de proteína tiene efectos sobre la recuperación del factor VIII durante la congelación. Las formulaciones que contenían 60 IU/ml perdieron aproximadamente de un 47% a un 42% de la actividad inicial de factor VIII durante la etapa de congelación, mientras que se perdió un 6,7% de la actividad de factor VIII con la formulación que contenía 600 IU/ml. Estos resultados indican que una concentración más alta de proteína tiene un efecto protector durante la congelación. Aunque la sacarosa proporcionara alguna protección al factor VIII a la temperatura intermedia, así como durante el secado por congelación, dejó de proteger la proteína durante la etapa inicial de congelación.

#### 10 Ejemplo Comparativo 2

Después del desarrollo del proceso de liofilización señalado en el Ejemplo 1, se emprendió otra optimización de este proceso. Se ha descubierto que una composición liofilizada que tiene una temperatura de transición al estado vítreo mayor (y, teóricamente, mejor estabilidad de factor VIII) puede producirse: (1) bajando la temperatura de congelación inicialmente a  $-45^{\circ}\text{C}$  o menos (tal como hasta aproximadamente  $-50^{\circ}\text{C}$  ó  $-55^{\circ}\text{C}$ ); (2) elevando la temperatura a  $-20^{\circ}\text{C}$  ó  $-22^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ); y luego (3) bajando de nuevo la temperatura a  $-45^{\circ}\text{C}$  o menos. La temperatura baja o sube, según el caso, a una velocidad de entre aproximadamente  $0,5^{\circ}\text{C}$  y aproximadamente  $1,0^{\circ}\text{C}$  por minuto. Una vez alcanzada la temperatura deseada, la composición se mantiene a esta temperatura durante 1 a 3 horas. Se muestra en la Tabla 6 este ciclo de congelación mejorado.

Tabla 6

| Método de Congelación | Descripción  |
|-----------------------|--|
| I                     | <p>Enfriar a <math>+5^{\circ}\text{C}</math>;</p> <p>Enfriar a <math>-5^{\circ}\text{C}</math> a <math>0,5-1^{\circ}\text{C}/\text{min}</math>, mantener durante 20 minutos.</p> <p>Enfriar a entre <math>-55^{\circ}\text{C}</math> y <math>-45^{\circ}\text{C}</math> a <math>0,5-1^{\circ}\text{C}/\text{min}</math>, mantener durante aproximadamente 1 hora;</p> <p>Calentar a <math>-22^{\circ}\text{C}</math> (<math>\pm 5^{\circ}\text{C}</math>) a <math>0,5-1^{\circ}\text{C}/\text{min}</math>, mantener durante 1 a 3 horas;</p> <p>Enfriar a <math>-45^{\circ}\text{C}</math> a <math>0,5-1^{\circ}\text{C}/\text{min}</math>, mantener durante aproximadamente 1 hora.</p> |

Salvo indicado de otro modo, las temperaturas mencionadas en este ejemplo y en otros ejemplos se refieren a la temperatura de depósito del liofilizador y no a la temperatura del producto en sí. Después del ciclo de congelación mejorado, el resto del proceso de liofilización puede llevarse a cabo tal como se señala en el Ejemplo 1 anterior, o de modo tal como el que se describe más adelante aquí o, tal como lo pueda determinar un especialista en la materia.

Se ha descubierto que este proceso mejorado de liofilización era útil para formulaciones que incluyen glicina como agente de carga, así como para aquellas que emplean manitol. Se cree además que es aplicable también a las formulaciones que hacen uso de los demás agentes de carga de la presente invención.

**Ejemplo Comparativo 3**

- Se cree que, con el fin de obtener un producto secado mediante congelación con aspecto de torta y temperatura de transición al estado vítreo aceptables, el agente de carga de las preparaciones farmacéuticas liofilizadas que contienen cloruro de sodio, tal como glicina o manitol, pueden necesitar de cristalización. Por tanto, se desarrolló el siguiente proceso mejorado de liofilización para agentes de carga cristalizables.

