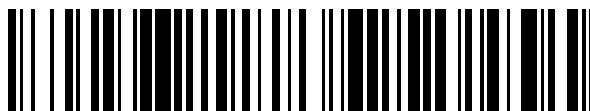


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 784**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/22** (2006.01)

**A61K 9/14** (2006.01)

**A61K 9/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2000 E 00935503 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2007 EP 1180368**

54 Título: **Preparaciones liofilizadas de HGF**

30 Prioridad:

**31.05.1999 JP 15176999**

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

**21.06.2013**

73 Titular/es:

**MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION (100.0%)  
14-1, SHIBA 4-CHOME  
MINATO-KU TOKYO 108-0014, JP**

72 Inventor/es:

**CHIBA, M.**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA CORTÉS, Óscar**

**ES 2 408 784 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

## Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a una preparación liofilizada que comprende un factor de crecimiento de hepatocitos.

## Antecedentes de la técnica

10 El factor de crecimiento del hepatocito (abreviado ocasionalmente en lo que sigue de esta descripción como "HGF") es una proteína que presenta una actividad prolífica de hepatocitos y su existencia es conocida en varias especies animales. Se ha informado de HGFs que presentan diferentes secuencias de aminoácidos. El factor de crecimiento del hepatocito humano (abreviado ocasionalmente en lo que sigue de esta descripción como "hHGF") fue hallado a partir de plasma de un paciente de hepatitis fulminante por Daikuhara *et al.* (publicación de la patente japonesa sin examinar (Kokai) nº 63-22526). La secuencia aminoácida de la proteína hHGF y la secuencia genética (cDNA) que codifica dicha proteína: fueron halladas por Kitamura *et al.* (publicación de la patente japonesa sin examinar nº 3-72883). Se ha informado de un procedimiento para producir la proteína hHGF y un transformante que utiliza dicho cDNA (publicación de la patente japonesa sin examinar nº 3-285693). Bajo tales circunstancias, resulta posible la producción masiva de la proteína hHGF y es de esperar su aplicación como medicamento.

20 El hHGF es una clase de glicoproteína, que es un heterodímero que consta de una subunidad que presenta un peso molecular de aproximadamente 80-90 kDa en un estado no reducido o aproximadamente 52-56 kDa en un estado reducido, y una subunidad  $\beta$  que posee un peso molecular de aproximadamente 30-36 kDa. Además de la actividad como factor de crecimiento celular hepático, el hHGF posee varias actividades biológicas tales como actividad de factor de dispersión (SF), actividad como factor de crecimiento celular epitelial tubular renal, factor reparador de tejido dañado y actividad como factor de crecimiento celular endotelial vascular, y se espera que la proteína sea desarrollada como medicamento para el tratamiento terapéutico de enfermedades hepáticas, enfermedades renales, trastornos nerviosos craneales, promotores de crecimiento capilar, agentes curativos de heridas, agentes terapéuticos antitumorales y similares.

30 Preparaciones farmacéuticas de HGF están descritas en WO90/10651 y la publicación de las patentes japonesas sin examinar nº 6-247872 y 9-25241. La antes mencionada WO90/10651 describe una preparación acuosa de HGF de tipo supresor (TCF) en la cual cinco residuos aminoácidos son suprimidos del HGF, y la publicación muestra que la albúmina, suero humano, gelatina, sorbitol, manitol, xilitol y similares estabilizan el TCF en una solución acuosa. La publicación de la patente japonesa sin examinar nº 6-247872 describe una inyección que contiene TCF en una elevada concentración de 5-10 mg/mL, en la cual coexiste un aminoácido básico o similar con TCF. Esta publicación se refiere a la solubilidad del TCF en una solución acuosa y describe una solución acuosa que contiene TCF en una concentración elevada. El aminoácido básico (lisina, arginina) se utiliza en la inyección como un "auxiliar de solubilización".

40 Sin embargo, la preparación acuosa de HGF reduce rápidamente la solubilidad del HGF bajo pH neutro y presenta un problema de incremento de acumulación, turbidez y gelación cuando se almacena a baja temperatura o temperatura ambiente durante varios días. Además, la preparación posee baja estabilidad fisicoquímica, por ejemplo formación de productos de degradación y cúmulos, y también presenta escasa estabilidad como preparación farmacéutica, por ejemplo reducción de la actividad biológica. Por tanto, la preparación no es adecuada para un almacenamiento prolongado desde el punto de vista de la actividad biológica. Además, la preparación acuosa de HGF puede causar acumulación, turbidez y gelación debido a la formación de espuma o similares después de batido y agitación, lo que lleva a reducir la calidad de una preparación farmacéutica y la eficacia del medicamento durante el almacenamiento prolongado, distribución y transporte. Por tanto, una preparación liofilizada es preferible como preparación de HGF.

50 La publicación de la patente japonesa sin examinar nº 9-25241 describe una preparación liofilizada de HGF (TCF). Sin embargo, a diferencia de la presente invención, la publicación de la patente muestra que una preparación liofilizada que comprende HGF (TCF) en una elevada concentración que es estable durante un largo periodo, puede obtenerse utilizando un citrato como agente tampón y glicina, alanina, sorbitol, manitol o similares como agente estabilizante. Sin embargo, debido al uso de ácido cítrico como agente tampón en la preparación liofilizada, el pH de una preparación redisuelta se encontrará en condición ácida. Además, la solución resultante posee una elevada presión osmótica, que causa problemas de dolor en la administración mediante inyección, o reacción inflamatoria y hemólisis en el punto de administración y similares.

60 El HGF es una sustancia que presenta actividades fisiológicas extremadamente potentes y, cuando se utiliza como medicamento, la sustancia debe suministrarse en el campo clínico como una preparación farmacéutica que presenta una concentración muy baja. Los estudios de los inventores de la presente invención revelaron que, en cuanto a la preparación liofilizada de HGF (TCF) que comprende glicina o alanina descrita en la publicación de la patente

japonesa sin examinar nº 9-25241, solamente se observó una reducida formación de cúmulos durante el almacenamiento, cuando la preparación liofilizada se producía a partir de una solución acuosa que contiene HGF en una concentración elevada, mientras que se observó la formación de cúmulos durante el almacenamiento cuando la preparación se producía en presencia de glicina o alanina al liofilizar una solución acuosa que contiene HGF en una concentración baja, lo cual es deseable para la aplicación clínica (generalmente, el HGF se presenta en una concentración inferior a 5 mg/mL, por ejemplo aproximadamente 2 mg/mL). Por lo tanto, la glicina o alanina descrita en la publicación de la patente japonesa sin examinar nº 9-25241 es útil como agente estabilizante cuando el HGF está liofilizado en una concentración elevada, sin embargo, el aminoácido no es suficiente como agente estabilizante cuando el HGF es liofilizado a una concentración baja. Resultaba por tanto deseable desarrollar un procedimiento para producir una preparación liofilizada que difícilmente forme cúmulos y presente excelente estabilidad en el almacenamiento prolongado, utilizando una solución acuosa que contiene HGF en una concentración baja.

### Descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una preparación liofilizada de HGF que puede producir una solución acuosa que contiene HGF en una concentración baja. Más específicamente, el objetivo de la presente invención es proporcionar una preparación liofilizada de HGF que presenta excelente estabilidad de almacenamiento y está libre de acumulación, turbidez y gelación o similares al ser redisuelta. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una preparación liofilizada que presenta una propiedad favorable de formar aglutinados durante la liofilización y una excelente redisolubilidad. Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar la preparación que presenta, como inyección, una relación de pH y presión osmótica deseable.

Los inventores de la presente invención siguieron diversos estudios para alcanzar los objetivos anteriores. Como resultado hallaron que cuando una solución que contiene HGF en una concentración inferior a 5 mg/mL fue liofilizada en presencia de un agente estabilizante cloruro sódico y un agente tampón, se obtuvo con éxito una preparación liofilizada que posee una propiedad favorable de formar aglutinados, solubilidad y estabilidad en almacenamiento prolongado, y que no se formaron cúmulos en la producción de la preparación liofilizada, así como durante el almacenamiento de dicha preparación, y la preparación liofilizada presentaba una estabilidad extremadamente elevada. Además, también hallaron que una solución acuosa preparada a partir de la preparación liofilizada estaba libre de acumulación, turbidez, gelación o similares, y la solución acuosa que contiene la concentración baja de HGF proporciona con éxito suficiente efectividad clínica. La presente invención se logró con base en los hallazgos anteriores.

Así, la presente invención proporciona:

una preparación liofilizada que comprende un factor de crecimiento de hepatocitos, un agente estabilizante seleccionado dentro del grupo formado por arginina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico y una de sus sales farmacológicamente aceptable para prevenir la formación de un cúmulo del factor de crecimiento de hepatocitos, cloruro sódico y un agente tampón, caracterizada porque la preparación liofilizada se prepara a partir de una solución acuosa que contiene el factor de crecimiento de hepatocitos en una concentración inferior a 5 mg/mL y/o la preparación liofilizada se utiliza para preparar una solución acuosa que contiene el factor de crecimiento de hepatocitos en una concentración inferior a 5 mg/mL mediante redisolución.

Estas preparaciones liofilizadas de HGF no producen cúmulos de HGF durante la liofilización y almacenamiento prolongado después de la liofilización, y presentan excelente estabilidad. Además, poseen características propias por las que no se producen acumulación, turbidez, gelación o similares en una solución acuosa preparada a partir de la preparación liofilizada, e incluso apenas se forman cúmulos después de almacenamiento de la solución acuosa.

Usualmente, es preferible que una solución acuosa utilizada para producir una preparación liofilizada en un vial y una solución acuosa preparada mediante disolución de la preparación liofilizada resultante en el vial contenga la misma concentración de un ingrediente activo. Por tanto, la preparación de la presente invención puede producirse preferiblemente liofilizando una solución acuosa que contiene HGF en una concentración inferior a 5 mg/mL en un vial o una ampolla. Además, en cuanto a la preparación de la presente invención, el pH de una solución acuosa antes de liofilización y/o la solución acuosa obtenida después de redisolución está preferiblemente en el intervalo de 5 a 6,5, el cual es deseable en forma de inyección. También, en cuanto a la preparación de la presente invención, la solución acuosa antes de liofilización y/o la solución acuosa obtenida después de redisolución posee preferiblemente una presión osmótica deseable en forma de inyección, por ejemplo, casi isotónica en cuerpos vivos o una relación de presión osmótica aceptable como inyección (1 a 2).

De acuerdo con realizaciones preferibles de la presente invención, se obtiene la preparación liofilizada de HGF antes mencionada, en la que el agente estabilizante está seleccionado dentro del grupo formado por arginina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico y sus sales farmacológicamente aceptables; la preparación liofilizada de HGF antes mencionada, en la que el agente estabilizante está seleccionado dentro del grupo formado por arginina,

lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico y sus sales farmacológicamente aceptables; la preparación liofilizada de HGF antes mencionada, en la que el agente estabilizante está seleccionado dentro del grupo formado por arginina, lisina, histidina y sus sales farmacológicamente aceptables; y la preparación liofilizada de HGF antes mencionada, en la que el agente estabilizante está seleccionado dentro del grupo formado por arginina, lisina y sus sales farmacológicamente aceptables. Estos agentes estabilizantes se añaden preferiblemente a la preparación en una cantidad suficiente para prevenir la formación de un cúmulo de HGF durante la liofilización y/o almacenamiento después de la liofilización.

Además, de acuerdo con otras realizaciones preferibles de la presente invención, se obtiene la preparación liofilizada de HGF antes mencionada, en la que el agente tampón es una sal del ácido fosfórico; la preparación liofilizada de HGF antes mencionada, que contiene además un agente tensioactivo; la preparación liofilizada de HGF antes mencionada, en la que el agente tensioactivo es un agente tensioactivo no iónico; y la preparación liofilizada antes mencionada, en la que el agente tensioactivo no iónico es un agente tensioactivo a base de éter de polioxietileno.

Desde otro aspecto de la presente invención, se proporciona un agente estabilizante del HGF utilizado para liofilizar una solución acuosa que contiene HGF en una concentración inferior a 5 mg/mL, el cual está seleccionado dentro del grupo formado por arginina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico y sus sales farmacológicamente aceptables. Preferiblemente, los agentes estabilizantes están seleccionados dentro del grupo formado por arginina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico y sus sales farmacológicamente aceptables. En forma particularmente preferible, los agentes estabilizantes están seleccionados dentro del grupo formado por arginina, lisina y sus sales farmacológicamente aceptables. Estos agentes estabilizantes pueden impedir la formación de un cúmulo de HGF durante la liofilización de una solución acuosa que contiene HGF en una concentración inferior a 5 mg/mL y durante el almacenamiento después de la liofilización.

La presente invención proporciona además una preparación liofilizada de HGF, que puede obtenerse liofilizando una solución acuosa que contiene el antes mencionado agente estabilizante y HGF en una concentración inferior a 5 mg/mL y se utiliza para preparar una solución acuosa que contiene HGF en una concentración inferior a 5 mg/mL mediante redisolución. Una preparación preferible de la antes mencionada preparación liofilizada puede obtenerse liofilizando una solución acuosa que contiene el agente estabilizante (preferiblemente un agente estabilizante seleccionado dentro del grupo que comprende arginina, lisina y sus sales farmacológicamente aceptables), el HGF en una concentración inferior a 5 mg/mL, cloruro sódico y un agente tampón en un vial.

#### Forma preferible de realizar la invención

El tipo de HGF contenido en la preparación liofilizada de la presente invención no está limitado en particular. Por ejemplo, el HGF natural puede ser aislado a partir de humores o tejidos derivados de mamíferos, como hombres y ratas, que se sabe contienen HGF, o células que espontáneamente producen HGF. También puede utilizarse un HGF recombinante obtenido por introducción de cDNA de dicho factor de crecimiento en células mediante técnicas de recombinación genética. Los ejemplos de huéspedes para producir un HGF recombinante incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, levadura, hongos filamentosos, células vegetales, células de insecto, células animales y similares. Los ejemplos específicos de HGF recombinante incluyen el obtenido a partir de placenta de mamíferos, tejidos hepáticos y sangre de un paciente hepatopático, cepas fibroblásticas como células MRC-5 y células IMR-9, cepas que producen HGF obtenidas por introducción de un vector de expresión que incluye cDNA que codifica el hHGF en un huésped, tal como las células CHO según el procedimiento descrito en la publicación de la patente japonesa sin examinar nº 3-285693 y similares.

