

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 343**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 38/45 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2009 PCT/EP2009/054657**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2009 WO09130181**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2009 E 09735163 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2268267**

54 Título: **Composición de transglutaminasa anhidra**

30 Prioridad:

21.04.2008 EP 08103642

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

02.11.2017

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)
Thurgauerstrasse 36/38
8050 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**BRADER, MARK;
FALCK, THOMAS y
KRISTIANSEN, GUNHILD KLARSKOV**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 640 343 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

Composición de transglutaminasa anhidra

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a composiciones de transglutaminasa, en particular composiciones liofilizadas estables de Factor XIII de coagulación sanguínea, según se define en las reivindicaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las transglutaminasas son enzimas dependientes de Ca^{2+} que catalizan la formación de enlaces isopeptídicos en las proteínas entre el grupo γ -carboxamida de la cadena lateral de glutamina y el grupo ϵ -amino de la cadena lateral de lisina. Las transglutaminasas se encuentran tanto extracelular como intracelularmente. Algunos ejemplos de transglutaminasas incluyen el Factor XIII, transglutaminasas epidérmicas, transglutaminasas de tipo II (transglutaminasas de tipo tisular, transglutaminasas hepáticas) y transglutaminasas de tipo I (transglutaminasas queratinocíticas).

15 El Factor XIII de coagulación sanguínea (FXIII) es una transglutaminasa plasmática también conocida como "fibrinolisasa" y "factor estabilizante de fibrina"; circula en el plasma con una concentración de 20 microgramos/mL. Esta proteína existe en el plasma como un tetrámero compuesto por dos subunidades A y dos subunidades B (A_2B_2). Cada subunidad tiene un peso molecular de aproximadamente 80 000 Da y la proteína completa tiene un peso molecular de aproximadamente 330 000 Da. Las subunidades A contienen el sitio catalítico de la transglutaminasa, mientras que las subunidades B no tienen actividad catalítica, sino que actúan como una proteína estructural que protege a las subunidades A de ser eliminadas.

20 El Factor XIII depende de trombina y Ca^{2+} para su activación. La trombina escinde el lado C terminal de la Arg37 en las subunidades A, con lo cual libera el péptido de activación (residuos 1-37 de la subunidad A) y las subunidades B y deja la forma activa del dímero A_2 . La subunidad A_2 del FXIII activado (FXIIIa) es la forma catalíticamente activa del FXIII.

25 La enzima FXIII es la última enzima que se activa en la cascada de coagulación y sirve para entrecruzar cadenas de α - y γ -fibrina, lo que da como resultado un coágulo más fuerte con una resistencia mayor a la fibrinólisis. Además, se entrecruzan una serie de proteínas antifibrinolíticas, prohemostáticas y adhesivas en el coágulo, con lo cual proporcionan una estructura de fibrina fuerte con mayor resistencia mecánica a la disolución mediante plasmina y otras enzimas proteolíticas.

30 Los preparados de Factor XIII o transglutaminasa purificados o parcialmente purificados que se pueden adquirir de distribuidores comerciales, en muchos casos, contienen estabilizantes añadidos tales como seroalbúmina humana (HSA, por sus siglas en inglés). El uso de estabilizantes proteicos es problemático, puesto que disminuye la actividad proteica específica, aumenta la carga proteica cuando se administra a los pacientes y puede interferir con la determinación de la pureza. También puede hacer que el preparado proteico sea inmunogénico. Estas desventajas de los estabilizantes proteicos los hacen particularmente desfavorables para la estabilización de proteínas altamente purificadas tales como proteínas recombinantes. Asimismo, el uso de estabilizantes proteicos causa contaminación potencial con antígenos virales cuando se añade, por ejemplo, albúmina.

35 El FXIII, aislado a partir de placenta o plasma o en forma de plasma fresco congelado, se ha empleado durante muchos años para el tratamiento de la deficiencia de Factor XIII. Estas formulaciones, sin embargo, presentan las desventajas de contener proteínas exógenas, con todos los problemas asociados a estas tales como inmunogenicidad indeseada.

40 Actualmente es posible preparar transglutaminasas y Factor XIII utilizando tecnología de ADN recombinante. Según se utiliza en la presente, rFXIII se refiere a Factor XIII recombinante. Sin embargo, hasta la fecha no hay ningún producto rFXIII que se pueda adquirir de distribuidores comerciales en el mercado.

45 La composición y actividad de los preparados proteicos utilizados en terapia debe ser estable durante periodos de tiempo relativamente largos. Solo rara vez es posible conseguir esta estabilidad en disolución y, por lo tanto, tales productos se comercializan habitualmente en estado anhidro. Una criodesecación suave (liofilización) es uno de los métodos elegidos para secar tales productos. Sin embargo, incluso cuando se utiliza este método, es difícil conseguir preparados estables que cumplan los requisitos de integridad y durabilidad.

50 La criodesecación de disoluciones de transglutaminasa o Factor XIII puede en algún caso, por ejemplo, llevar a una marcada caída en la actividad y pérdida de pureza. Un problema adicional para la criodesecación de, por ejemplo, el Factor XIII, lo crea un producto de degradación del Factor XIII, la denominada especie activada de forma no proteolítica (FXIIIa⁰), también conocida como Factor XIII preactivado. Se cree que el FXIIIa⁰ entraña un grave riesgo de toxicidad y la inyección de este puede potencialmente causar efectos secundarios no deseados. Es por tanto

deseable estabilizar las formulaciones de transglutaminasa o Factor XIII frente a la formación de productos activados de forma no proteolítica.

Se tiene constancia de varias composiciones de FXIII anhidras en la técnica anterior. A continuación, se exponen ejemplos de descripciones de algunas composiciones de FXIII liofilizadas. El documento JP-A-2003 055257 describe una composición que contiene Factor XIII, sacarosa, un L-aminoácido y albúmina, que está criodesecada y se reconstituye posteriormente. El documento EP-A-0 499 679 describe un proceso para producir un concentrado de Factor XIII en forma liofilizada. El documento WO-A-0029041 describe composiciones congeladas y líquidas de Factor XIII que contienen una sal de citrato y estabilizantes adicionales. Kreilgaard *et al.* describen en *Arch. Biochem. Biophys.* 360(1), 1998, 121-134, un estudio sobre los efectos de aditivos en la estabilidad de rhFXIII en el sólido anhidro durante la criodesecación y el almacenamiento. El documento WO2002/36155 describe que se puede formular una composición de FXIII liofilizada con EDTA 1 mM, glicina 10 mM, 2% de sacarosa en agua, o con histidina 20 mM, 3% de sacarosa p/vol., glicina 2 mM y 0.01% de polisorbato p/vol., a pH 8.0. El documento US 6204036 (Aventis Behring) trata sobre una formulación de transglutaminasa liofilizada estable que comprende al menos un aditivo seleccionado del grupo de D- y L-aminoácidos y sales, derivados, homólogos y dímeros de estos, azúcares y alcoholes de azúcares, ingredientes tensioactivos y agentes reductores con la condición de que el aditivo no sea glicina ni arginina, donde la formulación no contiene ningún estabilizante proteico y donde dicha formulación es soluble sin ninguna turbidez en un disolvente acuoso adecuado para la administración parenteral.