**Tabla 7a - Etapas de Congelación**

| <b>Etapas del Proceso</b> | <b>Temperatura</b>  | <b>Duración de la Etapa</b> |
|---------------------------|---------------------|-----------------------------|
| Congelación inicial       | -40°C o menos       | 1 hora                      |
| Primer recocido           | entre -23°C y -27°C | 3 horas                     |
| Segunda congelación       | -55°C               | 1 hora                      |
| Segundo recocido          | -36°C               | 4 horas                     |
| Tercera congelación       | -50°C               | 1 hora                      |

**Tabla 7b - Etapas de Secado por Congelación**

| <b>Etapas del Proceso</b>        | <b>Temperatura</b> | <b>Duración de la Etapa</b> |
|----------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| Secado primario                  | -35°C              | Hasta 100 horas             |
| Secado Secundario: primer etapa  | 40°C               | 3 horas                     |
| Secado Secundario: segunda etapa | 45°C               | 3 horas                     |
| Secado Secundario: tercera Etapa | 50°C               | 3 horas                     |

- 10 En las etapas de congelación, los cambios en las temperaturas ocurrieron a una velocidad de entre aproximadamente 0,5°C/minuto y 1°C/minuto. Se cree que etapas de mayor duración serían también eficaces.

Antes de la primera etapa de congelación, se lleva la temperatura a entre aproximadamente 2°C y 8°C durante aproximadamente una hora, con el propósito de llevar todos los viales a la misma temperatura aproximadamente.

- 15 Después, se enfría el liofilizador a -5°C. La primera etapa de congelación debe realizarse a una temperatura inferior a -30°C, preferentemente por debajo de -35°C y, en particular, a aproximadamente -40°C. Después, la primera etapa de recocido debe tener lugar a una temperatura de entre -30°C y -19°C, con más preferencia de entre aproximadamente -25°C y -28°C (si la glicina es el agente de carga) o entre -21°C y -24°C (si el manitol es el agente de carga), prefiriéndose las temperaturas de -23°C y -26°C, a tales temperaturas se piensa que los agentes de carga cristalizables cristalizan, al menos en parte. Sin embargo, no se recomienda un rango más bajo de alrededor de -27°C para formulaciones que contienen manitol y arginina. Esta etapa se lleva a cabo preferentemente durante aproximadamente 3 horas.

Después de la primera etapa de recocido, se baja la temperatura, preferentemente a menos de aproximadamente -50°C y especialmente a menos de -55°C, durante aproximadamente 1 hora. Se cree que el cloruro de sodio en la preparación forma un núcleo en este momento.

- 25 Durante la segunda etapa de recocido, la temperatura de la preparación farmacéutica asciende a aproximadamente entre -30°C y -39°C, y preferentemente a aproximadamente -33°C para las composiciones que contienen manitol y a -36°C para las composiciones que contienen glicina. Se cree que el crecimiento de cristales de NaCl ocurre en este momento, al menos en parte. Esta etapa se mantiene preferentemente durante aproximadamente 4 horas. Después, se disminuye la temperatura del liofilizador hasta aproximadamente -50°C, preferentemente durante
- 30 aproximadamente 1 hora, con el fin de reducir la temperatura de la preparación.

En las etapas de secado por congelación que siguen, los cambios en la temperatura se realizaron a una velocidad de aproximadamente entre 0,1°C/minuto y 0,5°C/minuto. Después de reducir la presión en el liofilizador a aproximadamente 65 mTorr, la temperatura asciende a aproximadamente entre -32°C y -35°C para el secado primario. Los cristales de hielo en la preparación se sublimarán a esta temperatura. Esta etapa se mantiene durante

hasta 100 horas aproximadamente, o hasta que la mayor parte del hielo se haya sublimado de la preparación. El punto en el cual la mayor parte del hielo se ha sublimado puede determinarse, por ejemplo, mediante un sensor de punto de rocío, que indica el final de la sublimación del hielo, cuando las lecturas disminuyen (el punto de inflexión).

- 5 Después del secado primario, la temperatura asciende a +40°C, preferentemente a una velocidad de 0,2°C/minuto, para iniciar el secado secundario que elimina el agua de la preparación. Esta temperatura se mantiene preferentemente durante aproximadamente tres horas. Las segunda y tercera etapas secundarias de secado siguen a esta primera etapa, donde la temperatura sube hasta aproximadamente +45°C durante aproximadamente tres horas y luego hasta aproximadamente +50°C durante tres horas más, con el fin de reducir la humedad de la torta liofilizada a menos del 2% (peso/peso).