Además, como HGF, una proteína precursora tal como una proteína que presenta una secuencia señal, una proteína modificada en la que algunos de los aminoácidos son reemplazados, suprimidos y/o insertados para no deteriorar la actividad de proliferación de hepatocitos, o una proteína alterada en la que un sacárido es suprimido o reemplazado. Los ejemplos de proteína alterada incluyen los descritos en la publicación de la patente japonesa sin examinar nº 2-288899, WO90/10651, publicación de la patente japonesa sin examinar nº 3-130091, 3-255096, 4-30000, *Nature*, 342, pp. 440-443 (1989) y similares.

Los ejemplos del HGF utilizado preferiblemente para la preparación liofilizada de la presente invención incluyen factores proteínicos que presentan las siguientes propiedades fisicoquímicas. El HGF está derivado del humano preferiblemente. Los ejemplos de HGF particularmente preferible incluyen aquellos que presentan las secuencias aminoácidas descritas en la publicación de la patente japonesa sin examinar nº 3-72883 y 4-89499.

1) El factor presenta un peso molecular estimado de aproximadamente 76,000-92,000 mediante SDS-PAGE (bajo condición no reductora);

2) El factor posee la actividad de proliferar hepatocitos; y

3) El factor posee fuerte afinidad por la heparina.

Además, junto a las anteriores propiedades fisicoquímicas, el HGF preferible presenta las siguientes propiedades:

5 4) Las actividades antes mencionadas se inactivan mediante un tratamiento térmico a 80°C durante 10 minutos; y

5) Las actividades antes mencionadas se inactivan mediante digestión con tripsina o quimotripsina.

10 Las preparaciones liofilizadas de HGF que contienen tres ingredientes de HGF, un agente tampón y cloruro sódico (las descritas en la publicación de la patente japonesa sin examinar nº 6-247872 y 9-25241: la concentración de HGF es 5-20 mg/mL) presentan el problema de que, cuando el contenido de HGF se reduce para evitar problemas tales como precipitación del HGF, no puede obtenerse una favorable aglutinación en el proceso de liofilización. Además, existe también un problema de acumulación, turbidez y gelación observable en una solución acuosa obtenida mediante redisolución de una preparación liofilizada obtenida a partir de los anteriores tres ingredientes, y así no puede alcanzarse suficiente estabilidad fisicoquímica. Por tanto, para preparar una preparación liofilizada que pueda dar una forma de aglutinación favorable mediante liofilización y permita la producción de una solución acuosa que presente excelente estabilidad de almacenamiento prolongado, es esencial añadir un aditivo que mejore la propiedad de formar aglutinados y estabilidad de almacenamiento en estado de solución acuosa.

20 La preparación liofilizada de la presente invención se produce a partir de una solución acuosa que contiene HGF en una concentración inferior a 5 mg/mL y/o está preparada de forma que una solución acuosa obtenida de la preparación liofilizada contiene HGF en una concentración inferior a 5 mg/mL. Preferiblemente, la preparación liofilizada puede ser producida de forma que una solución acuosa antes de liofilización y/o una solución acuosa obtenida después de redisolución presenten un pH deseable como inyección y posean una substancial isotonicidad con cuerpos vivos o una relación de presión osmótica aceptable como inyección (1 a 2). La preparación liofilizada de la presente invención se caracteriza por presentar excelente estabilidad de almacenamiento. La preparación liofilizada también se caracteriza porque la preparación puede formar una favorable liofilización aglutinada durante el proceso de liofilización, y que una solución acuosa obtenida mediante redisolución de la preparación liofilizada está libre de problemas de agregación, turbidez o gelación, con lo cual se logra suficiente estabilidad fisicoquímica. Además, en aplicaciones clínicas, la preparación puede cumplir suficientemente acciones farmacológicas deseables.

35 Los ejemplos de agente estabilizante incluyen arginina, lisina, histidina, ácido glutámico ácido aspártico y sus sales farmacológicamente aceptables. Los ejemplos de sales farmacológicamente aceptables incluyen sales alcalinometálicas tales como sales de sodio y potasio. Estos agentes estabilizantes pueden ser utilizados como una combinación de dos o más tipos. Los ejemplos de agentes estabilizantes preferibles incluyen arginina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico y similares. Entre ellos, arginina, lisina, histidina y una combinación de éstas son preferibles particularmente. La cantidad a añadir de agente estabilizante no está particularmente limitada siempre que la estabilidad de almacenamiento del HGF pueda lograrse, pero es preferiblemente 0,01-100 veces en peso, más preferiblemente 0,1-30 veces en peso con relación al peso de HGF.

40 El agente tampón tampoco está limitado particularmente siempre que el agente posea acción para ajustar el pH de las soluciones acuosas antes de liofilización y después de redisolución y mantener la solubilidad del HGF. Por ejemplo, pueden ser utilizados un tampón fosfato, un tampón citrato, un tampón acetato o similares. Como agente tampón, puede ser preferiblemente utilizado un tampón fosfato, en particular preferiblemente un tampón fosfato sódico. La cantidad de agente tampón a añadir es, por ejemplo, aproximadamente 1-100 mM basada en la cantidad de agua después de redisolución.

50 El cloruro sódico mejora la solubilidad de HGF en las soluciones acuosas antes de liofilización y después de redisolución, sin embargo, es preferible no añadir más cloruro sódico del necesario, ya que incrementa la presión osmótica. En general, basta añadir cloruro sódico en una cantidad suficiente para alcanzar una presión osmótica isotónica con cuerpos vivos. La relación de presión osmótica es más preferiblemente de 1-2, la cual es aceptable como la relación de presión osmótica para una inyección. Por ejemplo, es preferible añadir 140 mM de cloruro sódico con base en el volumen de agua después de redisolución.

55 El HGF presenta el problema de que su solubilidad disminuye rápidamente a pH neutro ya que el pH se solapa con el punto isoeléctrico del HGF (pI = 7-8). Por ejemplo, el HGF posee una baja solubilidad de un poco menos de 1,0 mg/mL alrededor de pH 7,0-7,5 en 10 mM de tampón fosfato sódico (PBS, temperatura ambiente) que contiene 140 mM de cloruro sódico. Mientras que el HGF posee una solubilidad de 5 mg/mL o más elevada alrededor de pH 5,0, y la solubilidad de HGF se hace más elevada a un pH más bajo. Además, en una concentración de cloruro sódico de 0,14 M, la solubilidad del HGF es aproximadamente 1 mg/mL, y cuando la concentración se lleva a 0,3 M o más elevada el HGF se disuelve en una concentración de 5 mg/mL o más elevada. Por tanto, es de esperar que, para incrementar la solubilidad del HGF la solución se mantenga en una condición ácida a un pH de 5 o inferior o la concentración de cloruro sódico se incremente a 0,3 M o más elevada. En la preparación de la presente invención,

es preferible que el pH de las soluciones acuosas antes de liofilización y/o después de redisolución se ajuste para hallarse dentro de un intervalo débilmente ácido específicamente a un pH de 4,0-6,5, preferiblemente un pH de 5,0-6,5. En tal intervalo de pH se evita la formación de un cúmulo.