Estas formulaciones mencionadas anteriormente, sin embargo, pueden presentar la desventaja, descrita anteriormente, de contener altos niveles de Factor XIII activado de forma no proteolítica, lo que se considera un obstáculo para la viabilidad clínica y comercial de estas formulaciones. Es evidente, por lo tanto, que se desean en gran medida formulaciones de Factor XIII y transglutaminasa anhidras estables con bajos niveles de productos activados de forma no proteolítica. Además, tales formulaciones no deberían requerir la adición de estabilizantes proteicos, por ejemplo, HSA.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que las sales, p. ej. sales monovalentes, confieren un efecto estabilizante significativo a las composiciones de transglutaminasa anhidras, p. ej. Factor XIII, en lo que respecta a la pureza y a la formación de transglutaminasas preactivadas. Se muestra que este efecto es específico para el estado anhidro y tiene una particular relevancia para la producción de un producto comercial estable.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición de Factor XIII anhidra; dicha composición se puede obtener liofilizando una composición acuosa que comprende un compuesto de Factor XIII, una sal de cloruro sódico y al menos un componente adicional seleccionado del grupo compuesto por un azúcar, un aminoácido y un tampón, donde la concentración de la sal de cloruro sódico en la composición acuosa se encuentra en el intervalo de 10 a 75 mM y donde el compuesto de Factor XIII es un compuesto de Factor XIII recombinante. En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona un método para preparar dicha composición de transglutaminasa anhidra, una disolución reconstituida, una composición farmacéutica y un método de tratamiento.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente memoria descriptiva detallada. Se debería sobrentender, sin embargo, que la memoria descriptiva detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones preferidas de la invención, se aportan únicamente a modo de ilustración.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Evaluación de los niveles de sacarosa y NaCl. Análisis Modde del efecto de NaCl 25 Mm en la pureza mediante AIE-HPLC de muestras almacenadas a 40 °C.

Figura 2: Estudio factorial completo de los niveles de NaCl e histidina. Análisis Modde de los datos de rFXIIIa⁹ a 25 °C.

Figura 3: Estudio factorial completo de los niveles de NaCl e histidina. Análisis Modde de los datos de pureza mediante AIE-HPLC.

DEFINICIONES

Las expresiones transglutaminasa "preactivada" o "activada de forma no proteolítica", en relación con la presente invención, se refieren a una transglutaminasa que ha sido activada de forma no proteolítica, por ejemplo, cuando el Factor XIII se activa sin la presencia de trombina (la trombina tiene la capacidad de escindir el FXIII proteolíticamente), se dice que se activa de forma no proteolítica; para consultar algunas referencias remítase a, por ejemplo, Polgar J., *et al. Biochem J* 1990; 267: 557-60. Muszbek L. *et al. Thrombosis Research* 94 (1999) 271-305. El Factor XIII activado de forma no proteolítica (FXIII⁹), que es un producto de degradación de FXIII, constituye una

amenaza para la viabilidad de una composición farmacéutica de FXIII porque se cree que este producto de degradación entraña un grave riesgo de toxicidad.

La expresión "biológicamente activo" según se utiliza en la presente significa que tiene actividad en un ser vivo tal como actividad médica, agrícola o cosmética.

5 La expresión "composición acuosa", en relación con la presente invención, se refiere a una composición que comprende agua líquida. Tal composición es habitualmente una disolución o una suspensión. La expresión "composición acuosa" según se emplea en el contexto de la presente invención se refiere a una formulación que comprende al menos un 50% en peso (p/p) de agua.

10 El término "diluyente", en relación con la presente invención, se refiere a una suspensión o disolución líquida. El término "diluyente" según se emplea en el contexto de la presente invención se refiere a una disolución o una suspensión que comprende al menos un 50% en peso (p/p) de agua. En el contexto de la presente invención el diluyente se utiliza en la reconstitución de la composición de transglutaminasa anhidra.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención proporciona composiciones anhidras de Factor XIII, en particular composiciones liofilizadas estables del Factor XIII de coagulación sanguínea (FXIII), según se definen en las reivindicaciones. La divulgación también proporciona métodos para preparar dichas composiciones anhidras de transglutaminasa, disoluciones reconstituidas, composiciones farmacéuticas y método de tratamientos.

20 La presente invención proporciona un producto que comprende una transglutaminasa, que es un Factor XIII, con un nivel de pureza y un nivel de preactivación que se mantiene aceptable a lo largo del proceso de fabricación, almacenamiento y periodo de uso del producto de transglutaminasa.

25 La composición de la presente invención, que proporciona una mejora en la estabilidad respecto al nivel de preactivación y respecto a la pureza total, comprende una composición de Factor XIII anhidra, dicha composición se puede obtener liofilizando una composición acuosa que comprende un compuesto de Factor XIII, una sal de cloruro sódico y al menos un componente adicional seleccionado del grupo compuesto por un azúcar, un aminoácido y un tampón, donde la concentración de la sal de cloruro sódico en la composición acuosa se encuentra en el intervalo de 10 a 75 mM y donde el compuesto de Factor XIII es un compuesto de Factor XIII recombinante.

30 En un aspecto de la divulgación, la composición anhidra de la presente invención comprende una composición de transglutaminasa anhidra, dicha composición se puede obtener liofilizando o secando mediante atomización una composición acuosa que comprende una transglutaminasa, una sal y al menos un componente adicional seleccionado del grupo compuesto por un azúcar, un aminoácido y un tampón, donde la concentración de la sal en la composición acuosa se encuentra en el intervalo de 5 a 100 mM, con la condición de que la composición no sea una composición de Factor XIII anhidra obtenida liofilizando una disolución de Factor XIII que contiene un 0.5% de NaCl y un 2.25% de glicina.

35 En una realización, la composición anhidra de la presente invención no contiene ningún estabilizante proteico tal como albúmina.

Componentes de la composición

40 La composición de la presente divulgación comprende una transglutaminasa. Algunos ejemplos de transglutaminasas que se podrían estabilizar con la formulación de la presente divulgación incluyen Factor XIII, transglutaminasas epidérmicas, transglutaminasas de tipo II (transglutaminasa de tipo tisular, transglutaminasas hepáticas) y transglutaminasas de tipo I (transglutaminasa queratinocítica).

Factor XIII

45 En un aspecto de la divulgación, la composición acuosa que se ha de liofilizar o secar mediante atomización comprende un compuesto de Factor XIII. El compuesto de Factor XIII puede ser, por ejemplo, un Factor XIII natural de origen natural y variantes alélicas naturales del Factor XIII. Estos compuestos de FXIII se pueden originar, por ejemplo, a partir de fuentes humanas o de otros animales, p. ej., FXIII humano, FXIII porcino y FXIII bovino. La secuencia de origen natural del Factor XIII humano se puede encontrar, por ejemplo, en los documentos EP 268772 y EP 236978. El compuesto de Factor XIII de la presente divulgación incluye el tetrámero zimógeno del Factor XIII completo (A₂B₂) y el Factor XIIIa, así como las subunidades de este, incluida la subunidad A y los dímeros A₂.

50 El compuesto de FXIII de la presente invención es un compuesto de Factor XIII recombinante. Los compuestos de Factor XIII pueden ser, por ejemplo, fragmentos, derivados o variantes biológicamente activos del Factor XIII que conservan al menos parte de la actividad de entrecruzamiento característica del Factor XIII de origen natural. Esta actividad de entrecruzamiento se puede medir mediante métodos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, los fragmentos, derivados o variantes biológicamente activos del Factor XIII conservan un 10%, un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60% un 70%, un 80%, un 90% o un 100% de la actividad de entrecruzamiento del Factor XIII de origen natural.