#### 10 Ejemplo Comparativo 4

- 15 Se realizaron otros estudios para examinar específicamente el efecto de la histidina sobre las composiciones liofilizadas de factor VIII que contienen glicina o manitol como agentes de carga. Se utilizó un flujo irreversible de calor (DSC Modulado, mDSC) para detectar la cristalización de estos agentes de carga durante el enfriamiento. Tanto la temperatura de cristalización como el calor total de cristalización se determinaron según la exotermia de cristalización. Se utilizó el aspecto de la endotermya de fusión eutéctica de NaCl durante el calentamiento para detectar la cristalización de NaCl. En el mDSC, la magnitud de la cristalización se determinó como el coeficiente de la entalpía de fusión de la formulación con respecto a la entalpía de fusión de una solución de NaCl puro, por medio de la señal de flujo total de calor. Además, se realizaron análisis por difracción de rayos X con el fin de determinar el alcance de la cristalización en las formulaciones liofilizadas.

- 20 Aunque las concentraciones de histidina inferiores a 20mM no tuvieran un impacto notable sobre la cristalización de la glicina, con 50mM de histidina se redujo el alcance de la cristalización de la glicina. No se observaron exotermias bien definidas de cristalización de NaCl durante el enfriamiento de las formulaciones que contenían glicina. Sin embargo, las endotermias de fusión eutéctica durante el calentamiento indicaron que el NaCl se había cristalizado (> 50%) después de un enfriamiento inferior a -50°C y un recocido a -30°C, -35°C y -40°C. La inclusión de 50mM histidina en la formulación que contenía glicina retardó la cristalización de NaCl. En consecuencia, el tiempo de recocido aumentó de 3 veces en estas formulaciones para conseguir una cristalización equivalente.

- 25 Sin embargo, el efecto de 20mM histidina sobre la cristalización de NaCl en las formulaciones que contenían glicina fue mínimo. En los estudios de secado por congelación, se observó visualmente un deterioro de la torta liofilizada en las formulaciones que contenían glicina que comprendían 50 mM de histidina. Los datos de difracción en polvo de rayos X indicaron una disminución en la cristalización de NaCl en muestras que contenían histidina. En las formulaciones que contenían manitol, típicamente el 83% a 90% del cloruro de sodio cristalizó durante el enfriamiento entre -40°C y -50°C, sin que fuera necesario el recocido. Aunque la inclusión de 20mM histidina en la formulación suprimiera la cristalización de NaCl durante el enfriamiento, el recocido resultó en aproximadamente un 40% de cristalización de NaCl.

- 30 Por tanto, en formulaciones que contienen un agente de carga cristizable, tal como glicina o manitol, y NaCl, la inclusión de histidina puede disminuir la magnitud de la cristalización del NaCl. Aunque esto pudiera conducir en algunos casos al deterioro de la torta que se forma durante la liofilización, la utilización de concentraciones relativamente más bajas de histidina en estas formulaciones puede mitigar este efecto. Sin embargo, se han obtenido tortas aceptables con concentraciones de histidina de 35 mM y 50 mM. La histidina puede ser preferible también al HEPES como tampón en las formulaciones basadas en manitol y glicina, ya que se ha observado que el uso de HEPES disminuía la T<sub>g</sub>' en mayor medida que una cantidad similar de histidina.

#### Ejemplo 5

- 45 Se evaluaron en otro estudio las características físicas de diversas formulaciones potenciales de factor VIII, incluidos siete estabilizantes posibles y cinco agentes de carga. Además de un agente de carga y un estabilizante, todas las formulaciones relacionadas en la Tabla 8, a continuación, (excepto para la formulación 11) contenían 10mM Tris-HCl, 200mM NaCl, un 0,02% de Tween-80, 4mM CaCl<sub>2</sub> y tenían un pH 7,0. La formulación 11 contenía 10mM Tris-HCl, un 0,02% de Tween-80 y 4mM CaCl<sub>2</sub>, también a un pH de 7,0. Todas las medidas de pH se realizaron a temperatura ambiente.

