

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 641**

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 15164262 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2947148**

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:  
**27.10.2017**

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 2 639 641 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

La invención se refiere a un procedimiento para estabilizar un factor de coagulación sanguíneo humano seleccionado de FVII, FVIIa, derivados y muteínas de los mismos, a una composición en estado sólido o líquido que comprende dicho factor de coagulación sanguíneo humano y al uso de melecitosa para la estabilización de dicho factor de coagulación sanguíneo humano.

La estabilización de proteínas terapéuticas es un reto importante para los científicos de la formulación en la industria farmacéutica hoy en día. Hay muchas clases de tensiones que pueden producir cambios en las proteínas tanto reversibles como irreversibles, tales como agregación, precipitación o desnaturalización. Estas dificultades requieren agentes que estabilicen esas proteínas delicadas. El desarrollo de la formulación es una etapa crítica, que requiere la selección cuidadosa de excipientes para proporcionar un alto rendimiento de la actividad de la proteína durante el procedimiento de purificación, así como durante el procedimiento farmacéutico y como producto final. En particular, esto es verdad para proteínas de la sangre humana y proteínas del plasma humano.

Uno de los estabilizantes más ampliamente usados para las formulaciones de proteínas son los hidratos de carbonos, también llamados sacáridos. Los hidratos de carbono están compuestos de componentes unidos de hidratos de carbono básicos llamados monosacáridos, y pueden ser de diferente longitud y por lo tanto tener diferentes características.

La sacarosa y la trehalosa, los dos estabilizantes más habitualmente usados, son ambos disacáridos, por lo tanto, compuestos de dos monosacáridos.

Comparado con dos de los estabilizantes hidratos de carbono más habitualmente usados, la sacarosa y trehalosa, que son disacáridos, la melecitosa es un trisacárido. En general, se indica [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, chapter 5, ed Carpenter y Manning, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2002] que los disacáridos son la primera elección para la estabilización de proteínas tanto en disolución como en estado liofilizado. Algunos disacáridos, tales como la lactosa o maltosa, son azúcares reductores que pueden degradar proteínas por la reacción de Malliard durante el almacenamiento en estado sólido. Si se usan sacáridos más grandes como estabilizantes en preparaciones liofilizadas, en la bibliografía se sugiere que estos 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, chapter 5, ed Carpenter and Manning, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2002].

El artículo de revisión de Wang, W., *International Journal of Pharmaceutics*, 203 (2000) 1 - 60, "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals", describe, entre otras cosas, que la maltosa, glucosa y malotriosa podrían aumentar la recuperación de la actividad catalítica con  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , pero la maltopentosa, maltohexosa y maltoheptosa no eran tan eficaces. La ineficacia de sacáridos mayores sugiere que la estabilización de la proteína por azúcares puede depender de la longitud de la cadena lateral de glucósido del azúcar, que puede interferir con formación de enlace de hidrógeno intermolecular entre azúcares estabilizantes y proteínas. Este artículo de revisión recomienda los disacáridos como estabilizantes (p. 9/10).

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

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

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

Mollmann, S. H. et al. en *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2006 Jul; (6):765-78, informan sobre la estabilidad de la insulina en formulaciones sólidas que contienen melecitosa y almidón.

La presente invención proporciona un procedimiento para estabilizar un factor de coagulación sanguíneo humano seleccionado de FVII, FVIIa, derivados y muteínas de los mismos, por la adición de melecitosa a una solución que comprende el factor de coagulación sanguíneo humano.

El factor de coagulación sanguíneo humano es una proteína que se puede producir de modo recombinante u

obtener del plasma de sangre humana.

5 El término "proteína" incluye proteínas químicamente sintetizadas, así como proteínas sintetizadas de forma natural que son codificadas por genes de células cultivadas, así como proteínas recombinantes secretadas por células. Las proteínas recombinantes son aquellas que son codificadas por transgenes introducidos en las células por técnicas de biología molecular. Las proteínas se pueden modificar por procedimientos químicos o por enzimas en procesos postraduccionales.

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

10 Las expresiones "factor de coagulación sanguíneo humano FVII" y "FVIIa", incluyen derivados, en especial moléculas que se han modificado para tener una semivida prolongada. Las modificaciones para la prolongación de la semivida incluyen, pero no se limitan a proteínas de fusión, proteínas modificadas por mutagénesis, y proteínas unidas a un conjugado por enlace covalente o no covalente. De acuerdo con la invención, los factores de coagulación sanguíneos humanos FVII y FVIIa se pueden acoplar covalentemente a moléculas de hidroxietil-almidón (HES), proporcionando en particular moléculas con un peso molecular de 20 a 200 kDa.