Los fragmentos, derivados y variantes del Factor XIII incluyen variantes sustitucionales, insercionales y deleciones. Las variantes insercionales comprenden fusiones de grupos amino y/o carboxilo terminales, así como inserciones intrasecuenciales de un único o múltiples residuos de aminoácidos. Las inserciones se pueden introducir, por ejemplo, dentro de la secuencia de codificación madura de la proteína Factor XIII de tipo natural. Las variantes deleciones se caracterizan por la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos de la proteína Factor XIII de tipo natural. Estas variantes se preparan normalmente mediante mutagénesis de nucleótidos de sitios específicos en el ADN que codifica la proteína, con lo cual se produce ADN que codifica la variante, y posteriormente se expresa el ADN en un cultivo celular recombinante. Sin embargo, los fragmentos de proteínas variantes se pueden preparar también mediante síntesis *in vitro*. Si bien el sitio para la introducción de una variación en la secuencia de aminoácidos normalmente está predeterminado, no es necesario que la mutación en sí esté predeterminada. Por ejemplo, con el fin de optimizar la eficiencia de una mutación en un sitio determinado, se pueden llevar a cabo mutagénesis aleatorias en el codón o región objetivo y examinar las variantes de proteína expresadas en busca de la combinación óptima de actividad deseada. Las técnicas para llevar a cabo mutaciones sustitucionales en sitios predeterminados del ADN que tienen una secuencia conocida son muy conocidas, por ejemplo, mutagénesis del cebador M13. Las variantes sustitucionales son aquellas donde al menos una secuencia de un residuo se ha eliminado y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Las sustituciones de aminoácidos son habitualmente de residuos únicos; las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente desde 1 hasta 10 residuos de aminoácidos y las deleciones variarán desde aproximadamente 1 hasta 30 residuos. Las deleciones o las inserciones se pueden llevar a cabo, por ejemplo, en pares adyacentes, es decir, una deleción de 2 residuos o una inserción de 2 residuos. Se pueden combinar sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de estas para llegar a un constructo final. Obviamente, las mutaciones que se llevarán a cabo en el ADN que codifica la proteína variante no deben colocar la secuencia fuera del marco de lectura y preferentemente no crearán regiones complementarias que podrían producir una estructura secundaria de ARNm. Un ejemplo de una variante de Factor XIII genéticamente modificada es la variante Val34Leu del Factor XIII humano de origen natural (es decir, una variante en la cual el residuo de Val en la posición 34 de la secuencia de aminoácidos del Factor XIII humano de origen natural se reemplaza por un residuo de leucina).

El Factor XIII de la presente divulgación se puede purificar a partir de una amplia variedad de materiales biológicos, incluidos lisados, homogeneizados o extractos de células que producen de forma natural un Factor XIII, pero también de células que han sido modificadas genéticamente para que produzcan un Factor XIII tales como células de levadura transformadas con ADN que codifica un Factor XIII. Un ejemplo de un método para purificar Factor XIII se describe en el documento WO/2006/021584.

El Factor XIII de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante. Los métodos para preparar Factor XIII recombinante se conocen en la técnica. Remítase a, por ejemplo, Davie *et al.*, EP 268 772, Grundmann *et al.*, AU-A-69896/87; Bishop *et al.*, *Biochemistry* 1990, 29: 1861-1869; Board *et al.*, *Thromb. Haemost.* 1990, 63: 235-240; Jagadeeswaran *et al.*, *Gene* 1990, 86: 279-283 y Broker *et al.*, *FEBS Lett.* 1989, 248: 105-110. En una realización, el dímero A₂ del Factor XIII se prepara citoplasmáticamente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* según se describe en la solicitud de patente de EE. UU. con n.º de serie 07/741 263. Las células se recolectan y se lisan, y se prepara un lisado limpiado. El lisado se fracciona mediante cromatografía de intercambio aniónico a pH desde neutro hasta ligeramente alcalino utilizando una columna de agarosa derivatizada tal como DEAE Sepharose™ de flujo rápido (Pharmacia) o similar. El Factor XIII se precipita a continuación a partir del eluato de la columna concentrando el eluato y ajustando el pH a 5.2-5.5 tal como mediante diafiltración frente a un tampón de succinato amónico. El precipitado se disuelve a continuación y se purifica adicionalmente utilizando técnicas cromatográficas convencionales tales como filtración en gel y cromatografía de interacción hidrofóbica. De acuerdo con la presente invención, el Factor XIII es un Factor XIII recombinante. En una realización de la presente invención, el Factor XIII es Factor XIII humano. En una realización de la presente invención, el Factor XIII es Factor XIII humano recombinante. En una realización de la presente invención, el Factor XIII es un dímero de subunidades A.

La concentración de Factor XIII en la composición acuosa que se ha de liofilizar puede variar, por ejemplo, en un amplio intervalo, y en una realización está en el intervalo de 0.003-100 mg/mL, en una realización adicional en el intervalo de 1-30 mg/mL y en otra realización adicional en el intervalo de 2-15 mg/mL.

Sales

La composición acuosa de la invención comprende una sal de cloruro sódico. La sal se utiliza para mejorar la estabilidad de la composición anhidra en cuanto a la preactivación y en cuanto a la pureza total. El diluyente de la divulgación puede, por ejemplo, comprender una sal o mezclas de sales. En algunos aspectos de la divulgación la sal es una sal monovalente. Algunos ejemplos de sales monovalentes que se pueden utilizar, por ejemplo, incluyen, sin carácter limitante, cloruro sódico, cloruro potásico, acetato sódico, sulfato sódico, gluconato sódico y mezclas de

estas. En algunos aspectos de la divulgación, la sal es una sal divalente. En algunos aspectos, la sal es una sal divalente con la condición de que la sal divalente no sea una sal de Ca (II).

La concentración de NaCl empleada puede variar dentro del intervalo de 10-75 mM, en realizaciones adicionales en los intervalos de 15-70 mM, 25-75 mM y 20-60 mM, y en otra realización adicional en el intervalo de 25-50 mM.

5 Azúcares y alcoholes de azúcares

En algunas realizaciones de la presente invención, la composición acuosa que se ha de liofilizar comprende uno o más azúcares o alcoholes de azúcares. El diluyente utilizado para la reconstitución de la composición secada puede comprender, por ejemplo, uno o más azúcares o alcoholes de azúcares. Los azúcares o alcoholes de azúcares se pueden utilizar para estabilizar las proteínas en la composición anhidra de la invención durante la criodesecación evitando efectos desestabilizantes físicos/químicos (p. ej. despliegue). Algunos ejemplos de azúcares o alcoholes de azúcares que se pueden utilizar, por ejemplo, incluyen sacarosa, manitol, trehalosa, lactosa, maltosa, sorbitol, rafinosa, dextrinas, ciclodextrinas y los derivados, homólogos y mezclas de estos.

La concentración de azúcar y alcohol de azúcar empleado puede variar, por ejemplo, en un amplio intervalo, y en una realización está en el intervalo de 0.1-15% (p/p), en una realización adicional en el intervalo de 0.1-8.5% (p/p) y en otra realización adicional en el intervalo de 0.5-5% (p/p).

Aminoácidos

En algunas realizaciones de la presente invención, la composición acuosa que se ha de liofilizar comprende uno o más aminoácidos. En algunas realizaciones de la presente invención, el diluyente utilizado para la reconstitución de la composición secada puede comprender uno o más aminoácidos. Los aminoácidos se pueden utilizar, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la composición liofilizada o secada mediante atomización. En una realización, el o los aminoácidos se utilizan para reducir la formación de agregados de la transglutaminasa, p. ej., el FXIII durante el almacenamiento de la composición. Algunos ejemplos de aminoácidos que se pueden utilizar incluyen glicina, histidina, arginina, ácido glutámico, metionina, treonina, lisina, alanina, isoleucina y cisteína (Gly, His, Arg, Glu, Met, Thr, Lys, Ala, Ile y Cys) y las sales, derivados, homólogos, dímeros, oligómeros y mezclas de estos.