5 La preparación liofilizada de HGF de la presente invención se añade además preferiblemente, con un agente tensioactivo. El HGF es fácilmente adsorbido por un material de envase tal como vidrio o una resina. En particular, a una concentración baja la adsorción del HGF por el envase conduce a una reducción del contenido de medicamento en una solución a ser administrada. Mediante adición de un agente tensioactivo puede ser evitada la adsorción de HGF por un envase después de redisolución. Los ejemplos de agente tensioactivo incluyen los agentes tensioactivos no iónicos tales como Polysorbate 80, Polysorbate 20, HCO-40, HCO-60, Pluronic F-68 y polietileno glicol, y también puede utilizarse una combinación de dos o más tipos de estos agentes. Como agente tensioactivo, los agentes tensioactivos a base de éter de polioxietileno (Polysorbate 80 y similares) pueden ser utilizados más preferiblemente. La cantidad de agente tensioactivo se halla, por ejemplo, en un intervalo de 0,001-2,0% en peso con relación al peso de agua después de redisolución.

15 La preparación liofilizada de HGF de la presente invención puede ser producida liofilizando una solución acuosa que contiene HGF según un procedimiento convencional. Por ejemplo, el HGF, un agente estabilizante, cloruro sódico y un agente tampón pueden ser disueltos en agua destilada para inyecciones, opcionalmente añadidos con un agente tensioactivo, esterilizados por filtración e introducidos en un envase tal como un vial o una ampolla, y luego sometidos a liofilización. La preparación liofilizada de HGF de la presente invención puede contener otros aditivos necesarios para la formulación, por ejemplo, agentes antioxidantes, conservantes, excipientes, sedantes y similares. Un ejemplo del procedimiento de liofilización incluye, por ejemplo, un procedimiento que comprende tres unidades operacionales: (1) una etapa de congelación para enfriar y congelar bajo presión atmosférica, (2) una etapa primaria de secado para sublimar y secar el agua libre no retenida por un soluto bajo presión reducida, y (3) una etapa secundaria de secado para retirar el agua adsorbida o cristalizada intrínseca al soluto (*Pharm. Tech. Japón, 8 (1), pp. 75-87, 1992*). Sin embargo, el procedimiento para producir la preparación liofilizada de la presente invención no se limita al procedimiento anterior. La preparación liofilizada de la presente invención puede ser disuelta por adición de un disolvente tal como agua destilada para inyección durante su empleo, de forma que la concentración de HGF sea inferior a 5 mg/mL.

### 30 Ejemplos

La presente invención se describirá más específicamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, el objeto de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

35 Ejemplo 1: Obtención de una preparación de HGF liofilizada y de concentración baja  
(Ejemplo comparativo)

40 El HGF se disuelve en una concentración de 1 mg/mL en 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5) que contiene 140 mM de cloruro sódico y 0,01% de Polysorbate 80, y se somete a filtración para esterilización, a fin de obtener una solución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la solución acuosa, esta solución se carga asépticamente dentro de viales en una cantidad de 2 mL por vial. Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse liofilizando la solución de acuerdo con las condiciones expuestas en la Tabla 1. En la tabla, "→" indica que la temperatura ha variado.

Tabla 1

	Proceso de congelación		Proceso primario de secado		Proceso secundario de secado	
Temperatura (° C)	20 → -40	-40	-40 → -20	-20	-20 → 20	20
Tiempo (h)	1	5	3	48	2	24
Presión (mmHg)	760	760	< 1	< 1	< 1	< 1

50 Ejemplo 2: Obtención de una preparación de HGF liofilizada y de concentración baja (Ejemplo comparativo)

55 El HGF se disuelve con calentamiento en una concentración de 5 mg/mL en 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5) que contiene 140 mM de cloruro sódico y 0,01% de Polysorbate 80 y se somete a filtración para esterilización, a fin de

obtener una solución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la solución acuosa, la solución se carga asépticamente dentro de viales en una cantidad de 2 mL por vial. Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse liofilizando la solución de acuerdo con las condiciones expuestas en la Tabla 1.

5 Ejemplo 3: Obtención de una preparación liofilizada de elevada concentración de HGF (Ejemplo comparativo)

10 El HGF se disuelve en una concentración de 10 mg/mL en 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5) que contiene 140 mM de cloruro sódico, 100 mM de arginina y 0,01% de Polysorbate 80 y se somete a filtración para esterilización, a fin de obtener una solución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la solución acuosa, la solución se carga asépticamente dentro de viales en una cantidad de 2 mL por vial. Una preparación liofilizada de elevada concentración de HGF puede obtenerse liofilizando la solución de acuerdo con las condiciones expuestas en la Tabla 1.

15 Ejemplo 4: Obtención de una preparación de HGF liofilizada y de concentración baja (Ejemplo comparativo)

20 El HGF se disuelve en una concentración de 1 mg/mL en 10 mM de tampón citrato (pH 5,0) que contiene 300 mM de cloruro sódico y 0,01% de Polysorbate 80 y se somete a filtración para esterilización, a fin de obtener una solución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la solución acuosa, la solución se carga asépticamente dentro de viales en una cantidad de 2 mL por vial. Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse liofilizando la solución de acuerdo con las condiciones expuestas en la Tabla 1.

Ejemplo 5: Obtención de una preparación de HGF liofilizada y de concentración baja (Ejemplo comparativo)

25 El HGF se disuelve en una concentración de 1 mg/mL en 10 mM de tampón citrato (pH 5,0) que contiene 300 mM de cloruro sódico, 5% de glicina y 0,01% de Polysorbate 80 y se somete a filtración para esterilización, a fin de obtener una solución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la solución acuosa, la solución se carga asépticamente dentro de viales en una cantidad de 2 mL por vial. Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse liofilizando la solución de acuerdo con las condiciones expuestas en la Tabla 1.

30 Ejemplo 6: Obtención de una preparación de HGF liofilizada y de concentración baja (Ejemplo comparativo)

35 El HGF se disuelve en una concentración de 1 mg/mL en 10 mM de tampón citrato (pH 5,0) que contiene 300 mM de cloruro sódico, 5% de alanina y 0,01% de Polysorbate 80 y se somete a filtración para esterilización, a fin de obtener una solución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la solución acuosa, la solución se carga asépticamente dentro de viales en una cantidad de 2 mL por vial. Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse liofilizando la solución de acuerdo con las condiciones expuestas en la Tabla 1.

Ejemplo 7: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

40 El HGF se disuelve en una concentración de 1 mg/mL en 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5) que contiene 140 mM de cloruro sódico y 100 mM de arginina y se somete a filtración para esterilización, a fin de obtener una solución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la solución acuosa, la solución se carga asépticamente dentro de viales en una cantidad de 2 mL por vial. Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse liofilizando la solución de acuerdo con las mismas condiciones del Ejemplo 1. Al tiempo de utilizarse, esta  
45 preparación puede disolverse en 2 mL de agua destilada para inyección, a fin de obtener una inyección que contiene HGF en una concentración de 1 mg/mL y que posee una relación pH y presión osmótica (1,5, casi isotónica) aceptable como inyección.

