

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 893**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2011 E 11717538 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2561070**

54 Título: **Nuevo agente estabilizante para proteínas farmacéuticas**

30 Prioridad:

20.04.2010 US 325975 P
20.04.2010 EP 10160470

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2015

73 Titular/es:

OCTAPHARMA AG (100.0%)
Seidenstrasse 2
8853 Lachen, CH

72 Inventor/es:

IVARSSON, ELSA;
KNUTSSON, JOSEFIN;
RIPPNER, BRITA;
NILSSON, ULRIKA y
AGERKVIST, IRÈNE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 545 893 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

Nuevo agente estabilizante para proteínas farmacéuticas

5 La invención se refiere a un procedimiento para estabilizar una proteína de sangre humana o una proteína plasmática con un peso molecular de > 10 kDa, una composición en estado sólido o líquido de proteína de sangre humana con un peso molecular de > 10 kDa y el uso de melezitosa para la estabilización de una proteína de sangre humana o una proteína plasmática de sangre humana.

10 La estabilización de proteínas terapéuticas es un estímulo principal para los científicos de formulaciones en la industria farmacéutica actual. Existen muchos tipos de tensiones que pueden producir cambios reversibles e irreversibles en las proteínas, tales como la agregación, precipitación o desnaturalización. Estas dificultades reclaman la necesidad de agentes que estabilicen estas delicadas proteínas. El desarrollo de formulaciones es una etapa crítica, que requiere una selección cuidadosa de excipientes que proporcionen un elevado rendimiento de la actividad de proteínas durante el procedimiento de purificación así como durante el procedimiento farmacéutico y como producto final. En particular, esto es cierto para las proteínas de la sangre humana y las proteínas plasmáticas de sangre humana.

15 Uno de los estabilizantes más ampliamente usados para las formulaciones de proteínas son los hidratos de carbono, denominados también sacáridos. Los hidratos se desarrollan a partir de componentes de hidratos de carbono básicos unidos denominados monosacáridos, y pueden ser de diferente longitud y pueden tener por tanto diferentes características.

20 Sacarosa y trehalosa, los dos estabilizantes más comúnmente usados, son ambos disacáridos, compuestos por tanto por dos monosacáridos.

25 En comparación con los dos estabilizantes de hidratos de carbono más comúnmente utilizados, sacarosa y trehalosa, que son disacáridos, melezitosa es un trisacárido. Se ha indicado generalmente [Wang W, Lyophilisation and development of solid protein pharmaceuticals, Int J Pharm 203, 1-60, 2000; Carpenter J.F., Chang B.S., Garzon-Rodriguez W., Randolph T.W., Rational design of stable lyophilized protein formulations: Theory and practice, capítulo 5, ed Carpenter and Manning, Kluwer Academic / Plenum Publishers, Nueva York, 2002] que los disacáridos son la primera elección para estabilizar proteínas, tanto en solución como en estado liofilizado. Algunos disacáridos, tales como lactosa o maltosa, son azúcares reductores que pueden degradar proteínas mediante la reacción de Maillard durante el almacenamiento en el estado sólido. Si se utilizan sacáridos más grandes como estabilizantes en preparaciones liofilizadas, la bibliografía sugiere que son menos eficaces debido al impedimento estérico de la interacción proteína-estabilizante [Carpenter J.F., Chang B.S., Garzon-Rodriguez W., Randolph T.W., Rational design of stable lyophilized protein formulations: Theory and practice, capítulo 5, ed Carpenter and Manning, Kluwer Academic / Plenum Publishers, Nueva York, 2002].

35 El artículo de revisión Wang, W., International Journal of Pharmaceutics, 203 (2000) 1 - 60, "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals", describe, entre otros, que maltosa, glucosa y maltotriosa podrían aumentar la recuperación de la actividad catalasa en $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, pero maltopentosa, maltohexosa, y maltoheptosa no fueron tan eficaces. La ineficacia de los sacáridos más grandes sugiere que la estabilización de la proteína por azúcares puede depender de la longitud de la cadena secundaria de glucósidos del azúcar que puede interferir con el enlace de hidrógeno intermolecular entre azúcares y proteínas estabilizantes. Este artículo de revisión recomienda disacáridos como estabilizantes (p.9/10).

40 El documento WO-A-2003/086443 describe el uso de hidratos de carbono que incluyen estaquiosa, melezitosa, y diversos monosacáridos y disacáridos para la preparación de preparaciones de polipéptidos administrables por vía intranasal. Los azúcares sirven como agentes para reducir los efectos de la tensión de cizalladura durante la pulverización.

45 El documento WO-A-86/04486 describe la purificación cromatográfica de, entre otros, el factor VIII en el que se usa melezitosa como aditivo de hidratación durante el procedimiento cromatográfico.