Los derivados y homólogos adecuados son muy conocidos. Los derivados adecuados incluyen ésteres, tioésteres y amidas del grupo carboxilo, derivados acilados del grupo amino, incluidos derivados de uretano; y ésteres, amidas y ésteres de grupos funcionales de cadena lateral. Los homólogos adecuados incluyen, por ejemplo, omitina (homólogo de lisina), homoserina y ácido α -aminobutírico. Las sales fisiológicamente aceptables también son muy conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Science: Drug Receptors and Receptor Theory*, (18.^a ed.), Mack Publishing Co., Easton Pa. (1990).

Las concentraciones de los aminoácidos empleadas pueden estar, por ejemplo, en el intervalo de 0.01-10% (p/p) o en el intervalo de 0.1-3% (p/p).

Tampones

En algunas realizaciones de la presente invención, la composición acuosa que se ha de liofilizar y/o el diluyente utilizado para la reconstitución de la composición secada comprenden un tampón. Un tampón es una disolución que comprende una sustancia, sustancia que puede prevenir cambios significativos en el pH de disoluciones a las que se añaden pequeñas cantidades de ácidos o bases y, por ende, puede mantener en gran medida la acidez o basicidad original de la disolución. Un tampón normalmente comprende un ácido débil o base débil junto con una sal de estos.

El pH de las composiciones acuosas podría estar en el intervalo de 2 a 10, particularmente entre 7 y 8. Los aminoácidos descritos anteriormente o los tampones, que tienen un pH en el intervalo de 2 a 10 se podrían utilizar para efectuar el tamponado. Algunos ejemplos de tampones que se pueden utilizar, por ejemplo, incluyen tampones de acetato, tampones de carbonato, tampones de citrato, tampones de glicilglicina, tampones de histidina, tampones de glicina, tampones de lisina, tampones de arginina, tampones de fosfato (que contienen, p. ej., dihidrogenofosfato sódico, hidrogenofosfato disódico o fosfato trisódico), tampones de TRIS [tris(hidroximetil)aminometano], tampones de bicina, tampones de tricina, tampones de malato, tampones de succinato, tampones de maleato, tampones de fumarato, tampones de tartrato, tampones de aspartato y mezclas de estos. En algunas realizaciones se utilizan tampones de citrato, tampones de histidina, tampones de fosfato sódico, tampones de succinato y tampones de TRIS. En una realización se utiliza histidina.

Las concentraciones de tampón empleadas pueden estar, por ejemplo, en el intervalo de 0-50 mM o en el intervalo de 0-25 mM.

Otros componentes

También se pueden incorporar otro u otros componentes a la composición acuosa que se ha de liofilizar y/o al diluyente utilizado para la reconstitución de la composición secada. Tales ingredientes adicionales incluyen, sin

carácter limitante, surfactantes no iónicos, agentes reductores, agentes quelantes, antioxidantes, conservantes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes espesantes, modificadores de la tonicidad (agentes que ajustan la tonicidad), vehículos oleaginosos, proteínas (p. ej., seroalbúmina humana, gelatina u otras proteínas) y sustancias zwitteriónicas (p. ej., betaína, taurina o un aminoácido tal como arginina, glicina, lisina o histidina). Tales ingredientes adicionales no deberían, obviamente, afectar adversamente a la estabilidad global de la composición acuosa o de la composición anhidra de la presente invención. A este respecto, se hace referencia a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19.^a edición, 1995.

Surfactantes no iónicos

En algunas realizaciones de la presente invención, la composición acuosa que se ha de liofilizar y/o el diluyente utilizado para la reconstitución de la composición secada comprenden un surfactante no iónico. Los surfactantes iónicos son agentes tensioactivos que ejercen su efecto protegiendo a las proteínas de superficies críticas (p. ej., envases, sólidos). Los surfactantes iónicos se pueden utilizar, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la composición liofilizada. Algunos ejemplos de surfactantes no iónicos que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, sin carácter limitante, Tween 80, Tween 20, PEG, alcohol acetílico, PVP, PVA, alcohol lanolínico, monooleato de sorbitán, poloxámeros y éteres alquílicos de polioxietileno. En una realización, se utiliza Tween 20.

Las concentraciones de los surfactantes no iónicos empleadas pueden estar, por ejemplo, en el intervalo de 0.0001-5% (p/p) o en el intervalo de 0.0002% y 0.1% (p/p).

Agentes reductores

En algunas realizaciones de la presente invención, la composición acuosa que se ha de liofilizar y/o el diluyente utilizado para la reconstitución de la composición secada comprenden un agente reductor. Los agentes reductores tales como antioxidantes, se utilizan para eliminar radicales libres que podrían desestabilizar las proteínas. Algunos ejemplos de agentes reductores que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, sin carácter limitante, cisteína, *N*-acetilcisteína, tioglicerol, sulfuro de sodio, tocoferoles y glutatión.

Agentes quelantes

En algunas realizaciones de la presente invención, la composición acuosa que se ha de liofilizar y/o el diluyente utilizado para la reconstitución de la composición secada comprenden un agente quelante. Los agentes quelantes se utilizan para eliminar metales (hierro, cobre) de la formulación y normalmente tienden a proteger las proteínas de reacciones catalizadas por metales. Algunos ejemplos de agentes quelantes que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, sin carácter limitante, sales de EDTA, ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de estos. En una realización de la presente invención, el agente quelante está presente en una concentración de 0.1 mg/mL a 5 mg/mL. En una realización de la presente invención, el agente quelante está presente en una concentración de 0.1 a 2 mg/mL. En una realización adicional de la presente invención, el agente quelante está presente en una concentración de 2 mg/mL a 5 mg/mL.

Antioxidantes

En algunas realizaciones de la presente invención, la composición acuosa que se ha de liofilizar y/o el diluyente utilizado para la reconstitución de la composición secada comprenden un antioxidante. En una realización, la composición acuosa comprende metionina (u otro aminoácido o análogo aminoacídico que contenga azufre) para inhibir la oxidación de los residuos de metionina a su forma sulfoxídica cuando la transglutaminasa, p. ej. el FXIII, es un polipéptido que comprende al menos un residuo de metionina susceptible de tal oxidación. Se pretende que la expresión "inhibir la oxidación" indique una minimización de la acumulación de especies oxidadas (de metionina) con el tiempo. La inhibición de la oxidación de la metionina da como resultado una mayor retención del polipéptido en su forma molecular adecuada. Se puede utilizar, por ejemplo, cualquier estereoisómero de metionina (isómero L, D o LD) o combinaciones de estos. La cantidad que se ha de añadir debería ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de tal modo que la cantidad de forma sulfoxídica de metionina sea aceptable para las agencias reguladoras. Habitualmente esto significa que la composición no contiene más de aproximadamente un 10% a aproximadamente un 30% de forma sulfoxídica de metionina. Esto se puede conseguir en general, por ejemplo, añadiendo metionina en una cantidad tal que la proporción molar de metionina añadida respecto a los residuos de metionina varíe de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como de 10:1 a aproximadamente 100:1.