50 Ejemplo 8: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

55 El HGF se disuelve en una concentración de 1 mg/mL en 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5) que contiene 140 mM de cloruro sódico, 100 mM de arginina y 0,01% de Polysorbate 80 y se somete a filtración para esterilización, a fin de obtener una solución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la solución acuosa, la solución se carga asépticamente dentro de viales en una cantidad de 2 mL por vial. Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse liofilizando la solución de acuerdo con las mismas condiciones del Ejemplo 1.

Ejemplo 9: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

60 El HGF se disuelve en una concentración de 2 mg/mL en 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5) que contiene 140 mM de cloruro sódico, 100 mM de arginina y 0,01% de Polysorbate 80 y se somete a filtración para esterilización, a fin de obtener una solución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la solución acuosa, la solución se carga asépticamente dentro de viales en una cantidad de 2 mL por vial. Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse liofilizando la solución de acuerdo con las mismas condiciones del Ejemplo 1.

Ejemplo 10: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

5 El HGF se disuelve en una concentración de 3 mg/mL en 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5) que contiene 140 mM de cloruro sódico, 100 mM de arginina y 0,01% de Polysorbate 80 y se somete a filtración para esterilización, a fin de obtener una solución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la solución acuosa, la solución se carga asépticamente dentro de viales en una cantidad de 2 mL por vial. Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse liofilizando la solución de acuerdo con las mismas condiciones del Ejemplo 1.

10 Ejemplo 11 : Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

10 El HGF se disuelve en una concentración de 4 mg/mL en 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5) que contiene 140 mM de cloruro sódico, 100 mM de arginina y 0,01% de Polysorbate 80 y se somete a filtración para esterilización, a fin de obtener una solución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la solución acuosa, la solución se carga asépticamente dentro de viales en una cantidad de 2 mL por vial. Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse liofilizando la solución de acuerdo con las mismas condiciones del Ejemplo 1.

15 Ejemplo 12: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Ejemplo comparativo)

20 El HGF se disuelve en una concentración de 5 mg/mL en 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5) que contiene 140 mM de cloruro sódico, 100 mM de arginina y 0,01% de Polysorbate 80 y se somete a filtración para esterilización a fin de obtener una solución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la solución acuosa, la solución se carga asépticamente dentro de viales en una cantidad de 2 mL por vial. Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse liofilizando la solución de acuerdo con las mismas condiciones del Ejemplo 1.

25 Ejemplo 13: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

30 Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse disolviendo el HGF en una concentración de 1 mg/mL en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando 10 mM de tampón fosfato (pH 6,0) en lugar de 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5).

Ejemplo 14: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

35 Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse disolviendo el HGF en una concentración de 1 mg/mL en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando 10 mM de tampón fosfato (pH 5,5) en lugar de 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5).

Ejemplo 15: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

40 Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse disolviendo el HGF en una concentración de 1 mg/mL en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando 10 mM de tampón fosfato (pH 5,0) en lugar de 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5).

Ejemplo 16: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

45 Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse disolviendo el HGF en una concentración de 1 mg/mL en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando 10 mM de tampón fosfato (pH 7,2) en lugar de 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5).

Ejemplo 17: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

50 Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse disolviendo el HGF en una concentración de 1 mg/mL en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando 10 mM de tampón fosfato (pH 7,0) en lugar de 10 mM de tampón fosfato (pH 6,5).

55 Ejemplo 18: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando 50 mM arginina en lugar de 100 mM de arginina.

60 Ejemplo 19: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando lisina en lugar de arginina.



Ejemplo 20: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando histidina en lugar de arginina.

5

Ejemplo 21 : Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración

Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando glutamina en lugar de arginina.

10

Ejemplo 22: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración

Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando cisteína en lugar de arginina.

15

Ejemplo 23: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración

Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando prolina en lugar de arginina.

20

Ejemplo 24: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando glutamato sódico en lugar de arginina.

25

Ejemplo 25: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando aspartato sódico en lugar de arginina.

30

Ejemplo 26: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración

Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando glicina en lugar de arginina.

35

Ejemplo 27: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración (Presente invención)

Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse en la misma forma que en el Ejemplo 8 utilizando una cantidad de carga de 5 mL cada vial en lugar de 2 mL.

40

Ejemplo 28: Obtención de una preparación liofilizada de baja concentración

Se disuelven dextran sulfato sódico y HGF en concentraciones de 50 mg/mL y 1 mg/mL, respectivamente, en 10 mM de tampón fosfato sódico (pH 6,5) que contiene 140 mM de cloruro sódico y 0,01% de Polysorbate 80 y se someten a filtración para esterilización, a fin de obtener una solución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la solución acuosa, la solución se carga asépticamente dentro de viales en una cantidad de 2 mL por vial. Una preparación liofilizada de baja concentración de HGF puede obtenerse liofilizando la solución de acuerdo con las mismas condiciones del Ejemplo 1.

45

50 Ejemplo de prueba 1: Evaluación de solubilidad del HGF

(1) Procedimiento para evaluar la solubilidad del HGF

Se pesó el HGF en un tubo de polipropileno y se añadió con 10 mM de tampón fosfato sódico que contiene cloruro sódico y un agente estabilizante en diversas concentraciones y 0,01% de Polysorbate 80. El tubo se mantuvo inmediatamente a una temperatura constante para disolver el HGF. Inmediatamente después de la disolución, la solución se sometió a centrifugación (15,000 rpm, 10 minutos, temperatura constante) hasta separar completamente la solución saturada de HGF y el HGF sin disolver. El sobrenadante fue muestreado y filtrado a través de un filtro absorbente de baja proteína, Millipore GV (Durapore hidrofílico, 0,22 µm), y la concentración de HGF de la solución saturada resultante fue cuantificada mediante HPLC (procedimiento de filtración de gel) para determinar la solubilidad del HGF en saturación.

60

Condiciones para el análisis HPLC

Columna: TOSOH TSK G-3000SWXL (φ 0,78 x 30 cm)

Promedio de flujo: 0,3 mL/min

5 Detección longitud de onda: OD 280 nm

Temperatura: 30°C

10 Portador: 0,3 M NaCl, 50 mM fosfato sódico, 0,1% SDS, pH 7,5

Aplicación: 50 µl

Tiempo de retención de HGF: 24,0 min

15 (2) Influencia del pH en la solubilidad del HGF

Se prepararon soluciones de diferente pH utilizando 10 mM de tampón fosfato sódico que contiene 140 mM de cloruro sódico y 0,01% de Polysorbate 80. La solubilidad del HGF fue examinada a 4°C y 20°C por el procedimiento (1). Los resultados se exponen en la Tabla 2. La solubilidad del HGF se incrementó gradualmente con el descenso del pH. Una mejora: apreciable de la solubilidad se detectó a pH 5,0 o más bajo. Además, se observó un incremento de solubilidad con la elevación de temperatura en todas las muestras.

Tabla 2

	20° C	4° C
pH 7,5	0,8	0,4
pH 7,0	1,8	1,0
pH 6,0	2,3	1,3
pH 5,0	5,9	4,2

25

(La solubilidad del HGF se representa en mg/mL)

30 (3) Influencia de la concentración de cloruro sódico en la solubilidad del HGF

Se prepararon soluciones 10 mM de tampón fosfato sódico (pH 7,5) que contienen cloruro sódico en diversas concentraciones y 0,01% de Polysorbate 80. La solubilidad del HGF se examinó a 4°C y 20°C por el procedimiento (1). Los resultados se exponen en la Tabla 3. Un marcado incremento de la solubilidad del HGF se observó con el aumento de la concentración de cloruro sódico. Además, se observó un incremento de solubilidad con la elevación de temperatura en todas las muestras.