50 El documento WO-A-91/18091 describe un procedimiento de preservar sustancias biológicas o compuestos orgánicos delicados (a) en un estado seco y/o (b) a temperaturas elevadas y/o (c) bajo irradiación, que comprende incorporar a un sistema que contiene dichas sustancias o compuestos, un azúcar o un derivado de azúcar seleccionado entre (i) un glucósido no reductor de un compuesto polihidroxi seleccionado entre alcoholes azucarados y otros polialcoholes de cadena lineal, o (ii) un oligosacárido no reductor seleccionado entre rafinosa, estaquiosa y melezitosa.

Mollmann, S. H. y col informan en Drug Dev. Ind. Pharm. Julio de 2006; (6): 765-78 acerca de la estabilidad de la insulina en formulaciones sólidas que contienen melezitosa y almidón.

55 La presente invención proporciona un procedimiento para estabilizar una proteína de sangre humana con un peso molecular de > 10 kDa añadiendo melezitosa a una solución que comprende la proteína de sangre humana o la proteína plasmática de sangre humana con un peso molecular de > 10 kDa.

Preferentemente, la proteína de sangre humana o la proteína plasmática de sangre humana tienen un peso molecular de > 10 kDa. Más preferentemente, el peso molecular está en el intervalo de 10 kDa a 300 kDa. Lo más preferente, el peso molecular está en el intervalo de 20 kDa a 200 kDa. Puede ser ventajoso que la proteína de sangre humana o la proteína plasmática de sangre humana tengan un intervalo de pesos moleculares de 50 kDa a 100 kDa o un intervalo de pesos moleculares de 100 kDa a 150 kDa o un intervalo de pesos moleculares de 150 kDa a 200 kDa.

En particular, la proteína de sangre humana o la proteína plasmática de sangre humana con un peso molecular de > 10 kDa es una proteína farmacéutica o biológicamente relevante. La proteína de sangre humana o la proteína plasmática de sangre humana con un peso molecular de > 10 kDa farmacéutica o biológicamente relevante que se puede estabilizar de acuerdo con la invención pueden ser una proteína de sangre humana o una proteína plasmática de sangre humana producida de manera recombinante.

El término "proteína" incluye proteínas sintetizadas químicamente así como proteínas sintetizadas naturalmente que están codificadas por genes de células cultivadas así como proteínas recombinantes secretadas por células. Las proteínas recombinantes son aquellas que están codificadas por transgenes introducidos en las células mediante técnicas de biología molecular. Las proteínas pueden modificarse mediante procedimientos químicos o mediante enzimas en procedimientos posteriores a la traducción.

De acuerdo con la invención, "proteína" incluye proteínas de seres humanos, en particular, aquellas producidas mediante cultivos celulares, pero también proteínas de otras fuentes tales como plantas, insectos, etc., y proteínas mutadas, artificiales, sintéticas, de fusión o quiméricas.

El término "proteína de sangre humana o proteína plasmática de sangre humana con un peso molecular de > 10 kDa" incluye en particular factores de coagulación de sangre humana incluyendo fibrinógeno, monómero de fibrina, protrombina, trombina, FV, FVa, FX, FXa, FIX, FIXa, FVII, FVIIa, FVIII, FXI, FXIa, FXII, FXIIa, FXIII, FXIIIa, factor de von Willebrand, ADAMTS13 etc., proteínas de transporte tales como albúmina, transferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, hemoglobina, hemopexina, etc., inhibidores de la proteasa tales como β -antitrombina, α -antitrombina, α 2-macroglobulina, inhibidor-CI, inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), cofactor II de la heparina, inhibidor de la proteína C (PAI-3), Proteína C, Proteína S, Proteína Z, etc., inmunoglobulinas tales como anticuerpos policlonales (IgG), anticuerpos monoclonales, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgA1, IgA2, IgM, IgE, IgD, proteína de Bence Jones etc., proteínas plasmáticas relacionadas con células tales como fibronectina, tromboglobulina, factor 4 plaquetario, etc., apolipoproteínas tales como apo A-I, apo A-II, apo E, factores del complemento tales como Factor B, Factor D, Factor H, Factor I, inactivador de C3b, properdina, proteína de unión a C4 etc., factores de crecimiento de tipo factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor alfa de crecimiento transformante (TGF- α), factor beta de crecimiento transformante (TGF- β), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento de hepatocitos, proteínas antiangiogénicas tales como antitrombina latente y antitrombina prelatente, etc., proteínas muy glicosiladas incluyendo glucoproteína alfa-I-ácida, antitripsina, inhibidor inter- α -tripsina, glucoproteína α -2-HS, proteína C reactiva, y otras proteínas de la sangre humana o proteínas plasmáticas de la sangre humana con un peso molecular de > 10 kDa tales como glucoproteína rica en histidina, lectina de unión a manano, proteína de unión a C4, fibronectina, globulina-GC, plasminógeno, microglobulina oc-1, proteína C-reactiva, factores de la sangre tales como eritropoyetina, interferón, factores tumorales, tPA, gCSF y sus derivados y muteínas. De particular interés son el factor IX, factor VIII, G-CSF, vWF, antitrombina (AT), factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), IgG policlonal, antitripsina alfa-1, factor H, factor I, inhibidor de la esterasa CI, factor VII y sus combinaciones. Sin embargo, polipéptidos tales como insulina no están cubiertos por el término "proteína de sangre humana o proteína plasmática de sangre humana con un peso molecular de > 10 kDa" sencillamente porque la insulina tiene un peso molecular de aproximadamente 5.700 Da.