Tabla 8

| Nº Id. Muestra | Agente de Carga | Estabilizante de Proteínas |
|----------------|-----------------|----------------------------|
| 1              | 8% de Manitol   | 2% de Sacarosa             |
| 2              | 8% de Manitol   | 2% de Trehalosa            |

|    |                          |                 |
|----|--------------------------|-----------------|
| 3  | 8% de Manitol            | 2% de Rafinosa  |
| 4  | 8% de Manitol            | 2% de Arginina  |
| 5  | 8% de Manitol            | 2% de Lisina    |
| 6  | 8% de Manitol            | 2% de Sorbitol  |
| 7  | 8% de Manitol            | 2% de Glicerol  |
| 8  | 4% de Hidroxietilalmidón | 2% de Sacarosa  |
| 9  | 8% de Glicina            | 2% de Sacarosa  |
| 10 | 8% de Glicina            | 2% de Trehalosa |
| 11 | 400mM NaCl               | 2% de Sacarosa  |
| 12 | 8% de Alanina            | 2% de Sacarosa  |

5 Las medidas de la temperatura del colapso por microscopía del secado por congelación y las medidas de transición térmica por DSC fueron utilizadas para prever el comportamiento del secado por congelación. Se utilizaron también DSC, difracción en polvo de rayos X y microscopía de luz polarizada para determinar la cristalinidad de las muestras liofilizadas. También se evaluaron el tiempo de reconstitución y el aspecto de las muestras. Los resultados de todas estas medidas se resumen en la Tabla 9 siguiente.

**Tabla 9**

| Nº Id. Muestra | T <sub>pc</sub> (°C) | T <sub>c</sub> (°C) | T <sub>g</sub> (°C) | Reconstitución (segundos) | Contenido en agua (%) | Aspecto                               |
|----------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 1              | -14                  | -10                 | 54                  | 64                        | n/c                   | Elegante                              |
| 2              | -20                  | -15                 | 53                  | 62                        | 1,4                   | Parte superior parcialmente colapsada |
| 3              | -15                  | -10                 | 54                  | 77                        | 1,7                   | Elegante<br>Colapso parcial           |
| 4              | -                    | -                   | -                   | -                         | -                     | Colapso                               |
| 5              | -                    | -                   | -                   | -                         | -                     | Elegante                              |
| 6              | n/c                  | n/c                 | <10°C*              | 63                        | 0,6                   | Elegante pero retraído en los lados   |
| 7              | -                    | -                   | <10°C*              | -                         | -                     |                                       |
| 8              | -                    | -                   | 86                  | 49                        | 0,7                   | Elegante                              |
| 9              | -                    | -                   | 54                  | 22                        | 0,8                   | Elegante (capa en el fondo)           |
| 10             | -                    | -                   | 63                  | 18                        | -                     | Elegante                              |
| 11             | -                    | -                   | 66                  | 11                        | 0,4                   |                                       |

|  |   |   |   |    |     |  |
|--|---|---|---|----|-----|--|
| 12   | - | - | - | 57 | 0,5 |  |
| <p>El sorbitol y el glicerol tienen transiciones al estado vítreo a &lt; 10°C. El rango de exploración DSC no incluía temperaturas en este rango.</p> <p>n/c = No claro.</p> <p>T<sub>pc</sub> = Temperatura a la cual tiene lugar el colapso parcial en el microscopio de secado por congelación.</p> <p>T<sub>c</sub> = Temperatura a la cual tiene lugar el colapso total en el microscopio de secado por congelación.</p> <p>T<sub>g</sub> = Temperatura de transición al estado vítreo.</p> |   |   |   |    |     |  |

Con excepción del manitol:lisina, aparece que todas las formulaciones tenían un aspecto físico adecuado. La lisina interfería en la cristalización tanto del manitol como de la glicina, lo que provocó una reducción en la temperatura de transición al estado vítreo y un colapso de la torta liofilizada.