Conservantes

En algunas realizaciones de la presente invención, la composición acuosa que se ha de liofilizar y/o el diluyente utilizado para la reconstitución de la composición secada comprenden un conservante. Los conservantes se pueden añadir por requisitos reguladores para recipientes de dosis múltiples. Los conservantes se utilizan como agente antimicrobiano para proteger de contaminación microbiana durante la extracción de múltiples dosis a partir de viales. Algunos ejemplos de conservantes que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, sin carácter limitante, fenol, *o*-

5 cresol, *m*-cresol, *p*-cresol, clorocresol, *p*-hidroxibenzoato de metilo, *p*-hidroxibenzoato de etilo, *p*-hidroxibenzoato de propilo, *p*-hidroxibenzoato de butilo, 2-fenoxietanol, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol, tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, dehidroacetato sódico, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3-*p*-clorfenoxipropan-1,2-diol) y mezclas de estos. El conservante puede estar presente, por ejemplo, en una concentración de 0.1 mg/mL a 20 mg/mL. En una realización de la presente invención el conservante está presente en una concentración de 0.1 mg/mL a 5 mg/mL. En una realización adicional de la presente invención, el conservante está presente en una concentración de 5 mg/mL a 10 mg/mL. En otra realización de la presente invención el conservante está presente en una concentración de 10 mg/mL a 20 mg/mL.

10 Un experto en la técnica sería capaz de utilizar los métodos descritos más adelante para analizar los efectos en la estabilidad, preactivación y pureza del o de los componentes añadidos en la composición anhidra o composición acuosa de la divulgación, con experimentación rutinaria únicamente.

Composición anhidra – Polvo

15 Tras la liofilización, la composición de la invención estará en forma anhidra. La composición anhidra de la invención puede ser, por ejemplo, un material sólido, en polvo o granular. En una realización, la composición anhidra de la invención es un polvo. El nivel de humedad residual en esta composición secada es importante para la estabilidad de la transglutaminasa anhidra, p. ej. FXIII, durante el almacenamiento. En una realización de la invención, la composición anhidra contiene menos de un 3% de humedad residual. En una realización adicional, la composición anhidra contiene menos de un 1% de humedad residual.

Técnicas de secado y reconstitución

20 La liofilización y secado por atomización de la composición acuosa de la presente divulgación se pueden llevar a cabo utilizando métodos de liofilización y secado por atomización muy conocidos para aquellos expertos en la técnica: para la liofilización remítase a, por ejemplo, Williams y Polli (1984), *J. Parenteral Sci. Technol.* 38:48-59. Para el secado por atomización remítase a, por ejemplo, *Masters in Spray-Drying Handbook* (5.^a ed; Longman Scientific and Technical Essex, R.U., 1991), págs. 491-676; Broadhead *et al.* (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18:1169-1206 y Mumenthaler *et al.* (1994) *Pharm. Res.* 11:12-20. También se pueden utilizar otras técnicas de secado, tales como secado al aire, remítase a Carpenter y Crowe (1988), *Cryobiology* 25:459-470 y Roser (1991) *Biopharm.* 4:47-53. La composición anhidra de la presente invención se obtiene mediante liofilización. El proceso de liofilización habitualmente incluye los siguientes pasos: un paso de congelación, un paso de secado primario y un paso de secado secundario. En el paso de congelación, se enfría la composición acuosa. La temperatura y la duración del paso de congelación se eligen de modo que todos los componentes en la composición se congelen completamente. Por ejemplo, una temperatura de congelación adecuada es aproximadamente -40 °C. En el paso de secado primario, el hielo formado durante la congelación se elimina mediante sublimación a temperaturas por debajo de la temperatura ambiente al vacío. Por ejemplo, la cámara de presión utilizada para la sublimación puede ser, por ejemplo, desde aproximadamente 40 mTorr a 400 mTorr y la temperatura puede estar, por ejemplo, entre -30 °C y -5 °C. Tras el secado primario, cualquier cantidad de líquido residual que no se haya podido eliminar por sublimación se elimina mediante el secado secundario, es decir, por desorción. La temperatura durante el secado secundario es próxima o superior a la temperatura ambiente.

40 En una realización de la invención, se introduce un templado (paso de calentamiento) en el paso de congelación durante la liofilización. Este calentamiento se lleva a cabo hasta temperaturas por debajo del punto de congelación de la formulación. Este templado (paso de calentamiento) puede estabilizar adicionalmente la composición anhidra de la invención.

Reconstitución

45 En una etapa deseada, por ejemplo, cuando sea el momento de administrar la transglutaminasa, p. ej., el FXIII, a un paciente, se puede reconstituir la composición anhidra de la invención con un diluyente. La reconstitución generalmente tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 25 °C para asegurar la hidratación completa, aunque se pueden emplear otras temperaturas según se desee. El tiempo requerido para la reconstitución dependerá, p. ej. del tipo de diluyente y de la cantidad de transglutaminasa y otros componentes.

En un aspecto de la divulgación el diluyente es agua destilada. Puede ser, por ejemplo, una ventaja utilizar agua destilada, ya que no se necesita producir un diluyente distinto personalizado.

50 En un aspecto de la divulgación, el diluyente es etanol. En un aspecto de la divulgación, el diluyente puede comprender, por ejemplo, uno o más componentes tales como sales, azúcares, aminoácidos, tampones, surfactantes no iónicos, agentes reductores, agentes quelantes, antioxidantes, conservantes, agentes humectantes, emulsificantes, agentes espesantes, modificadores de la tonicidad, vehículos oleaginosos, proteínas (p. ej. seroalbúmina humana, gelatina u otras proteínas) y sustancias zwitteriónicas. La elección de qué componentes incluir en el diluyente y la cantidad de estos componentes, está regida por el efecto que se desea conseguir mediante estos componentes. Algunos ejemplos de diluyentes incluyen, sin carácter limitante, agua bacteriostática

para inyección (BWF1, por sus siglas en inglés), una disolución de pH tamponado, (p. ej., salino tamponado con fosfato), una disolución de salino estéril y una disolución de dextrosa.

La concentración de proteína en la disolución reconstituida es de al menos 5 mg/mL, por ejemplo, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 400 mg/mL, de aproximadamente 20 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL o de aproximadamente 30 mg/mL a aproximadamente 150 mg/mL. Se considera que las altas concentraciones de proteína en la disolución reconstituida son particularmente útiles cuando la disolución reconstituida está destinada a una administración subcutánea. Sin embargo, para otras vías de administración, tales como la administración intravenosa, puede que se deseen concentraciones más bajas de proteína en la disolución reconstituida (por ejemplo, de aproximadamente 5-50 mg/mL o de aproximadamente 10-40 mg/mL de proteína en la disolución reconstituida). En ciertos aspectos de la divulgación, la concentración de proteína en la disolución reconstituida es significativamente más alta que en la formulación presecada. Por ejemplo, la concentración de proteína en la disolución reconstituida puede ser aproximadamente 2-40 veces, 3-10 veces y o 3-6 veces (p. ej. al menos tres veces o al menos cuatro veces) la de la composición acuosa presecada.

En una realización de la presente invención, la composición de transglutaminasa anhidra, p. ej., que comprende un Factor XIII, es estable durante más de 3 años de almacenamiento y la disolución reconstituida es estable durante más de 6 semanas de uso. En una realización de la presente invención, la composición de transglutaminasa anhidra, p. ej. que comprende un Factor XIII, es estable durante más de 2 años de almacenamiento y la disolución reconstituida es estable durante más de 4 semanas de uso. En una realización de la presente invención, la composición de transglutaminasa anhidra, p. ej., que comprende un Factor XIII, es estable durante más de 1 año de almacenamiento y la disolución reconstituida es estable durante más de 2 semanas de uso. En una realización de la presente invención, no más de un 1% de la composición de Factor XIII reconstituida es Factor XIII activado no proteolíticamente. En una realización de la presente invención, no más de un 0.5% de la composición de Factor XIII reconstituida es Factor XIII activado no proteolíticamente.