Los términos "proteína de sangre humana" y "proteína plasmática de sangre humana" incluyen derivados, especialmente moléculas que se han modificado para tener una semivida prolongada. Las modificaciones para prolongar la semivida incluyen, pero no se limitan a, proteínas modificadas mediante mutagénesis y proteínas unidas a un conjugado mediante enlace covalente o no covalente. De acuerdo con la invención, las proteínas plasmáticas de sangre humana o las proteínas de sangre humana pueden acoplarse covalentemente a moléculas de hidroxil etil almidón (HES), proporcionando en particular moléculas con un peso molecular de 20 a 200 kDa.

Cuando se hace referencia al peso molecular, este se refiere al peso molecular de los compuestos (es decir, incluyendo el peso molecular de cualquier compuesto químico acoplado covalentemente con la proteína).

La presente invención proporciona en concreto un procedimiento en el que la disolución se transfiere al estado sólido.

La presente invención se refiere al hallazgo de un nuevo agente estabilizante para una proteína de sangre humana o una proteína plasmática de sangre humana farmacéutica con peso molecular de > 10 kDa.

De forma sorprendente, se ha encontrado que se puede usar melezitosa como estabilizante para proteínas de sangre humana o proteínas plasmáticas de sangre humana con un peso molecular de > 10 kDa, tales como factor VIII (170 kDa), factor IX (55 kDa) y G-CSF HESilada (120 kDa). Se espera que las proteínas de sangre humana y las

5 proteínas plasmáticas de sangre humana de peso molecular similar tengan requisitos de estabilización similares. Por ejemplo, el factor IX es una proteína plasmática de sangre humana dependiente de la vitamina K y tiene similitudes bioquímicas con el resto de proteínas plasmáticas de sangre humana dependientes de la vitamina K. El dominio Gla es una característica estructural común en todas estas proteínas dependientes de la vitamina K e inmediatamente después del dominio Gla, cada una de las proteínas (excepto la protrombina) tiene uno o más dominios de tipo EGF. Las proteínas dependientes de la vitamina K requieren iones Ca^{2+} para expresar su función fisiológica y los sitios de unión al calcio implican al menos el dominio Gla y los dominios de tipo EGF. La unión al calcio permite a estas proteínas unirse a los fosfolípidos de las membranas celulares y de esta manera expresar sus actividades biológicas completas. Se sabe que siete proteínas plasmáticas de sangre humana dependen de la vitamina K para su biosíntesis. Son la protrombina (factor II, 72 kDa), factor VH/factor Vila (50/50 kDa), factor IX (55 kDa) o factor IXa, factor X (59 kDa) o factor Xa, proteína C (62 kDa), proteína S (69 kDa) y proteína Z (62 kDa).

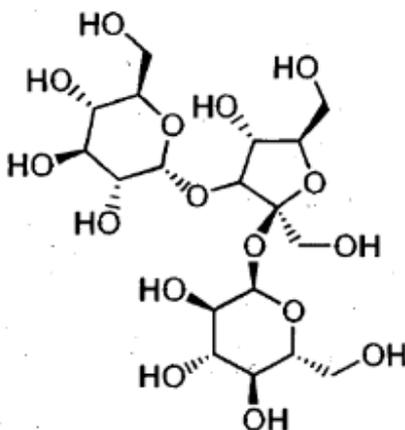
De manera sorprendente, se ha descubierto que las proteínas de sangre humana y las proteínas plasmáticas de sangre humana que se unen covalentemente con una molécula de hidroxietil almidón (HES) con un peso molecular en el intervalo de 20-200kDa son adecuadas para la estabilización con melizitosa.

15 Melezitosa ha mostrado una excelente capacidad para mantener la actividad de la proteína en formulaciones liofilizadas y en solución.

De acuerdo con la invención, la etapa de transferir la solución al estado sólido es la liofilización tras la adición de melezitosa. Se puede usar también melezitosa en combinación con otros azúcares, tales como trehalosa, o sacarosa. Melezitosa, deletreada también melicitosa, es un azúcar trisacárido no reductor que está producido por muchos insectos que se alimentan de la savia de las plantas, incluyendo áfidos, tales como *Cinara pilicornis* mediante una reacción enzimática. El nombre IUPAC es (2R,3R,4S,5S,6R)-2-[[[(2S,3S,4R,5R)-4-hidroxi-2,5-bis(hidroximetil)-3-[[[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroxil-metil)-2-tetrahidropirani]oxi]-2-tetrahidrofuranil]oxi]-6-(hidroxil-metil)-tetrahidropiran-3,4,5-triol.