35

Tabla 3

	20° C	4° C
Sin adición	0,3	0,1
+ 140 mM NaCl	0,8	0,4
+ 230 mM NaCl	3,2	1,4
+ 300 mM NaCl	8,5	4,0
+ 900 mM NaCl	> 190	-

40

(La solubilidad del HGF se representa en mg/mL)

45 (4) Influencia de diversos agentes estabilizantes en la solubilidad del HGF

Se examinó la influencia de diversos aditivos para preparaciones farmacéuticas en la solubilidad del HGF. El HGF se disolvió en una concentración de 1 mg/mL en soluciones 10 mM de tampón fosfato sódico (pH 6,8-7,5) que contienen aditivos en diversas concentraciones. 140 mM de cloruro sódico y 0,01% de Polysorbate 80, a fin de obtener soluciones acuosas de HGF. Una cantidad de 200 µL de cada solución acuosa se introdujo en cada pocillo

50

de una placa de microtitulación de 96 pocillos y se almacenó a 4°C durante 48 horas. Luego, la turbidez de cada solución acuosa de HGF se determinó midiendo OD a 450 nm utilizando un lector de placas. La turbidez de la solución creció con el descenso de la solubilidad de HGF lo que produjo acumulación y precipitación del HGF.

5 La Influencia sobre la solubilidad del HGF se evaluó para aditivos que incluyen 20 tipos de L-aminoácidos (arginina, lisina, histidina, serina, treonina, asparagina, glutamina, aspartato sódico, glutamato sódico, cisteína, glicina, prolina, alanina, isoleucina, leucina, metionina fenilalanina, tirosina, triptofano, valina), 7 tipos de sacáridos (manitol, fructosa, trehalosa, glucosa, sorbitol, suerosa, lactosa), 3 tipos de polímeros (dextran sulfato, dextran, PEG), 3 tipos de proteínas (albúmina de suero humano, gelatina ácida, gelatina básica) y 3 tipos de agentes tensioactivos (Polysorbate 80, Polysorbate 20, HCO-40, HCO-60). Un efecto de estabilización para mantener la solubilidad del HGF se observó en las sustancias enunciadas seguidamente.

10 (i) Aminoácidos: arginina, lisina, histidina, glutamato sódico, aspartato sódico, glutamina, cisteína, prolina (el efecto se confirmó a 0,05 M)

15 (ii) Polisacáridos: dextran sulfato (el efecto se confirmó a 0,1%)

Utilizando los aminoácidos que produjeron efectos apreciables, se prepararon soluciones en 10 mM de tampón fosfato sódico (pH 7,0) que contenían 140 mM de cloruro sódico, 0,01% de Polysorbate 80, y cada uno de los aminoácidos en una variedad de concentraciones. La solubilidad del HGF se examinó a 4°C por el procedimiento (1). Los resultados se exponen en la Tabla 4.

Tabla 4

25

		Solubilidad a saturación	Relación de presión osmótica
Sin aditivo		1,0	1,0
+ L-Arg	50 mM	7,3	1,3
+ L-Lis	50 mM	4,5	1,3
+ L-His	50 mM	3,2	1,2
+ L-GluNa	50 mM	2,2	1,3
+ L-Arg	100 mM	> 10	1,6
+ L-Lis	100 mM	> 10	1,6
+ L-His	100 mM	4,8	1,4
+ L-GluNa	100 mM	3,2	1,6

(La solubilidad del HGF se representa en mg/mL)

30

Ejemplo de prueba 2: Propiedades de las soluciones acuosas de HGF antes y después de liofilización

35 Para observar cualquier cambio en la estabilidad física del HGF durante el proceso de liofilización, se almacenó una solución acuosa de HGF antes de liofilización y una solución acuosa de HGF obtenida mediante redisolución de la preparación liofilizada en agua purificada, sin otro tratamiento, a 4°C durante 24 horas, y se observó visualmente una propiedad (turbidez) de las soluciones después de disolución. El tiempo necesario para la redisolución de la preparación liofilizada y la relación de presión osmótica fueron también evaluados. Los resultados se exponen en la Tabla 5.

40 Cuando las preparaciones liofilizadas de los Ejemplos 1 y 22 fueron redisueltas y almacenadas a 4°C durante 24 horas, las soluciones se enturbiaron. Las preparaciones de otros ejemplos se hallaron estables en cuanto a la propiedad anterior.

Tabla 5

Preparación	Solución acuosa antes de liofilización	Solución acuosa después de redisolución	Relación de presión osmótica
Ejemplo 1	Turbia	Soluble al instante, turbia	1,0
Ejemplo 4	Clara	Soluble al instante, clara	2,0
Ejemplo 5	Clara	Apenas soluble, clara	4,0
Ejemplo 6	Clara	Apenas soluble, clara	3,9
Ejemplo 8	Clara	Soluble al instante, clara	1,5
Ejemplo 19	Clara	Soluble al instante, clara	1,6
Ejemplo 20	Clara	Soluble al instante, clara	1,4
Ejemplo 21	Clara	Soluble al instante, clara	1,3
Ejemplo 22	Clara	Apenas soluble, turbia	1,7
Ejemplo 23	Clara	Soluble al instante, clara	1,3
Ejemplo 24	Clara	Soluble al instante, clara	1,5
Ejemplo 25	Clara	Soluble al instante, clara	1,5
Ejemplo 26	Clara	Soluble al instante, clara	1,3
Ejemplo 28	Clara	Soluble al instante, clara	1,3

5

Ejemplo de prueba 3: Propiedades de la preparación liofilizada después de disolución

- 10 El tiempo necesario para redisolución y una propiedad de la solución (turbidez) después de redisolución de las preparaciones liofilizadas obtenidas en los ejemplos fueron evaluados inmediatamente después de liofilización y después de almacenamiento a 25°C, 40°C y 50°C durante 1 mes. Las preparaciones liofilizadas se disolvieron en agua purificada y la propiedad fue evaluada a temperatura ambiente. Los resultados se exponen en la Tabla 6.
- 15 Entre las almacenadas a 25°C, la solución de la preparación del Ejemplo 22 se volvió turbia inmediatamente después de disolución de la preparación liofilizada, mientras que las preparaciones de los otros ejemplos se hallaron estables en cuanto a la propiedad. Además durante almacenamiento a 40°C y 50°C, las soluciones de las preparaciones de los Ejemplos 1, 22, 23, 24 y 25 se volvieron turbias inmediatamente después de disolución. Sin embargo, las preparaciones de los otros ejemplos se hallaron estables en cuanto a la propiedad anterior.