15 Donde 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 particular un procedimiento en el que la solución se transfiere en un estado sólido.

20 Esta invención se refiere al descubrimiento de un nuevo agente estabilizante para un factor de coagulación sanguíneo humano farmacéutico, seleccionado de FVII, FVIIa, derivados y muteínas de los mismos.

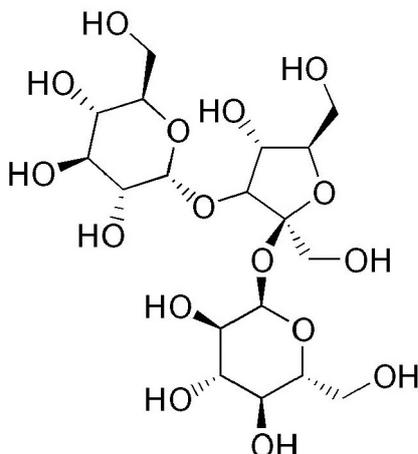
Sorprendentemente, se ha encontrado que la melecitosa se puede usar como un estabilizante para factores de coagulación sanguíneos humanos, tales como el factor VIII recombinante (170 kDa) y factor IX (55 kDa). Se espera que los factores de coagulación sanguíneos humanos de peso molecular similar tengan requisitos de estabilización similares. Por ejemplo, el factor IX es una proteína plasmática humana de la sangre dependiente de la vitamina K y tiene similitudes bioquímicas con todas las demás proteínas plasmáticas humanas de la sangre dependientes de la vitamina K. El dominio Gla es una característica estructural común en todas estas proteínas dependientes de vitamina K e inmediatamente después del dominio Gla, cada una de las proteínas (excepto la protrombina), tiene uno o más dominios similares a EGF. Las proteínas dependientes de la vitamina K requieren iones  $Ca^{2+}$  para expresar su función fisiológica y los sitios de unión del calcio implican al menos el dominio Gla y los dominios similares a EGF. La unión del calcio permite que estas proteínas se unan a fosfolípidos/membranas celulares y por lo tanto expresen sus actividades biológicas completas. Se conocen siete proteínas plasmáticas de la sangre humana que dependen de la vitamina K para sus biosíntesis. Son la protrombina (factor II, 72 kDa), factor VII/factor VIIa (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).

35 La melecitosa ha mostrado una excelente capacidad para mantener la actividad de proteínas tanto en formulaciones liofilizadas como en solución.

40 De acuerdo con la invención, la etapa de transferir la solución al estado sólido es la liofilización tras la adición de la melecitosa. La melecitosa también se puede usar en combinación con otros azúcares, tales como trehalosa o sacarosa. La melecitosa también llamada melicitosa, es un trisacárido no reductor que es producido por muchos insectos que comen savia de plantas, que incluyen áfidos tales como *Cinara pilicornis*, por 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.

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

45 La respectiva estructura se representa por la fórmula



Típicamente la melecitosa está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 1000 mM. El límite inferior depende de la cantidad de melecitosa que produzca un efecto estabilizante suficiente en la proteína de interés. La cantidad adecuada la puede determinar fácilmente el experto en la materia usando la metodología de los ejemplos y su conocimiento general. Un intervalo factible es, por ejemplo, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM con respecto a la formulación final.

Preferiblemente, la cantidad es mayor de 20 mM o mayor de 30 mM.

Preferiblemente, la cantidad de melecitosa por cantidad de factor de coagulación sanguíneo humano está en el intervalo de 10:1 a 5000:1, preferiblemente en el intervalo de 50:1 a 150:1, o de 1000:1 a 3000:1 calculado en peso por peso, es decir, la cantidad de melecitosa es mayor que la cantidad de la proteína.

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

El objeto de la presente invención es además una composición que comprende un factor de coagulación sanguíneo humano seleccionado de FVII o FVIIa, derivados o muteínas de los mismos y melecitosa. La composición puede estar presente en estado líquido o sólido.