Melezitosa tiene un peso molecular de 504,44 g/mol.

25 La estructura respectiva está representada por la fórmula:



Normalmente, la melezitosa está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 1000 mM. El límite inferior depende de la cantidad de melezitosa que da como resultado un efecto estabilizante suficiente sobre la proteína de interés. La persona experta puede determinar fácilmente la cantidad adecuada empleando la metodología de los ejemplos y su conocimiento general. Un intervalo factible es, por ejemplo, de 10 mM a aproximadamente 200 mM o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM en relación a la formulación final.

Preferentemente, la cantidad es más grande que 20 mM o más grande que 30 mM.

Preferentemente, la cantidad de melezitosa por cantidad de proteína de sangre humana o proteína plasmática de sangre humana está en el intervalo de 10:1 a 5000:1, preferentemente en el intervalo de 50:1 a 150:1, o 1000:1 a 3000:1 calculado en función del peso, es decir, la cantidad de melezitosa es mayor que la cantidad de proteína.

En una realización preferida, se incluyen 10 a 100 mg de melizitosa en una dosificación farmacéutica de una proteína.

El sujeto de la presente invención es una composición que comprende una proteína de sangre humana o una proteína plasmática de sangre humana con un peso molecular de > 10 kDa y melezitosa. La composición puede estar presente en el estado líquido o sólido.

En una realización de la invención, la composición de la invención comprende además un agente de volumen, un agente tensioactivo, un agente tamponante, un estabilizante adicional y/o un modificador de la tonicidad.

5 Un tensioactivo de acuerdo con la invención es un compuesto que adsorbe superficies y crea interfases y por tanto contrarresta la pérdida de actividad de una proteína debida a la adsorción. Este tipo de pérdida de actividad puede producirse durante el procesamiento farmacéutico completo así como durante la manipulación del producto reconstituido antes y durante su administración a un paciente. Los tensioactivos usados comúnmente son Polysorbate 80, Polysorbate 20 y poloxámeros, en particular Poloxamer 188. También se pueden usar proteínas tales como albúmina, en particular albúmina recombinante como agente tensioactivo. También se puede usar albúmina recombinante de acuerdo con una realización de la invención.

10 Un agente tamponante del pH se refiere a un compuesto con una capacidad tamponante en el intervalo de pH óptimo de la proteína que se va a formular. La presente invención, cuando resulta adecuado, abarca citrato de sodio, ácido maleico, histidina, ácido 2-(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil)-etanosulfónico (HEPES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), o Tris (tris(hidroximetil)aminometano) como agente tamponante del pH. El agente tamponante está presente en una cantidad adecuada para mantener el pH en un intervalo en el que la proteína permanece funcional. Esto difiere de una proteína a otra. La persona experta conoce aproximadamente los intervalos preferidos de la proteína respectiva, en particular de las proteínas de sangre humana o de las proteínas plasmáticas de sangre humana con un peso molecular de > 10 kDa. Como ejemplo, el citrato de sodio mantiene el pH comprendido entre 6,5 y 7,5. Una forma adecuada del citrato de sodio es la forma dihidratada. Generalmente, las composiciones de acuerdo con la invención pueden estar en forma liofilizada, pero están también representadas por soluciones tales como una solución que se va a liofilizar y una solución reconstituida a partir de una composición liofilizada.

25 Un modificador de la tonicidad se refiere a un compuesto que está presente en la formulación para equilibrar la tonicidad. La presente invención, cuando es adecuado, abarca cloruro de sodio, arginina, glicina, cloruro de potasio, azúcares o alcoholes azucarados como modificadores de la tonicidad.

Aunque melezitosa presenta propiedades crioprotectoras y lioprotectoras, pueden estar también presentes propiedades crioprotectoras y lioprotectoras adicionales (crio/lioprotectoras) Se trata de un compuesto presente en la formulación para disminuir o prevenir adicionalmente la pérdida de la actividad de la proteína durante las etapas de congelación y secado de un procedimiento de liofilización y durante el posterior almacenamiento del producto liofilizado. La presente invención, cuando sea adecuado, abarca disacáridos no reductores tales como sacarosa y trehalosa, y disacáridos reductores, tales como maltosa y lactosa como crioprotectores/lioprotectores adicionales.