Variantes ilustrativas

En las Tablas 1 y 2 se expone una lista de variantes ilustrativas de la invención.

Tabla 1: Una lista de variantes ilustrativas

5 mL de llenado; 2.5 mL de reconstitución				
	composición	Disolución llenado de concentración (mM)	Disolución llenado de sólidos (mg/mL)	Reconstituida de osmolaridad (mM)
Proteína	2.5	0	2.5	0
Sacarosa	26 mg/mL	75	26	150
Histidina	20 mM	20	3.1	40
NaCl	25 mM	25	1.45	100
Polisorbato 20	0.01%	0	0	0
			33.05	290
6 mL de llenado; 3 mL de reconstitución				
Proteína		2.5	0	2.5 0
Sacarosa		26 mg/mL	75	26 150
Histidina		20 mM	20	3.1 40
NaCl		25 mM	25	1.45 100
Polisorbato 20		0.01%	0	0 0
				33.05 290

--

ES 2 640 343 T3

3 mL de llenado reconstituir con 3 mL				
Proteína	5.0 mg/mL	0	5	0
Sacarosa	55 mg/mL	160	55	160
Histidina	20 mM	20	3.1	20
NaCl	50 mM	50	2.9	100
Polisorbato 20	0.01%	0	0	0
			66	280

3 mL de llenado reconstituir con 3 mL				
Proteína	5.0 mg/mL	0	5	0
Sacarosa	72 mg/mL	210	72	210
Histidina	20 mM	20	3.1	20
NaCl	25 mM	25	1.45	50
Polisorbato 20	0.01%	0	0	0
			81.55	280

3 mL de llenado reconstituir con 3 mL				
Proteína	5.0 mg/mL	0	5	0
Sacarosa	48 mg/mL	140	48	140
Histidina	40 mM	40	6.2	40
NaCl	50 mM	50	2.9	100
Polisorbato 20	0.01%	0	0	0
			62.1	280

4 mL de llenado reconstituir con 2 mL				
Proteína	5.0 mg/mL	0	5	0
Sacarosa	26 mg/mL	76	26	152
Histidina	20 mM	20	3.1	40
NaCl	25 mM	25	1.45	100
Polisorbato 20	0.01%	0	0	0
			35.55	292

2 mL de llenado; 3 mL de reconstitución				
Proteína	7.5	0	7.5	0
Sacarosa	85 mg/mL	250	57	166
Histidina	20 mM	20	3.1	13

2 mL de llenado; 3 mL de reconstitución				
NaCl	50 mM	50	2.9	33
Polisorbato 20	0.01%	0	0	0
			70.5	212

Tabla 2: Una variante ilustrativa

Vial de 12 mL llenado con 3 mL de disolución de llenado, liofilizado, a continuación reconstituido con 3 mL de agua		
Disolución de llenado	Vial liofilizado (polvo)	Vial reconstituido
5 mg/mL rFXIII	15 mg	5 mg/mL
55 mg/mL Sacarosa	165 mg	55 mg/mL
20 mM Histidina	9.3 mg	20 mM
0.01% Polisorbato 20	0.3 mg	0.01%
50 mM NaCl	8.7 mg	50 mM
pH = 8	-	pH = 8

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

- 5 La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una transglutaminasa, p. ej. un Factor XIII. Esta composición farmacéutica comprende la disolución reconstituida o la composición anhidra de la presente invención.

En una realización, la composición farmacéutica es una composición criodesecada anhidra destinada a la reconstitución por parte del facultativo o del paciente mediante la adición de diluyente antes del uso.

- 10 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación que contienen una transglutaminasa, p. ej. un Factor XIII, se pueden administrar a un paciente que necesite un tratamiento de este tipo mediante varias vías diferentes, p. ej. por vía tópica (tal como mediante aplicación a la piel o a una membrana mucosa), mediante vías que evitan la absorción (tales como administración en una arteria, en una vena o en el corazón) y mediante vías que implican absorción (tales como administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen).

- 15 La administración de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación a pacientes que lo necesiten puede ser mediante varias vías de administración, p. ej., lingual, sublingual, bucal, oral, en el estómago o intestino, nasal, pulmonar (p. ej., a través de los bronquiolos y alveolos, o ambos), epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular (p. ej., a través de la conjuntiva), uretral o parenteral.

- 20 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar en varias formas farmacéuticas, p. ej., como disoluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsiones múltiples, espumas, ungüentos, pastas, emplastos, pomadas, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas (p. ej., cápsulas de gelatina dura o cápsulas de gelatina blanda), supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, espráis, polvos, aerosoles, inhalantes, gotas oftálmicas, pomadas oftálmicas, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, pomadas vaginales, soluciones para inyección, soluciones que se transforman *in situ* (p. ej., gelificación *in situ*, fijación *in situ*, precipitación *in situ* o cristalización *in situ*), disolución para infusión o como implantes.

- 25 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden además combinar, unir o conjugar (p. ej., mediante interacciones electrostáticas, hidrófobas o covalentes), con un portador de fármacos, un sistema de suministro de fármacos o un sistema de suministro de fármacos avanzado con el fin de aumentar adicionalmente la estabilidad de la transglutaminasa, p. ej., el Factor XIII, para incrementar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, conseguir una cronoterapia, muy conocida para aquellos expertos en la técnica, y/o para aumentar la adhesión del paciente. Algunos ejemplos de portadores, sistemas de suministro de fármacos y sistemas de suministro de fármacos avanzados incluyen, sin carácter limitante, polímeros, p. ej., celulosa y derivados de esta, otros polisacáridos (p. ej., dextrano y derivados de este, almidón y derivados de este), alcohol polivinílico, polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y ácido poliglicólico y copolímeros de bloque de estos, polietilenglicoles, proteínas portadoras (p. ej., albúmina), geles (p. ej., sistemas termogelificantes tales como sistemas de copolímeros de bloque muy conocidos para aquellos expertos en la técnica), micelas, liposomas,

microesferas, nanoparticulados, cristales líquidos y dispersiones de estos, fase L2 y dispersiones de esta muy conocidas para aquellos expertos en la técnica del comportamiento de fases en sistemas lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples (autoemulsionantes y automicroemulsionantes), ciclodextrinas y derivados de estas, y dendrímeros.

- 5 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son adecuadas para su uso en la formulación de sólidos, semisólidos, polvos y disoluciones para administración pulmonar utilizando, por ejemplo, un inhalador de dosis medida, un inhalador de polvo seco o un nebulizador, todos los cuales son dispositivos muy conocidos para aquellos expertos en la técnica.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son adecuadas para su uso en la formulación de sistemas de suministro de fármacos de liberación controlada, liberación sostenida, liberación prolongada, liberación retardada o liberación lenta. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son útiles, por ejemplo, en la formulación de sistemas de liberación sostenida y de liberación controlada parenterales (ambos sistemas conducen a una reducción múltiple en el número de administraciones) de tipos muy conocidos para aquellos expertos en la técnica, tales como sistemas de liberación sostenida y de liberación controlada para administración subcutánea. Algunos ejemplos de composiciones y sistemas de liberación controlada útiles son hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas y nanopartículas. Los métodos para producir sistemas de liberación controlada útiles para las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen procesos de cristalización, condensación, cocrystalización, precipitación, coprecipitación, emulsificación, dispersión, homogeneización a alta presión, encapsulación, secado por atomización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación de disolvente para producir microesferas, extrusión y fluidos supercríticos. Se hace una referencia general al *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release* (Wise, D. L., ed., Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y a *Drugs and the Pharmaceutical Sciences* vol. 99: *Protein Formulation and Delivery* (MacNally, E. J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000).