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

Un tensioactivo de acuerdo con la invención es un compuesto que se adsorbe a superficies e interfaces y así contrarresta la pérdida de actividad de una proteína debido a la adsorción. Este tipo de pérdida de actividad se puede producir durante todo el proceso farmacéutico, así como mientras se manipula el producto reconstituido antes de y durante la administración a un paciente. Los tensioactivos habitualmente usados son polisorbato 80, polisorbato 20 y poloxámeros, en particular poloxámero 188. También se pueden usar proteínas tales como albúmina, en particular albúmina recombinante como un agente tensioactivo. También se puede usar albúmina recombinante de acuerdo con una realización de la invención.

Un agente de tamponamiento del pH se refiere a un compuesto con una capacidad de tamponamiento en el intervalo de pH óptimo de la proteína que se va a formular. La presente invención, cuando es adecuado, incorpora citrato sódico, 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), piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), o Tris(tris(hidroximetil)aminometano) como un agente de tamponamiento del pH. El agente de tamponamiento está presente en una cantidad para mantener un pH en el intervalo en el que la proteína permanece funcional. Este es diferente de una proteína a otra. El experto en la materia conoce los intervalos preferidos de la proteína respectiva, en particular de los factores de coagulación sanguíneos humanos. Como un ejemplo, el citrato sódico mantiene el pH en el intervalo de 6,5 a 7,5. Una forma adecuada de citrato sódico es la forma de dihidrato. En general, las composiciones de acuerdo con la invención pueden estar en forma liofilizada, pero se representan también por soluciones tales como una solución que se va a liofilizar y una solución reconstituida a partir de la composición liofilizada.

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, incorpora cloruro sódico, arginina, glicina, cloruro potásico, azúcares o alcoholes de azúcares como modificadores de la tonicidad.

Aunque la melecitosa presenta propiedades crio- y lioprotectoras, también pueden estar presentes un crio- y lioprotectores adicionales (crio/lioprotector). Este es un compuesto presente en la formulación para disminuir más o prevenir la pérdida de 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 es adecuado, incorpora disacáridos no reductores tales como sacarosa y trehalosa, y disacáridos reductores, tales como maltosa y lactosa, como criol/lioprotectores adicionales.

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

10 Un objeto adicional de la presente invención es el uso de melecitosa para la estabilización de un factor de coagulación sanguíneo humano seleccionado de FVII, FVIIa, derivados y muteínas de los mismos, en particular en una estabilización durante el procedimiento, en un procedimiento de liofilización, en solución, durante la purificación y producción, en particular en cultivo celular; o para la estabilización a largo plazo en particular para mejorar la vida en anaquel, en donde el largo plazo es al menos 6 meses, en particular al menos 12 meses, más en particular al menos 18 meses, todavía más en particular 24 meses o 36 meses. La invención se describe además en los  
15 siguientes ejemplos no limitantes.

#### Análisis de actividad - Factor VIII

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

20 El ensayo cromogénico es el procedimiento prescrito en la Farmacopea Europea. El procedimiento es un procedimiento fotométrico de dos etapas que mide la actividad biológica del factor VIII como un cofactor. El factor VIII activa el factor X en factor Xa, que a su vez es escindido enzimáticamente en un producto que se puede cuantificar por espectrofotometría.

25 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 fosfolípidos, activador de contacto e iones calcio. El tiempo de aparición de un coagulo de fibrina se mide en una etapa.

#### Análisis de actividad - Factor IX

La actividad del factor IX se midió 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 se define para el estándar actual de la OMS de concentrados de factor IX.

30 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 calcio. El tiempo de aparición de un coagulo de fibrina se mide en una etapa. La actividad del factor IX es inversamente proporcional al tiempo de coagulación.

35 El ensayo cromogénico es un procedimiento fotométrico de dos etapas. En la primera etapa, el factor IX es activado a factor IXa por el factor XI (XIa) en presencia de trombina, fosfolípidos y calcio. El factor IXa forma un complejo enzimático con el factor VIII activado (VIIIa) por trombina que en presencia de fosfolípidos y calcio activa el factor X en factor Xa. En la segunda etapa, el factor Xa se hidroliza en el factor Xa específico de sustrato cromogénico liberando así un grupo cromofórico pNA que se puede cuantificar por espectrofotometría. La actividad del factor IX es directamente proporcional a la cantidad del factor Xa generado.  
40

#### Análisis - G-CSF HESilado recombinante

##### **Análisis de HPLC con Resource S de HES-G-CSF**

Las muestras se diluyen hasta 0,1 mg/ml con eluyente A. Se inyectan 20 µg en una columna de 1 ml Resource S (GE Healthcare, Munich, Alemania).