35 Un agente de volumen se refiere a un excipiente presente en la formulación para proporcionar soporte mecánico a la torta liofilizada y para aumentar el peso seco. El agente de volumen puede estar tanto en estado cristalino, como el cloruro de sodio, o bien en estado amorfo, como la arginina. La cantidad del agente de volumen puede ser de hasta un 10% en peso basado en la formulación final. La presente invención, cuando sea adecuado, abarca cloruro de sodio, glicina, manitol, sacarosa o arginina como agente de volumen.

Un sujeto adicional de la presente invención es el uso de melezitosa para estabilización a largo plazo de una proteína en el estado seco tal como formulaciones liofilizadas durante al menos 6 meses, en particular al menos 12 meses, de forma más particular al menos 18 meses, de forma aún más particular 24 meses.

40 La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

Análisis de actividad - Factor VIII

Se midió la actividad del factor VIII con un ensayo cromogénico o con el ensayo en una etapa y la unidad del factor VIII se expresó en unidades internacionales (UI).

45 **El ensayo cromogénico** es el procedimiento prescrito en la Farmacopea Europea. El procedimiento es un procedimiento fotométrico en dos etapas que mide la actividad biológica del factor VIII como cofactor. El factor VIII activa el factor X al factor Xa, que a su vez se escinde enzimáticamente en un producto que se puede cuantificar espectrofotométricamente.

50 **El ensayo de coagulación** en una etapa se basa en la capacidad de una muestra que contiene factor VIII para corregir el tiempo de coagulación de un plasma deficiente en factor VIII en presencia de un fosfolípido, un activador de contacto e iones calcio. El tiempo de aparición de un coágulo de fibrina se mide en una etapa.

Análisis de actividad - Factor IX

Se midió la actividad biológica del factor IX con un ensayo de coagulación en una etapa y/o un ensayo cromogénico y la unidad del factor IX se expresó en Unidades Internacionales (UI) como ha definido actualmente la OMS para el patrón de factor IX concentrado.

El ensayo de coagulación en una etapa es el procedimiento prescrito en la Farmacopea Europea. El principio del ensayo se basa en la capacidad de una muestra que contiene factor IX para corregir el tiempo de coagulación de un plasma deficiente en factor IX en presencia de fosfolípidos, activador de contacto e iones de calcio. El tiempo de aparición de un coágulo de fibrina se mide en una etapa. La actividad del factor IX es inversamente proporcional al tiempo de coagulación.

El ensayo cromogénico es un procedimiento fotométrico en dos etapas. En la primera etapa, el factor IX se activa a factor IXa mediante el factor activado XI (XIa) en presencia de trombina, fosfolípidos y calcio. El factor IXa forma un complejo enzimático con el factor VIII activado por trombina (VIIIa) que en presencia de fosfolípidos y calcio activa el factor X a factor Xa. En la etapa dos, el factor Xa hidroliza un sustrato cromógeno específico del factor Xa liberando de esta manera un grupo cromóforo pNA que puede cuantificarse espectrofotométricamente. La actividad del factor IX es directamente proporcional a la cantidad de factor Xa generado.

Análisis - G-CSF HESilada recombinante

Análisis de HPLC de HES-G-CSF en columna Resource S

Las muestras se diluyeron hasta 0,1 mg/ml con eluyente A. Se inyectaron 20 pg en una columna Resource S de 1 ml (GE Healthcare, Múnich, Alemania).

Eluyente A: Acetato de Na 20 mM pH 4,0

Eluyente B: Acetato de Na 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 4,0

Caudal: 1 ml/min

Gradiente: 0% - 8% 1,8 - 2,0 min

8% - 52% 2,0 - 13,0 min

52% - 100% 13,0 - 13,6 min

La anchura del pico del pico de HES-G-CSF se toma como un criterio de calidad ya que se ha demostrado que HES-G-CSF tiene una anchura de pico más grande. La ganancia de anchura del pico se define como la diferencia de la anchura del pico de HES-G-CSF antes y después de la tensión térmica o de cizalladura.

Ejemplos

Factor VIII recombinante

El factor VIII utilizado en los experimentos es una proteína del factor VIII con el dominio B humano eliminado, producida en la línea celular humana HEK293F de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento EP-A-1 739 179 (Schroder y col). El procedimiento de purificación consistió en cinco etapas de cromatografía y generó una preparación de proteínas del factor VIII muy pura (Winge y col, documento WO-A-2009/156430) con un modelo humano de tipo de glicosilación (Sandberg y col, PCT/EP2009/060829).

Factor IX derivado de plasma

El material usado en este experimento procede del producto Nanotiv®, comercialmente disponible, que es un concentrado de factor IX tratado y nanofiltrado de una pureza SD elevada. Antes de usarlo en estos experimentos, el material se purificó adicionalmente en una columna de filtración en gel en la que se usó el pico del monómero del factor IX en experimentos adicionales.