**5 Ejemplo 6**

Las composiciones de Factor VIII descritas en la Tabla 8 anterior se almacenaron a -70°C, 25°C, 40°C y 50°C durante distintos intervalos de tiempo con el fin de evaluar su estabilidad. Se evaluaron los niveles de actividad del factor VIII después de 2 semanas, 1 mes, 2 meses y 3 meses, y se resumen los resultados en la Tabla 10, a continuación. Dos de las muestras, una empleando manitol como agente de carga y sorbitol como estabilizante y la otra empleando manitol como agente de carga y glicerol como estabilizantes mostraron poca estabilidad. Las formulaciones restantes mostraron todas su capacidad para estabilizar el factor VIII.

**Tabla 10**

| Descripción de la Formulación | Temperatura (°C) | % al inicio en el mes |        |        |        |       |
|-------------------------------|------------------|-----------------------|--------|--------|--------|-------|
|                               |                  | 0                     | 0,5    | 1      | 2      | 3     |
| Glicina: Sacarosa             | -70              | 100,00                | 97,43  | 101,71 | 99,89  | 97,97 |
|                               | 25               | 100,00                |        |        |        | 85,44 |
|                               | 40               | 100,00                |        | 79,87  | 71,52  | 63,06 |
|                               | 50               | 100,00                | 76,34  | 67,99  | 52,14  | 47,64 |
| Glicina: Trehalosa            | -70              | 100,00                | 89,22  | 96,00  | 95,90  | 94,64 |
|                               | 25               | 100,00                |        |        |        | 83,17 |
|                               | 40               | 100,00                |        | 79,93  | 72,42  | 68,03 |
|                               | 50               | 100,00                | 80,97  | 64,28  | 57,60  | 50,92 |
| Manitol: Trehalosa            | -70              | 100,00                | 91,32  | 97,72  | 96,10  | 98,26 |
|                               | 25               | 100,00                |        |        |        | 85,79 |
|                               | 40               | 100,00                |        | 82,54  | 70,72  | 59,44 |
|                               | 50               | 100,00                | 66,16  | 65,51  | 48,81  | 52,06 |
| Manitol: Sacarosa             | -70              | 100,00                | 100,45 | 100,56 | 105,47 | 99,22 |
|                               | 25               | 100,00                |        |        |        | 87,04 |
|                               | 40               | 100,00                |        | 85,59  | 80,78  | 55,42 |

ES 2 394 755 T3

|                  |     |        |        |        |        |        |
|------------------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|
|                  | 50  | 100,00 | 81,68  | 75,53  | 57,88  | 43,46  |
| Manitol-Arginina | -70 | 100,00 | 102,26 | 105,53 | 103,72 | 105,08 |
|                  | 25  | 100,00 |        |        |        | 95,15  |
|                  | 40  | 100,00 |        | 91,53  | 80,93  | 69,19  |
|                  | 50  | 100,00 | 82,28  | 68,06  | 56,32  | 45,94  |
| Manitol-Rafinosa | -70 | 100,00 | 93,88  | 98,41  | 100,68 | 103,62 |
|                  | 25  | 100,00 |        |        |        | 83,13  |
|                  | 40  | 100,00 |        | 81,09  | 73,61  | 67,16  |
|                  | 50  | 100,00 | 71,69  | 68,52  | 54,25  | 47,11  |
| Manitol:Glicerol | -70 |        |        |        |        |        |
|                  | 25  |        |        |        |        |        |
|                  | 40  |        |        |        |        |        |
|                  | 50  |        |        |        |        |        |
| Manitol:Sorbitol | -70 | 100,00 | 104,06 |        |        |        |
|                  | 25  | 100,00 |        |        |        |        |
|                  | 40  | 100,00 |        |        |        |        |
|                  | 50  | 100,00 | 32,73  |        |        |        |
| HES:Sacarosa     | -70 | 100,00 | 102,74 | 103,03 | 100,90 |        |
|                  | 25  | 100,00 |        |        |        |        |
|                  | 40  | 100,00 |        | 76,89  | 77,47  |        |
|                  | 50  | 100,00 | 71,47  | 67,40  | 30,02  |        |
| NaCl:Sacarosa    | -70 | 100,00 | 88,54  | 88,44  | 95,58  |        |
|                  | 25  | 100,00 |        |        |        |        |
|                  | 40  | 100,00 |        | 71,56  | 58,30  |        |
|                  | 50  | 100,00 | 52,71  | 37,90  | 30,34  |        |
| Alanina:Sacarosa | -70 | 100,00 | 109,78 | 109,67 | 108,96 |        |
|                  | 25  | 100,00 |        |        |        |        |
|                  | 40  | 100,00 |        | 92,99  | 73,03  |        |
|                  | 50  | 100,00 | 83,25  | 74,91  | 57,65  |        |
| Glicina:Rafinosa | -70 | 100,00 | 111,57 | 114,51 | 105,25 |        |
|                  | 25  | 100,00 |        |        |        |        |
|                  | 40  | 100,00 |        | 89,20  | 82,10  |        |
|                  | 50  | 100,00 | 93,21  | 72,22  | 53,24  |        |