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

Eluyente B: Acetato 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

50 52% - 100% 13,0 - 13,6 min

La anchura del pico del pico del HES-G-CSF se considera el criterio de calidad, ya que se mostró que el HES-G-

CSF agregado tiene una anchura de pico mayor. El aumento de la anchura del pico se define como la diferencia de la anchura del pico del HES-G-CSF antes y después de tensión térmica o de cizalladura.

## EJEMPLOS

### Factor VIII recombinante

5 El factor VIII usado en los experimentos es una proteína de factor VIII con dominio B humano eliminado recombinante, producida en la línea celular humana HEK293F de acuerdo con el procedimiento descrito en la patente europea EP-A-1739179 (Schröder et al). El procedimiento de purificación consistía en 5 etapas de cromatografía y generaba una preparación de proteína de factor VIII de alta pureza (Winge et al, WO-A-2009/156430) con un patrón similar a la glicosilación humana (Sandberg et al, PCT/EP2009/060829).

### 10 Factor IX derivado de plasma

El material usado en estos experimentos procede del producto disponible en el mercado Nanotiv®, que es un concentrado de factor IX nanofiltrado y tratado por SD de alta pureza. Antes de usar en estos experimentos, el material se ha purificado más a través de una columna de filtración en gel donde el pico del monómero del factor IX se usó para experimentos posteriores.

### 15 G-CSF HESilado 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 hospedante, HEK 293F, se transfectó establemente con un casete de expresión que llevaba la secuencia codificante de ADNc para el G-CSF. Se usó el promotor fuerte para el casete. El procedimiento general también se describe en el documento EP 1739179 (Schröder et al).

20 El procedimiento de purificación consistía en cuatro etapas cromatográficas y generó una preparación de proteína G-CSF muy pura. La proteína G-CSF se acopló a un derivado de hidroxietil-almidón (HES) de peso molecular aproximadamente 100 KDa. Finalmente, el HES-G-CSF se purificó del derivado de HES sin reaccionar y el G-CSF por una etapa de cromatografía, dando como resultado una molécula con un peso molecular total de aproximadamente 120 KDa.

### 25 **Ejemplo 1:** Estabilización de rFVIII por melecitosa en solución

#### Preparación

El factor VIII recombinante (rFVIII) se preparó de acuerdo con la descripción en la sección experimental anterior. Este experimento comparaba el efecto estabilizante de la melecitosa en el rFVIII en solución, con el de la trehalosa el estabilizante usado habitualmente. La concentración de rFVIII era 100 UI/ml. Las composiciones de las

30 formulaciones investigadas en este experimento se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Composiciones de la formulación

|                                  | 1A  | 1B  |
|----------------------------------|-----|-----|
| Melecitosa, mM                   | -   | 48  |
| Trehalosa dihidrato, mM          | 63  | -   |
| NaCl, mg/ml                      | 30  | 30  |
| Cloruro cálcico dihidrato, 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 a lo largo del tiempo. Se tomaron muestras a intervalos regulares y se analizaron con el ensayo cromogénico, como se ha descrito en la sección experimental anterior. Los resultados se resumen en la tabla 2, como porcentaje del valor

35 inicial.

Tabla 2. Resultados

|    |       | Actividad del Factor VIII a lo largo del 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 melecitosa a pesar de su menor concentración molar, tiene un efecto de estabilización en el rFVIII en solución igual al de la trehalosa.

**Ejemplo 2:** Estabilización del rFVIII por la melecitosa en forma liofilizada

5 Preparación

El factor VIII recombinante (rFVIII) se preparó de acuerdo con la descripción en la sección experimental anterior. Este experimento comparaba el efecto estabilizante de la melecitosa con el de la trehalosa el estabilizante usado habitualmente, a lo largo del procedimiento de liofilización y en las formulaciones liofilizadas. La concentración de rFVIII era 100 UI/ml. Las composiciones de las formulaciones investigadas en este experimento se presentan en la

10

Tabla 3. Composiciones de las formulaciones

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

Se liofilizaron partes alícuotas de 1,5 ml de las soluciones en un liofilizador a escala de laboratorio. La recuperación de proteína a lo largo de la etapa de liofilización era 93% para la formulación 2B y 86% para la formulación 2A. Las muestras liofilizadas se almacenaron hasta 4 semanas a +25°C y +40°C para evaluar la actividad de la proteína a lo largo del 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. Los resultados se resumen en la tabla 4.