G-CSF HESilada recombinante

La línea celular usada es un derivado de células 293 de riñón embrionario humano (HEK 293) que se adaptó al crecimiento exento de suero. Este hospedador, HEK 293F, se transfirió de manera estable con un casete de expresión que transportaba el ADNc que codificaba la secuencia de G-CSF. Se usó el promotor fuerte para el casete. Se describe también el procedimiento general en el documento EP 1739179 (Schroder y col).

El procedimiento de purificación consistió en cuatro etapas de cromatografía y generó una preparación de proteínas G-CSF muy pura. La proteína G-CSF se acopló a un derivado de hidroxietil almidón (HES) de un peso molecular de aproximadamente 100 kDa. Finalmente, se purificó HES-G-CSF a partir de un derivado de HES sin reaccionar y G-CSF mediante una etapa de cromatografía, dando como resultado una molécula con un peso molecular total de aproximadamente 120 kDa.

Ejemplo 1: Estabilización de rFVIII con melezitosa en solución

Preparación

El factor recombinante VIII (rFVIII) se preparó de acuerdo con la descripción de la sección experimental anterior. Este experimento comparó el efecto estabilizante de melezitosa para el FVIII en solución, con el producido por el estabilizante trehalosa comúnmente utilizado. La concentración de rFVIII era de 100 UI/ml. En la Tabla 1 se presentan las composiciones de las formulaciones investigadas en este experimento.

5 Tabla 1. Composiciones de la formulación.

	1A	1B
Melezitosa, mM	-	48
Trehalosa dihidrato, mM	63	-
NaCl, mg/ml	30	30
Cloruro cálcico dihidratado, mg/ml	0,5	0,5
Poloxámero 188, mg/ml	2	2
Histidina, mg/ml	3	3

Las formulaciones se almacenaron durante hasta 7 días a +25°C para evaluar la actividad de la proteína con el tiempo. Se tomaron muestras a intervalos regulares y se analizaron con el ensayo cromogénico, como se describe en la sección experimental anterior. Los resultados se resumen en la Tabla 2 como porcentaje del valor inicial.

10 Tabla 2. Resultados.

		Actividad del factor VIII con el tiempo (días), (% del valor inicial)		
		0	1	7
1A	+ 25°C	100	86	85
1B	+ 25°C	100	82	86

Conclusiones del Ejemplo 1: Este experimento muestra que, sorprendentemente, la melezitosa, a pesar de su menor concentración molar, tiene un efecto estabilizante sobre rFVIII en solución igual al de la trehalosa.

Ejemplo 2: Estabilización de rFVIII mediante melezitosa en forma liofilizada

15 **Preparación**

El factor recombinante VIII (rFVIII) se preparó de acuerdo con la descripción de la sección experimental anterior. Este experimento comparó el efecto estabilizante de melezitosa con el del estabilizante trehalosa comúnmente utilizado, durante el procedimiento de criodesecación y en las formulaciones liofilizadas. La concentración de rFVIII era de 100 UI/ml. En la Tabla 3 se presentan las composiciones de las formulaciones investigadas en este experimento.

20

Tabla 3. Composiciones de las formulaciones.

	2A	2B
Trehalosa, mM	63	-
Melezitosa, mM	-	48
NaCl, mg/ml	30	30
Cloruro cálcico dihidratado, mg/ml	0,5	0,5
Poloxámero 188, mg/ml	2	2
Histidina, mg/ml	3	3

Se liofilizaron alícuotas de 1,5 ml de las soluciones en un desecador a escala de laboratorio. La recuperación de la proteína durante la etapa de liofilización fue del 93% para la formulación 2B y del 86% para la formulación 2A. Las muestras liofilizadas se almacenaron durante hasta 4 semanas a +25°C y +40°C para evaluar la actividad de la proteína en el tiempo. Las muestras se reconstituyeron en 1,5 ml de agua para inyecciones y se analizaron con el ensayo cromogénico, descrito en la sección experimental anterior. En la Tabla 4 se resumen los resultados.

25

Tabla 4. Resultados		Actividad del factor VIII con el tiempo (semanas), (% del valor inicial)			
		0	1	2	4
2A	+ 25°C	100	97	89	*
	+40°C	100	98	90	93
2B	+ 25°C	100	117	95	*
	+40°C	100	104	97	99

*sin cambio significativo

Conclusiones del Ejemplo 2: De forma sorprendente, este experimento muestra que melezitosa es capaz de proteger el rFVIII en una concentración molar más baja que trehalosa durante la etapa de liofilización, y que esta estabiliza rFVIII mejor que trehalosa durante el almacenamiento.

5 **Ejemplo 3:** Estabilización de rFVIII mediante melezitosa en forma liofilizada

Preparación

10 El factor recombinante VIII (rFVIII) se preparó de acuerdo con la descripción de la sección experimental anterior. Este experimento comparó el efecto estabilizante de melezitosa a diferentes concentraciones durante el procedimiento de criodesecación y en formulaciones liofilizadas, y comparó también el efecto estabilizante con el del tetrasacárido estaquiosa. La concentración de rFVIII era de 170 UI/ml. En la Tabla 5 se presentan las composiciones de las formulaciones investigadas en este experimento.