20

Tabla 6

Preparación	Preparación después de almacenamiento durante 1 mes		
	25° C	40° C	50° C
Ejemplo 1	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, turbia	Soluble al instante, turbia
Ejemplo 4	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara
Ejemplo 5	Apenas soluble, clara	Apenas soluble, clara	Apenas soluble, clara
Ejemplo 6	Apenas soluble, clara	Apenas soluble, clara	Apenas soluble, clara
Ejemplo 8	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara
Ejemplo 19	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara
Ejemplo 20	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara
Ejemplo 21	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara
Ejemplo 22	Apenas soluble, turbia	Apenas soluble, turbia	Apenas soluble, turbia
Ejemplo 23	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, turbia	Soluble al instante, turbia
Ejemplo 24	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, turbia	Soluble al instante, turbia
Ejemplo 25	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, turbia	Soluble al instante, turbia
Ejemplo 26	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara
Ejemplo 28	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara	Soluble al instante, clara

25

Ejemplo de prueba 4: Variación en el contenido de cúmulos en una preparación liofilizada

La relación entre el contenido de cúmulos y el contenido de HGF en las preparaciones liofilizadas obtenidas en los ejemplos fue comparada inmediatamente después de liofilización (valor inicial) y después de almacenamiento a 25°C, 40°C y 50°C durante 1 mes. Se aplicó el procedimiento del Ejemplo de prueba 1 (1) (procedimiento de filtración de gel). Los resultados se exponen en las Tablas 7 y 8.

Tiempo de retención de cúmulos: 20,4 min, 21,8 min

10 Tiempo de retención de HGF: 24,0 min

Con la elevación de la temperatura de almacenamiento, se observó una tendencia de formación de cúmulos incrementada. Sin embargo, las preparaciones liofilizadas de los Ejemplos 8, 19 y 20, en particular, produjeron una formación de cúmulos extremadamente baja y se hallaron fisicoquímicamente estables. Así, se concluyó que la adición de arginina, lisina e histidina mantenía la formación de cúmulos en un nivel bajo incluso después de almacenamiento a alta temperatura (tasa de formación de cúmulos: aproximadamente 3% o menos a 40°C y aproximadamente 5-9% o menos a 50°C), con lo cual se mejora la estabilidad de almacenamiento. Una prueba similar se realizó como ejemplo comparativo utilizando una preparación liofilizada del Ejemplo 1 que fue obtenida según el mismo procedimiento y empleando los mismos ingredientes excepto que no contenía arginina. Como resultado, se observó un acusado incremento en la formación de cúmulos con la elevación de la temperatura de almacenamiento.

Además, como se expone en la Tabla 8, se demostró que reduce la concentración de HGF (inferior a 5 mg/mL) acelera la formación de cúmulos, lo que produjo inferior estabilidad de almacenamiento. Se halló que, cuando se utilizaba glicina o alanina como agente estabilizante de la preparación liofilizada, según se describe en la publicación de la patente japonesa sin examinar n° 9-25411, la formación de cúmulos se aceleraba y la estabilidad de almacenamiento disminuía en las preparaciones liofilizadas de baja concentración de HGF (Ejemplos 5, 6 y 26, 1 mg/mL) en comparación con las preparaciones liofilizadas de elevada concentración de HGF (Ejemplos 5 y 6 en la publicación de la patente japonesa sin examinar n° 9-25411, 20 mg/mL).

Mientras que se ha demostrado que en las preparaciones liofilizadas de los Ejemplos 8, 19 y 20 en las que se utilizaba arginina, lisina o histidina como agente estabilizante de la preparación liofilizada, la formación de cúmulos se suprimió apreciablemente y así la estabilidad de almacenamiento fue mejorada incluso en las preparaciones liofilizadas de baja concentración de HGF (1 mg/mL).

35

Tabla 7

Preparación	Preparación después de almacenamiento durante 1 mes			
	Valor inicial	25° C	40° C	50° C
Ejemplo 1	0,48	5,50	24,27	40,63
Ejemplo 4	0,35	0,48	3,80	11,24
Ejemplo 5	0,31	0,69	4,40	9,58
Ejemplo 6	0,30	0,54	3,20	9,53
Ejemplo 8	0,30	0,11	0,18	0,60
Ejemplo 19	0,31	0,16	1,74	4,48
Ejemplo 20	0,31	0,18	0,28	0,88
Ejemplo 21	0,31	0,54	2,77	16,89
Ejemplo 22	-	-	-	-
Ejemplo 23	0,32	0,31	3,24	11,24
Ejemplo 24	0,32	2,19	4,90	6,39
Ejemplo 25	0,34	1,11	4,80	7,73
Ejemplo 26	0,36	0,33	6,21	22,66
Ejemplo 28	2,74	3,48	13,30	32,87
Ejemplo 1*	1,07			6,17
Ejemplo 5*	0,92			4,09
Ejemplo 6*	0,93			2,90
Ejemplo 9*	1,78			14,01

40

\*Cita según Tablas 4 y 6 en la publicación de la patente japonesa sin examinar n° 9-25241

Tabla 8

Preparación		Contenido total/contenido de HGF de la preparación liofilizada almacenada a 50° C durante 1 mes
[Preparación que no contiene aminoácido]		
Ejemplo 1	(HGF a 1 mg/mL)	40,63
Ejemplo 4	(HGF a 1 mg/mL)	11,24
Ejemplo 9*	(HGF a 10 mg/mL)	14,01
Ejemplo 1*	(HGF a 20 mg/mL)	6,17
[Preparación que contiene glicina]		
Ejemplo 5	(HGF a 1 mg/mL)	9,58
Ejemplo 5*	(HGF a 20 mg/mL)	4,09
[Preparación que contiene alanina]		
Ejemplo 6	(HGF a 1 mg/mL)	9,53
Ejemplo 6*	(HGF a 20 mg/mL)	2,90

5

\*Cita según Tablas 4 y 6 en la publicación de la patente japonesa sin examinar nº 9-25241

10

Ejemplo de prueba 5: Variación en el contenido total en la preparación liofilizada - influencia del pH sobre la formación de cúmulos

15

La relación entre el contenido total y el contenido de HGF en las preparaciones liofilizadas que presentan diversos pH preparadas en los ejemplos 8, 13, 14, 16 y 17 se determinó inmediatamente después de liofilización (valor inicial) y después de almacenamiento a 50°C durante 1 mes, 2 meses y 3 meses. Se utilizó el procedimiento del Ejemplo de prueba 1 (1) (procedimiento de filtración de gel). Los resultados se exponen en la Tabla 9.

Tiempo de retención de cúmulos: 20,4 min, 21,8 min

20

Tiempo de retención de HGF: 24,0 min

25

En las preparaciones liofilizadas de los Ejemplos 16 y 17 con un pH de 7,0 y 7,2, se incrementó la formación de cúmulos durante el tiempo de almacenamiento a 50°C. Mientras que en las preparaciones de los Ejemplos 8, 13 y 14, que presentaban pH de 6,5 o menos, se mantuvo en un nivel bajo la formación de cúmulos. Se concluyó, así, que la estabilidad se mejoraba bajo pH ligeramente ácido.