15

Tabla 4: Resultados

|                          |       | Actividad del Factor VIII a lo largo del 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 |
| *cambio no significativo |       |  |     |    |    |

20 Conclusiones del ejemplo 2: Sorprendentemente, este experimento muestra que la melecitosa puede proteger el rFVIII en concentración molar inferior que la trehalosa a lo largo de la etapa de liofilización, y que estabiliza el rFVIII mejor que la trehalosa durante el almacenamiento.

**Ejemplo 3:** Estabilización del rFVIII por la melecitosa en forma liofilizada

Preparación

25 El factor VIII recombinante (rFVIII) se preparó de acuerdo con la descripción en la sección experimental anterior. Este experimento comparaba el efecto estabilizante de la melecitosa en diferentes concentraciones a lo largo del procedimiento de liofilización y en las formulaciones liofilizadas, y también comparaba el efecto estabilizante con el tetrasacárido estaquiosa. La concentración del rFVIII era 170 UI/ml. Las composiciones de las formulaciones investigadas en este experimento se presentan en la tabla 5.

30

Tabla 5. Composiciones de las formulaciones.

|                                  | 3A  | 3B  | 3C  | 3D  |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Melecitosa, mM                   | 48  | 36  | 24  | -   |
| Estaquiosa, mM                   | -   | -   | -   | 30  |
| NaCl, mg/ml                      | 30  | 30  | 30  | 30  |
| Cloruro cálcico dihidrato, 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   |

5 Se liofilizaron partes alícuotas de 1,5 ml de las soluciones en un liofilizador a escala de laboratorio. La recuperación de proteína a lo largo de la etapa de liofilización era de 91 a 100% para las formulaciones que contenían melecitosa, mientras que la recuperación era del 84% para la formulación 3D que contenía estaquiosa como estabilizante. Las muestras liofilizadas se almacenaron hasta 12 meses a +25°C y +40°C para evaluar la actividad de la proteína a lo largo del 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. Los resultados se resumen en la tabla 6.

10

Tabla 6: Resultados

|    |      | Actividad del Factor VIII a lo largo del tiempo (meses), (% 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. = no analizado; \*cambio no significativo

15 Conclusiones del ejemplo 3: Este experimento muestra que la melecitosa funciona excepcionalmente bien como un estabilizante para el rFVIII a lo largo de la etapa de liofilización y en forma liofilizada. También muestra que la estaquiosa no es un estabilizante preferido para las formulaciones liofilizadas, ya que muestra resultados muy insatisfactorios durante el almacenamiento tanto a 25°C como a 40°C, comparado con las formulaciones que contienen melecitosa.

Ejemplo 4: Estabilización del factor IX plasmático por melecitosa en forma liofilizada

Preparación

20 El factor IX derivado del plasma (pFIX) se preparó de acuerdo con la descripción en la sección experimental anterior. Este experimento investiga el efecto estabilizante de la melecitosa en el pFIX. La concentración de pFIX era 100 UI/ml. Las composiciones de la formulación investigada en este experimento se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Composición de la formulación.

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

Se liofilizaron partes alícuotas de 1,5 ml de las soluciones en un liofilizador a escala de laboratorio. Las muestras

liofilizadas se almacenaron hasta 6 meses a +5°C, +25°C y +40°C para evaluar la actividad de la proteína a lo largo del 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

- 5 La recuperación de proteína a lo largo de la etapa de liofilización era aproximadamente 100%. Los resultados del estudio de estabilidad se muestran en la tabla 8.

Tabla 8: Resultados

|   |       | Actividad del Factor IX a lo largo del 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. = no analizado; *cambio no significativo |       |  |    |    |      |

- 10 Conclusiones del ejemplo 4: Este experimento muestra que, sorprendentemente, la melecitosa funciona bien como un estabilizante para el factor IX en forma liofilizada.

Ejemplo 5: Estabilización de G-CSF HESilado recombinante por melecitosa en forma liofilizada.