Tabla 5. Composiciones de las formulaciones.

	3A	3B	3C	3D
Melezitosa, mM	48	36	24	-
Estaquiosa, mM	-	-	-	30
NaCl, mg/ml	30	30	30	30
Cloruro cálcico dihidratado mg/ml,	0,5	0,5	0,5	0,5
Poloxámero 188, mg/ml	2	2	2	2
Citrato sódico, mg/ml	2	2	2	2

15 Se liofilizaron alícuotas de 1,5 ml de las soluciones en un desecador a escala de laboratorio. La recuperación de la proteína durante la etapa de liofilización fue de 91 a 100% para las formulaciones que contenían melezitosa, mientras que la recuperación fue del 84% para la formulación 3D que contenía estaquiosa como estabilizante. Las muestras liofilizadas se almacenaron durante hasta 12 meses a +25°C y +40°C para evaluar la actividad de la proteína con el tiempo.

20 Las muestras se reconstituyeron en 1,5 ml de agua para inyecciones y se analizaron con el ensayo cromogénico, descrito en la sección experimental anterior. En la Tabla 6 se muestran los resultados.

Tabla 6. Resultados.

		Actividad del factor VIII con el tiempo (semanas), (% del valor inicial)					
		0	1	2	3	6	12
3A	+ 25°C	100	*	n.a.	*	*	91
	+40°C	100	96	93	93	n.a.	n.a.
3B	+ 25°C	100	92	n.a.	96	95	78
	+40°C	100	90	79	73	n.a.	n.a.
3C	+ 25°C	100	91	n.a.	86	86	67
	+40°C	100	70	58	48	n.a.	n.a.
3D	+ 25°C	100	95	n.a.	79	65	n.a.
	+40°C	100	74	n.a.	51	n.a.	n.a.

n.a. = sin analizar; * sin cambio significativo

25 **Conclusiones del Ejemplo 3:** Este experimento muestra que melezitosa funciona excepcionalmente bien como estabilizante para rFVIII durante la etapa de liofilización y en forma liofilizada. También, este muestra que estaquiosa no es un estabilizante preferible para formulaciones liofilizadas, ya que muestra resultados muy insatisfactorios durante el almacenamiento a 25°C y a 40°C en comparación con las formulaciones que contienen melezitosa.

Ejemplo 4: Estabilización del factor IX plasmático mediante melezitosa en una preparación en forma liofilizada

30 El factor IX derivado de plasma (pFIX) se preparó de acuerdo con la descripción de la sección experimental anterior. Este experimento investiga el efecto estabilizante de melezitosa sobre pFIX. La concentración de pFIX era de 100 UI/ml. En la Tabla 7 se presentó la composición de la formulación investigada en este experimento.

Tabla 7. Composición de la formulación.

		4A
Melezitosa, mM		42
NaCl, mg/ml		30
Polisorbato 80, mg/ml		0,1
Citrato sódico, mg/ml		2,35

- 5 Se liofilizaron alícuotas de 1,5 ml de las soluciones en un desecador a escala de laboratorio. Las muestras liofilizadas se almacenaron durante hasta 6 meses a +5°C, +25°C y +40°C para evaluar la actividad de la proteína en el tiempo. Las muestras se reconstituyeron en 1,5 ml de agua para inyecciones y se analizaron con el ensayo cromogénico, descrito en la sección experimental anterior.

Resultados

La recuperación de la proteína durante la etapa de liofilización fue de aproximadamente un 100%. En la Tabla 8 se muestran los resultados de estos estudios.

- 10 Tabla 8. Resultados.

		Actividad del factor IX con el tiempo (meses), (% del valor inicial)			
		0	1	3	6
4A	5°C	100	88	87	85
	25°C	100	94	89	86
	40°C	100	93	92	n.a.

n.a. = sin analizar; * sin cambio significativo

Conclusiones del Ejemplo 4: Este experimento muestra que, de forma sorprendente, melezitosa funciona bien como un estabilizante del factor IX en forma liofilizada.

Ejemplo 5: estabilización de G-CSF HESilada recombinante mediante melezitosa en forma liofilizada.

- 15 **Preparación**

El G-CSF HESilado recombinante (rHES-G-CSF) se preparó de acuerdo con la descripción en la sección experimental anterior. El experimento comparó el efecto estabilizante de melezitosa sobre rHES-G-CSF en forma liofilizada, con el del estabilizante trehalosa comúnmente utilizado. En la Tabla 9 se presentan la concentración de rHES-G-CSF era de 0,3 mg/ml y las composiciones de las formulaciones investigadas.

- 20 Tabla 9. Composiciones de la formulación.