25 La administración parenteral se puede llevar a cabo mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, por ejemplo, una jeringa en un dispositivo de tipo pluma. De forma alternativa, la administración parenteral se puede llevar a cabo, por ejemplo, por medio de una bomba de infusión. Una opción adicional para la administración de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación en forma de disolución o suspensión es la administración como un aerosol nasal o pulmonar. Como otra opción, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden adaptar para administración transdérmica, p. ej., mediante inyección sin aguja, mediante aplicación de un parche (tal como un parche iontoforético) o mediante administración transmucosa (p. ej., bucal).

30 El término "tratar" en sus varias formas gramaticales en relación con la presente divulgación se refiere a curar, revertir, atenuar, aliviar, mejorar, inhibir, minimizar, suprimir o frenar (1) los efectos perjudiciales de una alteración, (2) progresión de una alteración o (3) factor causante de una alteración. En el contexto de la presente divulgación una "cantidad eficaz" de una composición farmacéutica se define como la cantidad de una composición farmacéutica, p. ej., Factor XIII, que es suficiente para prevenir, curar, revertir, atenuar, aliviar, mejorar, inhibir, minimizar, suprimir o frenar (1) los efectos perjudiciales de una alteración, (2) progresión de una alteración o (3) factor causante de una alteración, sola o combinada con otros agentes terapéuticos administrados.

40 Se ha descrito que el Factor XIII se puede utilizar para tratar o prevenir episodios de sangrado en pacientes que tienen una deficiencia congénita de Factor XIII, así como en pacientes que no tienen una deficiencia congénita de Factor XIII, remítase a, por ejemplo, los documentos US 5 114 916, US 5 607 917, WO 2002038167, WO 2002036155, WO 200267981 y WO 200267980.

45 La presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir episodios de sangrado, donde dicho método comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente divulgación, que comprende un FXIII, a un sujeto que lo necesite. En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para reducir el tiempo de coagulación en un sujeto, donde el método comprende la administración de la composición farmacéutica de la presente divulgación a un sujeto que lo necesite. En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para prolongar el tiempo de coagulación en el plasma de mamíferos, donde el método comprende la administración de la composición farmacéutica de la presente divulgación a un sujeto que lo necesite. En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para aumentar la fuerza del coágulo en plasma de mamíferos, donde el método comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente divulgación a un sujeto que lo necesite. En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para potenciar la formación de coágulos de fibrina en plasma de mamíferos, donde el método comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente divulgación a un sujeto que lo necesite. En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para la prevención de hemorragia intraventricular en niños prematuros, donde el método comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente divulgación a un sujeto que lo necesite. En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para reducir las pérdidas de sangre relacionadas con la cirugía en un sujeto durante o tras la cirugía, donde el método comprende la

administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente divulgación a un sujeto que lo necesite. En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para tratar la hemofilia A, donde el método comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente divulgación a un sujeto que lo necesite. En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para tratar la hemofilia B, donde el método comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente divulgación a un sujeto que lo necesite. En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para tratar alteraciones plaquetarias, donde el método comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente divulgación a un sujeto que lo necesite. En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método para tratar la enfermedad de von Willebrand, donde el método comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente divulgación a un sujeto que lo necesite. La composición farmacéutica de la presente divulgación, cuando comprende Factor XIII, es útil además en la aplicación local o sistémica para tratar afecciones que incluyen cicatrización de huesos o heridas, colitis ulcerosa, escleroderma, púrpura de Schönlein-Henoch, hemorragia subaracnoidea, sangrado intraventricular y sangrados por razones desconocidas.

En un aspecto adicional de estos métodos, la composición farmacéutica de la presente divulgación, p. ej. que comprende FXIII, se administra combinada con una cantidad eficaz de un factor VIIa según se describe en el documento WO 200185198.

En algunos aspectos, la composición farmacéutica de la presente divulgación es el único agente activo administrado al sujeto para el tratamiento indicado.

En un aspecto, el sujeto que se ha de tratar es un ser humano; en un aspecto, el sujeto tiene una producción de trombina deficiente; en un aspecto, el sujeto tiene una concentración de fibrinógeno en plasma reducida (p. ej., en el caso de un sujeto multitransfundido).

La presente invención, descrita generalmente de este modo, se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se proporcionan a modo ilustrativo.

EJEMPLOS

Para desarrollar las composiciones de la presente invención, se estudiaron varias composiciones, junto con sus efectos en la subsiguiente estabilidad de las composiciones durante el almacenamiento.

Ejemplo 1: Liofilización y reconstitución de Factor XIII

Los experimentos de criodesecación se llevaron a cabo en liofilizadores que se pueden adquirir de distribuidores comerciales. Las disoluciones de Factor XIII recombinante, preparado mediante expresión en células de levadura, junto con componentes adicionales, se secaron de acuerdo con un programa de criodesecación adecuado. Los productos liofilizados se reconstituyeron a continuación utilizando agua destilada.

Ejemplo 2: Estabilidad de las composiciones de Factor XIII anhidras

Se preparó una serie de composiciones de rFXIII anhidras mediante liofilización, de acuerdo con el Ejemplo 1, y se les realizó un estudio de estabilidad donde se midió la pureza mediante AIE-HPLC y se midieron los agregados mediante SEC-HPLC. Este estudio investigó tres niveles de NaCl incluidos en la disolución de llenado acuosa, NaCl 0 mM, 12.5 mM y 25 mM, y cuatro niveles de sacarosa según se proporcionan en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3: Composiciones estudiadas en presencia y en ausencia de NaCl

	Disolución de llenado DP utilizada para la indicación de CD	Composiciones estudiadas			
		Proporción 1	Proporción 2	Proporción 3	Proporción 4
rFXIII, mg/mL	2.5	5.0	5.0	5.0	5.0
Sacarosa, mg/mL	42.5	80	40	20	0
Histidina, mM	20	20	20	20	20
Polisorbato 20	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%
Proporción de sacarosa respecto a proteína	17	16	8	4	0

Tabla 4: Contenido de sacarosa y NaCl

Nombre del exp.	Sacarosa	NaCl
N1	0	0
N2	20	0
N3	40	0
N4	80	0
N5	0	25
N6	20	25
N7	40	25
N8	80	25
N9	0	12.5
N10	0	12.5
N11	0	12.5
N12	0	12.5

Tabla 5: Tabla de resultados

N.º	Pureza mediante AIE- 0	Pureza mediante AIE 1M40	% agreg. mediante SEC 0	% agreg. mediante SEC M40	% agreg. mediante SEC M40	Pureza mediante AIE 2M40	% agreg. mediante SEC 3M40	% agreg. mediante SEC 3M25
N1	3.87	3.95	0.2	0.6	0.9	61	1	0.5
N2	74.75	65.87	0.05	0.1	0.1	61	0.1	0.1
N3	74.48	66.47	0.05	0.1	0.1	64.4	0.1	0.1
N4	74.75	69.74	0.1	0.1	0.1	66.2	0.1	0.1
N5	73.39	71.67	4.1	1.6	1.8	66.9	2.3	1.9
N6	75.11	72.42	0.1	0.1	0.1	68.5	0.1	0.1
N7	75.13	72.32	0.1	0.1	0.1	68.9	0.1	0.1
N8	74.05	72.61	0.1	0.1	0.1	69.5	0.1	0.1
N9	72.63	69.14	1.8	1.3	1.5	65.8	1.6	1.2
N10	72.33	69.57	1.7	1.4	1.4	66.6	1.5	1.2
N11	72.79	69.71	1.7	1.2	1.5	65.7	1.7	1.2
N12	72.74	69.05	1.7	1.4	1.5	66.8	1.3	1.2

5 Los resultados presentados en la Tabla 5 y en la Figura 1 demuestran que existe una relación estadísticamente significativa entre el NaCl y la pureza mediante AIE-HPLC para las muestras almacenadas a 40 °C. No hay ningún efecto en la pureza inicial de las muestras. Por lo tanto, se concluye que el NaCl actúa específicamente en el estado anhidro, es decir, la composición anhidra, con lo cual mejora significativamente la estabilidad de almacenamiento de las composiciones de rFXIII anhidras.