Tabla 9

Preparación	Almacenamiento a 50° C			
	Valor inicial	Almacenada durante 1 mes	Almacenada durante 2 meses	Almacenada durante 3 meses
Ejemplo 14 (pH 5,5)	0,48	0,38	0,56	0,76
Ejemplo 13 (pH 6,0)	0,35	0,91	0,51	1,31
Ejemplo 8 (pH 6,5)	0,31	1,40	1,58	1,28
Ejemplo 17 (pH 7,0)	0,30	1,26	2,16	2,96
Ejemplo 16 (pH 7,2)	0,30	5,64	7,63	12,71

30

Ejemplo de prueba 6: Variación en la actividad biológica (actividad específica) de la preparación liofilizada

5 Las preparaciones liofilizadas preparadas en los Ejemplos 1 y 8 se almacenaron a 25°C o 50°C durante 2 meses o a 10°C o 25°C durante 1,5 años. Las actividades biológicas de las soluciones acuosas obtenidas mediante redisolución de las preparaciones liofilizadas se determinaron mediante el procedimiento para determinar la actividad biológica que sigue. Los resultados se exponen en la Tabla 10.

Procedimiento para determinar la actividad biológica

10 Una cepa celular hepática humana PLC/PRF/5 se cultivó hasta la fase de crecimiento logarítmico, y se observó la tasa de supervivencia celular. Luego, se preparó una solución<sup>n</sup> celular con una densidad de  $0,7 \times 10^5$  células/mL. Una cantidad de 100 µL de la solución celular se situó en cada pocillo de una placa de ensayo de 96 pocillos añadida previamente con una muestra de HGF o una muestra estándar de forma que el recuento celular fue  $0,7 \times 10^4$  células/pocillo (n = 4). Después de pre-incubación a 37°C durante 20 horas en un incubadora 5% de dióxido de carbono, se añadió [<sup>3</sup>H-timidina] y el cultivo se continuó durante 6 horas. Después de completar el cultivo, 15 las células fueron cosechadas utilizando un Sistema Beta Plate (Pharmacia) y se midió la cantidad de [<sup>3</sup>H] absorbida en las células. Los resultados medidos fueron verificados mediante la prueba de línea paralela. El título (%) se obtuvo dividiendo la actividad específica de la muestra de HGF por la actividad específica del estándar.

20 En cuanto a la preparación liofilizada del Ejemplo 8 se añadió con arginina, la actividad biológica resultó casi inalterada incluso después del almacenamiento a alta temperatura y la preparación fue estable en su actividad biológica. Además, se realizó una prueba similar como un ejemplo comparativo, utilizando una preparación liofilizada obtenida por el mismo procedimiento y con los mismos ingredientes del Ejemplo 1 excepto que no contenía arginina. Como resultado, se observó un acusado descenso en la actividad biológica con la elevación de la temperatura de 25 almacenamiento.

Tabla 10

	Almacenada durante 2 meses		Almacenada durante 1,5 años	
	25° C	50° C	10° C	25° C
Ejemplo 1	64,5%	10,2%	-	-
Ejemplo 8	87,1%	71,0%	72,6%	66,1%

30

**Aplicación industrial**

35 La preparación liofilizada de la presente invención puede ser utilizada para preparar una solución acuosa clínicamente útil que contiene HGF en una concentración baja, y dicha preparación está casi libre de formación de cúmulos durante la liofilización y almacenamiento después de la liofilización y presenta así una estabilidad excelente. Además, dicha preparación se caracteriza por la favorable propiedad de formar aglutinados durante la liofilización y excelente resolubilidad. Además, dicha preparación también puede realizarse en una preparación con un pH y una relación de presión osmótica deseable como inyección.

40

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación liofilizada que comprende un factor de crecimiento de hepatocitos, un agente estabilizante seleccionado dentro del grupo formado por arginina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico y una de sus sales farmacológicamente aceptable para prevenir la formación de un cúmulo del factor de crecimiento de hepatocitos, cloruro sódico y un agente tampón, **caracterizada** porque la preparación liofilizada se prepara a partir de una solución acuosa que contiene el factor de crecimiento de hepatocitos en una concentración inferior a 5 mg/mL y/o la preparación liofilizada se utiliza para preparar una solución acuosa que contiene el factor de crecimiento de hepatocitos en una concentración inferior a 5 mg/mL mediante redisolución.
- 10 2. La preparación liofilizada según la reivindicación 1, en la que el agente estabilizante está seleccionado dentro del grupo formado por arginina, lisina, histidina y una de sus sales farmacológicamente aceptable.
- 15 3. La preparación liofilizada según la reivindicación 1 o 2, en la que el agente tampón es una sal del ácido fosfórico.
4. La preparación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el pH de la solución acuosa antes de liofilización se encuentra en el intervalo de 5 a 6,5.
- 20 5. La preparación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el pH de la solución acuosa antes de redisolución se encuentra en el intervalo de 5 a 6,5.
6. La preparación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que contiene además un agente tensioactivo.
- 25 7. La preparación liofilizada según la reivindicación 6, en la que el agente tensioactivo es un agente tensioactivo no iónico.
8. La preparación liofilizada según la reivindicación 7, en la que el agente tensioactivo no iónico es un agente tensioactivo a base de éter de polioxietileno.
- 30 9. La preparación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que está preparada en un vial o una ampolla.
- 35 10. La preparación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que contiene el agente estabilizante en una cantidad de 0,1 a 30 veces en peso con relación al peso de HGF.
- 40 11. El uso de un agente estabilizante del HGF para liofilizar una solución acuosa que contiene HGF en una concentración inferior a 5 mg/mL, con un pH en el intervalo de 5 a 6,5, el cual está seleccionado dentro del grupo formado por arginina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico y una de sus sales farmacológicamente aceptable.
12. El uso de un agente estabilizante según la reivindicación 11, para prevenir la formación de cúmulos de HGF durante la liofilización y/o almacenamiento después de liofilización.
- 45 13. El uso de un agente estabilizante según la reivindicación 11, en una cantidad de 0,1 a 30 veces en peso con relación al peso de HGF.
- 50 14. El uso de un agente estabilizante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el agente está seleccionado dentro del grupo formado por arginina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico y una de sus sales farmacológicamente aceptable.
- 55 15. Un procedimiento para preparar una preparación liofilizada que comprende un factor de crecimiento de hepatocitos, sometiendo a liofilización una solución acuosa con un pH en el intervalo de 5,0 a 6,5 y que comprende un factor de crecimiento de hepatocitos, un agente estabilizante para prevenir la formación de un cúmulo del factor de crecimiento de hepatocitos, cloruro sódico y un agente tampón, **caracterizado** porque la solución acuosa comprende el factor de crecimiento de hepatocitos en una concentración inferior a 5 mg/mL.
- 60 16. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que el agente estabilizante está seleccionado dentro del grupo formado por arginina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico y una de sus sales farmacológicamente aceptable.
17. El procedimiento según la reivindicación 15 o 16, en el que el agente estabilizante está seleccionado dentro del grupo formado por arginina, lisina, histidina y una de sus sales farmacológicamente aceptable.



## ES 2 408 784 T3

18. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que el agente tampón es una sal del ácido fosfórico.
- 5 19. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que la solución acuosa contiene además un agente tensioactivo.
20. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que el agente tensioactivo es un agente tensioactivo no iónico.
- 10 21. El procedimiento según la reivindicación 20, en el que el agente tensioactivo no iónico es un agente tensioactivo a base de éter de polioxietileno.
22. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, que está preparado en un vial o una ampolla.
- 15 23. El procedimiento según las reivindicaciones 15 a 22, en el que la preparación comprende el agente estabilizante en una cantidad de 0,1 a 30 veces en peso con relación al peso de HGF.