		5A	5B
Melezitosa, mM		70	-
Trehalosa, mM		-	70
NaCl, mg/ml		30	30
Polisorbato 80, mg/ml		0,2	0,2
Histidina, mg/ml		3	3

Se liofilizaron alícuotas de 1,5 ml en un desecador a escala de laboratorio. Se midió la recuperación de la proteína tras 4 semanas de almacenamiento a +40°C mediante el procedimiento Resource S, descrito en la sección experimental anterior. En la Tabla 10 se muestran los resultados.

- 25 Tabla 10. Resultados.

		Ganancia de anchura del pico (min) tras 4 semanas
5A	+40°C	0,04
5B	+40°C	0,06

Conclusiones del Ejemplo 5: Este experimento muestra que melezitosa tiene un efecto estabilizante sobre rHES-G-CSF mejor que el del estabilizante trehalosa comúnmente utilizado a una concentración molar igual.

Ejemplo 6: Estabilización del factor IX plasmático mediante melezitosa durante la etapa de criodesecación

- 30 **Preparación**

El factor IX derivado de plasma (pFIX) se preparó de acuerdo con la descripción de la sección experimental anterior. Este experimento investiga el efecto estabilizante de melezitosa sobre pFIX durante la etapa de criodesecación en comparación con el tetrasacárido estaquiosa. La concentración de pFIX era de 100 UI/ml. En la Tabla 11 se presentan las composiciones de las formulaciones investigadas en este experimento.

5 Tabla 11. Composiciones de las formulaciones.

	6A	6B
Melezitosa, mM	42	-
Estaquiosa, mM	-	30
NaCl, mg/ml	30	30
Polisorbato 80, mg/ml	0,1	0,1
Citrato sódico, mg/ml	2,35	2,35

Se liofilizaron alícuotas de 1,5 ml de las soluciones en un desecador a escala de laboratorio. Se analizaron las muestras con el ensayo cromogénico, descrito en la sección experimental anterior, antes y después de la etapa de liofilización.

10 **Resultados**

La recuperación de la proteína durante la etapa de liofilización fue aproximadamente del 100% mientras que la recuperación correspondiente para la formulación 6B fue del 84%.

Conclusiones del Ejemplo 6: Este experimento muestra que melezitosa funciona bien como estabilizante del factor IX durante la etapa de liofilización. Sin embargo, estaquiosa no es un candidato adecuado como estabilizante debido a que se produce una pérdida de actividad significativa durante la etapa de criodesecación.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para estabilizar una proteína de plasma de sangre humana con un peso molecular > 10 kDa al añadir melezitosa a una solución que comprende la proteína de plasma de sangre humana con un peso molecular > 10 kDa que es una proteína de plasma de sangre humana farmacéutica o biológicamente relevante o una proteína de plasma de sangre humana producida de manera recombinante seleccionada entre el grupo que consiste en FIX, FVIII o HES-G-CSF.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la solución se transfiere al estado sólido opcionalmente mediante liofilización.
- 10 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en el que melezitosa está presente en una cantidad de hasta 1.000 mM, particularmente de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, en particular de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que está presente al menos un agente tensioactivo, tal como albúmina recombinante, Polysorbate 80, Polysorbate 20 o poloxámeros, en particular Poloxamer 188.
- 15 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que al menos un agente tamponante está presente tal como histidina, citrato de sodio, HEPES, Tris, MOPS o PIPES.
- 20 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que está presente al menos un estabilizador adicional tal como azúcares, aminoácidos, polioles, cofactores o sus combinaciones y/o en el que está presente al menos un modificador de la tonicidad, tal como cloruro de sodio, arginina, glicina, cloruro de potasio, azúcares o alcoholes de azúcar y/o en el que está presente al menos un agente de volumen, tal como glicina, manitol, cloruro de sodio, arginina o sacarosa.
7. Una composición que comprende una proteína de plasma de sangre humana con un peso molecular > 10 kDa y melezitosa, y en el que la proteína es factor VIII, factor IX o HES-G-CSF.
8. La composición de la reivindicación 7 en estado líquido o sólido.
- 25 9. La composición de la reivindicación 7 u 8 que comprende adicionalmente un agente de volumen, un tensioactivo, un agente tamponante, un estabilizante adicional y/o un modificador de la tonicidad.
- 30 10. Uso de melezitosa para la estabilización de una proteína de plasma de sangre humana con un peso molecular > 10 kDa y en el que la proteína es factor VIII, factor IX o HES-G-CSF, en particular en la estabilización durante el procesamiento, en un procedimiento de liofilización, en solución, durante la purificación, y en la producción particular en un cultivo celular; o para la estabilización a largo plazo en particular para mejorar la vida útil, en el que el largo plazo son al menos 6 meses, en particular al menos 12 meses, más en particular al menos 18 meses, más particularmente 24 meses o 36 meses.