Preparación

- 15 El CSF HESilado recombinante (rHES-G-CSF) se preparó de acuerdo con la descripción en la sección experimental anterior. El experimento comparaba el efecto estabilizante de la melecitosa en el rHES-G-CSF en forma liofilizada, con el de la trehalosa el estabilizante usado habitualmente. La concentración de rHES-G-CSF era 0,3 mg/ml y las composiciones de las formulaciones investigadas se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Composiciones de la formulación

|                       | 5A  | 5B  |
|-----------------------|-----|-----|
| Melecitosa, mM        | 70  | -   |
| Trehalosa, mM         | -   | 70  |
| NaCl, mg/ml           | 30  | 30  |
| Polisorbato 20, mg/ml | 0,2 | 0,2 |
| Histidina, mg/ml      | 3   | 3   |

- 20 Se liofilizaron partes alícuotas de 1,5 ml de las soluciones en un liofilizador a escala de laboratorio. La recuperación de proteína se midió después de 4 semanas de almacenamiento a +40°C por el procedimiento de Resource S, descrito en la sección experimental anterior. Los resultados se resumen en la tabla 10.

Tabla 10: Resultados

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

- 25 Conclusiones del ejemplo 5. Este experimento muestra que la melecitosa tiene un efecto estabilizante en el rHES-G-CSF mejor que el de la trehalosa el estabilizante usado habitualmente en igual concentración molar.

**Ejemplo 6:** Estabilización del factor IX plasmático por la melecitosa a lo largo de la etapa de liofilización

Preparación

- 30 El factor IX derivado del plasma (pFIX) se preparó de acuerdo con la descripción en la sección experimental anterior. Este experimento investiga el efecto estabilizante de la melecitosa en el pFIX a lo largo de la etapa de liofilización, comparado con el tetrasacárido estaquirosa. La concentración de pFIX era 100 UI/ml. Las composiciones de las formulaciones investigadas en este experimento se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Composiciones de las formulaciones.

|                       | 6A   | 6B   |
|-----------------------|------|------|
| Melecitosa, 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 |

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

Resultados

La recuperación de proteína a lo largo de la etapa de liofilización era aproximadamente 100% para la formulación 6A, mientras que la correspondiente recuperación para la formulación 6B era 84%.

10 Conclusiones del ejemplo 6: Este experimento muestra que la melecitosa funciona bien como un estabilizante para el factor IX a lo largo de la etapa de liofilización. Sin embargo, la estaquiosa no es un candidato adecuado como estabilizante puesto que ocurre una pérdida de actividad significativa a lo largo de la etapa de liofilización.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un procedimiento para estabilizar un factor de coagulación sanguíneo humano seleccionado de FVII, FVIIa, derivados y muteínas de los mismos, por adición de melecitosa a una solución que comprende el factor de coagulación sanguíneo humano.
- 5 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución se transfiere al estado sólido opcionalmente por liofilización.
- 3.- El procedimiento de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la melecitosa está presente en una cantidad de hasta 1.000 mM, en particular de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, en particular de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM.
- 10 4.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que está presente al menos un tensioactivo tal como albúmina recombinante, polisorbato 80, polisorbato 20 o poloxámeros, en particular poloxámero 188.
- 5.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que está presente al menos un agente de tamponamiento tal como histidina, citrato sódico, HEPES, Tris, MOPS o PIPES.
- 15 6.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que está presente al menos un estabilizante adicional tal como azúcares, aminoácidos, polioles, cofactores o combinaciones de los mismos y/o en el que está presente al menos un modificador de la tonicidad tal como cloruro sódico, arginina, glicina, cloruro potásico, azúcares, o alcoholes de azúcares y/o en el que está presente al menos un agente de carga, tal como glicina, manitol, cloruro sódico, arginina o sacarosa.
- 20 7.- Una composición que comprende un factor de coagulación sanguíneo humano seleccionado de FVII, FVIIa, derivados y muteínas de los mismos y melecitosa.
- 8.- La composición de la reivindicación 7, en estado líquido o sólido.
- 9.- La composición de la reivindicación 7 o reivindicación 8, que además comprende un agente de carga, un tensioactivo, un agente de tamponamiento, un estabilizante adicional y/o modificador de la tonicidad.
- 25 10.- Uso de melecitosa para la estabilización de un factor de coagulación sanguíneo humano seleccionado de FVII, FVIIa, derivados y muteínas de los mismos, en particular en una estabilización durante el procedimiento, en un procedimiento de liofilización, en solución, durante la purificación y producción en particular en cultivo celular; o para la estabilización a largo plazo, en particular para mejorar la vida en anaquel, en el que el largo plazo es al menos 6 meses, en particular al menos 12 meses, más en particular al menos 18 meses, todavía más en particular 24 meses o 36 meses.
- 30