**Ejemplo Comparativo 7**

En base a la información desarrollada durante los estudios descritos en los Ejemplos 5 y 6, se decidió que las formulaciones posibles que tenían los excipientes mostrados en la Tabla 11 siguiente serían desarrolladas más adelante.

5

**Tabla 11**

| <b>Excipiente</b>    | <b>Concentración</b> |
|----------------------|----------------------|
| Manitol o glicina    | 6-9%                 |
| Arginina o trehalosa | 1-3%                 |
| Tween-80             | 0,005-0,04%          |
| NaCl                 | 200-250 mM           |
| CaCl <sub>2</sub>    | 3-5 mM               |
| TRIS                 | 20-30 mM             |
| Histidina o HEPES    | 10-50 mM             |
| Glutación            | 0,15-0,25 mg/ml      |

En base a estos parámetros, se desarrollaron las siguientes formulaciones específicas:

**Tabla 12**

| <b>Formulación #1</b>           | <b>Formulación #2</b>           | <b>Formulación #3</b>           |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 10 mM de HEPES                  | 10 mM de HEPES                  | 10 mM de HEPES                  |
| 20 mM de Tris                   | 20 mM de Tris                   | 20 mM de Tris                   |
| 225 mM de NaCl                  | 225 mM de NaCl                  | 225 mM de NaCl                  |
| 0,03% (v/v) de Tween-80         | 0,03% (v/v) de Tween-80         | 0,03% (v/v) de Tween-80         |
| 8% (p/v) de manitol             | 8% (p/v) de glicina             | 8% (p/v) de manitol             |
| 2% (p/v) de trehalosa           | 2% (p/v) de trehalosa           | 2% (p/v) de arginina            |
| 0,2 mg/ml de glutación reducido | 0,2 mg/ml de glutación reducido | 0,2 mg/ml de glutación reducido |
| 4 mM de CaCl <sub>2</sub>       | 4 mM de CaCl <sub>2</sub>       | 4 mM de CaCl <sub>2</sub>       |

10

| <b>Formulación #4</b>   | <b>Formulación #5</b>   |
|-------------------------|-------------------------|
| 25 mM de histidina      | 25 mM de histidina      |
| 20 mM de Tris           | 20 mM de Tris           |
| 225 mM de NaCl          | 225 mM de NaCl          |
| 0,03% (v/v) de Tween-80 | 0,03% (v/v) de Tween-80 |
| 8% (p/v) de manitol     | 8% (p/v) de glicina     |

|                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 2% (p/v) de trehalosa           | 2% (p/v) de trehalosa           |
| 0,2 mg/ml de glutatión reducido | 0,2 mg/ml de glutatión reducido |
| 4 mM de CaCl <sub>2</sub>       | 4 mM de CaCl <sub>2</sub>       |

5 También se describe aquí una composición de Factor VIII formulada sin la adición de albúmina a la composición, que comprende la siguiente formulación de excipientes además del Factor VIII: del 4% al 10% de un agente de carga seleccionado de entre el grupo consistente en manitol, glicina y alanina; del 1% al 4% de un agente estabilizante seleccionado de entre el grupo consistente en sacarosa, trehalosa, rafinosa, arginina; una sal de calcio de 1mM a 5mM; NaCl de 100mM a 300mM; y un agente tampón para mantener un pH de aproximadamente 6 a 8.

En una realización, la composición de Factor VIII incluye adicionalmente un tensioactivo, tal como Polisorbato 20, Polisorbato 80, Pluronic F68 o Brij 35. El tensioactivo puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 0,03% o, si se trata de Polisorbato 80, en una cantidad inferior al 0,1%.

10 El agente tampón de la composición de Factor VIII se puede seleccionar de entre el grupo consistente en Tris, BIS-Tris Propano, histidina, PIPES, MOPS, HEPES, MES y ACES. En una realización, el agente tampón comprende entre aproximadamente 10mM y aproximadamente 50mM de histidina, preferentemente aproximadamente 25mM. En una realización, se utiliza Tris como agente tampón en una cantidad de aproximadamente 20mM.

15 En una realización, la composición de Factor VIII incluye además un antioxidante, tal como glutatión, preferentemente en una cantidad entre aproximadamente 0,05 mg/ml y aproximadamente 1,0 mg/ml. En otra realización, la composición de Factor VIII comprende un agente de carga presente en una cantidad de aproximadamente el 8%. Preferentemente, el agente de carga es manitol o glicina. En una realización, el agente estabilizante está presente en una cantidad de aproximadamente el 2%. Preferentemente, el agente estabilizante es sacarosa, arginina o trehalosa.

20 También se describe aquí una composición de Factor VIII formulada sin la adición de albúmina a dicha composición, que comprende la siguiente formulación de excipientes, además del Factor VIII: del 2% al 6% de hidroxietilalmidón, del 1 al 4% de un agente estabilizante seleccionado de entre el grupo consistente en sacarosa, trehalosa, rafinosa y arginina, una sal de calcio de 1mM a 5mM, NaCl 100mM a 300mM, y un agente tampón para mantener un pH aproximadamente entre 6 y 8.

25 Preferentemente, la composición de Factor VIII comprende aproximadamente un 4% de hidroxietilalmidón. En una realización, la composición de Factor VIII comprende NaCl aproximadamente 200mM. En una realización, el agente estabilizante está presente en una cantidad de aproximadamente el 2%. Preferentemente, el agente estabilizante es sacarosa, arginina o trehalosa.

30 La presente invención proporciona una composición de Factor VIII formulada sin la adición de albúmina a la composición, que comprende la siguiente formulación de excipientes, además del Factor VIII: NaCl de 300mM a 500mM; del 1% al 4% de un agente estabilizante seleccionado de entre el grupo consistente en sacarosa, trehalosa, rafinosa y arginina; una sal de calcio de 1mM a 5mM y un agente tampón para mantener el pH aproximadamente entre 6 y 8. En una realización, el NaCl está presente en una concentración de aproximadamente 400mM.

También se describe aquí el uso de estas composiciones de Factor VIII para el tratamiento de la hemofilia.

35 También se describe un procedimiento mejorado para la liofilización de una formulación farmacéutica acuosa que contiene un agente de carga cristalizable y NaCl, donde el procedimiento comprende las etapas de: a) enfriar la formulación farmacéutica acuosa a una temperatura inferior a 35°C; recocer la formulación farmacéutica a entre 30°C y 19°C; c) disminuir la temperatura de la formulación farmacéutica a menos de aproximadamente 50°C; d) recocer la formulación farmacéutica a entre 30°C y 39°C; y entonces e) secar por congelación la formulación farmacéutica.

40

**REIVINDICACIONES**

1. Composición de factor VIII formulada sin añadir albúmina a dicha composición, que comprende la siguiente formulación de excipientes además del factor VIII:
  - 300mM a 500 mM de NaCl;
- 5 del 1% al 4% (peso por volumen) de un agente estabilizante seleccionado de entre el grupo consistente en sacarosa, trehalosa, rafinosa y arginina;
  - 1 mM a 5 mM de sal de calcio; y
  - un agente tampón para mantener un pH de aproximadamente entre 6 y 8.
- 10 2. Composición de factor VIII según la reivindicación 1, caracterizada porque el NaCl está presente en una cantidad de aproximadamente 400 mM.
3. Composición de Factor VIII según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada porque la composición de Factor VIII es adecuada para la liofilización.
4. Composición liofilizada de Factor VIII obtenible mediante la liofilización de la composición de Factor VIII según la reivindicación 3.
- 15 5. Composición de Factor VIII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización en el tratamiento de la hemofilia.
6. Utilización de una composición de Factor VIII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la hemofilia.