Ejemplo 3: Estudio factorial completo

10 El propósito del estudio era realizar un experimento de reconocimiento preliminar en formulaciones liofilizadas de rFXIII para investigar los efectos de la histidina y el cloruro sódico en la formación de rFXIIIa⁹ tras la liofilización. Se utilizó un diseño de experimento factorial completo para evaluar la concentración de histidina en el intervalo de 20-60 mM y la concentración de NaCl en el intervalo de 0-50 mM en composiciones de rFXIII secas.

15

Tabla 6: Factores experimentales

N.º	NaCl	Histidina
N1	0	20
N2	25	20
N3	50	20
N4	0	40
N5	25	40
N6	50	40
N7	0	60
N8	25	60
N9	50	60
N10	25	40
N11	25	40
N12	25	40

Tabla 7: Tabla de resultados

N.º	% act inicial	% act 2M25	Pureza mediante AIE 2M25	SEC 2M25	% act 1M40	% act 4M25
N1	0.4	1.1	67.4	0.1	2.6	1.8
N2	0.4	0.7	70.3	0.1	1.6	1.2
N3	0.4	0.7	71	0.1	1.5	1.1
N4	0.4	1.1	67.8	0.1	2.3	2
N5	0.5	0.8	70.3	0.2	1.8	1.2
N6	0.4	0.7	71	0.2	1.3	1
N7	0.4	1.2	68.4	0.1	2.3	2
N8	0.4	0.9	70.3	0.2	1.6	1.3
N9	0.5	0.8	70.8	0.2	1.3	1
N10	0.6	0.9	70.5	0.1	1.7	1.2
N11	0.4	1	70.2	0.1	1.7	1.3
N12	0.4	0.8	70.2	0.5	1.5	1.1
N.º	Pureza mediante AIE 4M25	SEC 4M25	% act 6M25	SEC 6M25	Pureza mediante AIE 6M25	Pureza mediante AIE inicial
N1	65.1	0.1	2.2	0.1	63.5	72.1
N2	69.2	0.1	1.4	0.1	68	72.4
N3	70.2	0.1	1.1	0.1	69.5	72.3
N4	66	0.1	2.2	0.1	64.6	71.8
N5	69	0.2	1.4	0.2	68.3	72.1
N6	70	0.2	1.1			72.2
N7	67.1	0.1	2	0.1	65.3	71.9
N8	69.8	0.2	1.5	0.2	68.6	72.2
N9	70	0.2	1.3	0.2	69.6	72.3

N.º	% act inicial	% act 2M25	Pureza mediante AIE 2M25	SEC 2M25	% act 1M40	% act 4M25
N10	69.5	0.1	1.3	0.1	68.9	72.3
N11	69.6	0.1	1.4	0.1	69	72.3
N12	69.2	0.1	1.4	0.1	68.9	72.3

5 Los resultados presentados en la Tabla 7 y en las Figuras 2 y 3 demuestran que la inclusión de NaCl tiene un efecto estabilizante significativo en la pureza y en la formación de rFXIIIa° para muestras almacenadas a 40 °C y 25 °C durante 1 y 2 meses, respectivamente. La inclusión de NaCl no tiene un efecto significativo en las muestras en el momento inicial. Los niveles de NaCl e histidina estudiados en la presente no tienen efectos significativos en los niveles de agregación mediante SE-HPLC tras 2 meses a 25 °C. Este estudio muestra que incluir NaCl en la composición de rFXIII anhidra mejora significativamente la estabilidad de almacenamiento de la composición respecto al % de pureza y % de rFXIIIa°.

Ejemplo 4: Estudio de reconstitución

10 Este experimento se llevó a cabo para verificar que el efecto estabilizante del NaCl es específico para el estado anhidro, es decir, la composición anhidra. En este experimento se reconstituyó un vial de composición de rFXIII liofilizada con agua, a continuación, se dividió en dos volúmenes iguales a cada uno de los cuales se añadió NaCl. Las disoluciones se almacenaron a temperatura ambiente durante 24 horas y a continuación se analizaron en busca de rFXIIIa°. Se evaluaron tres concentraciones de NaCl. El diseño experimental se plasma en la Tabla 8.

15 **Tabla 8:** Diseño experimental – Efecto del NaCl en la formación de rFXIIIa° en disolución

Vial de 12 mL que contiene el producto farmacológico de rFXIII en polvo					
Vial #1. Reconstituir con 2.5mL de agua		Vial #2. Reconstituir con 2.5mL de agua		Vial #3. Reconstituir con 2.5mL de agua	
NaCl 0 mM	NaCl 25 mM	NaCl 0 mM	NaCl 50 mM	NaCl 0 mM	NaCl 75 mM
Almacenar la disolución a temperatura ambiente durante 24 horas, a continuación analizar		Almacenar la disolución a temperatura ambiente durante 24 horas, a continuación analizar		Almacenar la disolución a temperatura ambiente durante 24 horas, a continuación analizar	

Tabla 9 Resultados de potencia del estudio de reconstitución con NaCl

Identificación de la muestra	Concentración de NaCl (mM)	rFXIII total (IU/mL)	rFXIIIa (IU/mL)	% rFXIIIa (Analizado 24 horas tras la reconstitución)
1a	0	957	5.0	0.5
1b	25	854	5.6	0.7
2a	0	889	4.4	0.5
2b	50	887	5.1	0.6
3a	0	990	4.1	0.4
3b	75	837	5.7	0.7

20 Los resultados presentados en la Tabla 9 muestran que las muestras que contienen NaCl tienen valores de rFXIIIa° ligeramente más altos tras 24 horas que las respectivas disoluciones de comparación que no contienen NaCl. Estos resultados demuestran que, en el intervalo de concentración 25-75 mM, el NaCl en la composición acuosa no tiene un efecto estabilizante en cuanto a la formación de rFXIIIa°. Se concluye que el efecto estabilizante del NaCl en la composición de rFXIII liofilizada, demostrado por los datos de los anteriores Ejemplos, es específico para el estado anhidro (composición anhidra). Este efecto es sorprendente y hasta ahora desconocido.

ENSAYOS

25 **Ensayo (I): Método para medir FXIIIa°**

Para estudiar los efectos de la liofilización en la cantidad de FXIIIa°, se puede analizar el Factor XIII recombinante purificado mediante un ensayo de actividad enzimática de FXIII, donde la actividad de FXIIIa° se mide comparando la actividad de una alícuota de una mezcla sin activación de trombina inicial, con la de otra alícuota de la misma

muestra a la que se ha añadido trombina. El % de FXIIIa° se calcula como $100 \cdot [\text{actividad de la muestra sin trombina}] / [\text{actividad de la muestra con trombina}]$.

Ensayo (II): Método para medir la pureza de FXIII

5 Para estudiar los efectos de la liofilización en la pureza de FXIII, se puede analizar el FXIII recombinante purificado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico (AIE-HPLC).

Ensayo (III): Método para medir la actividad de FXIII

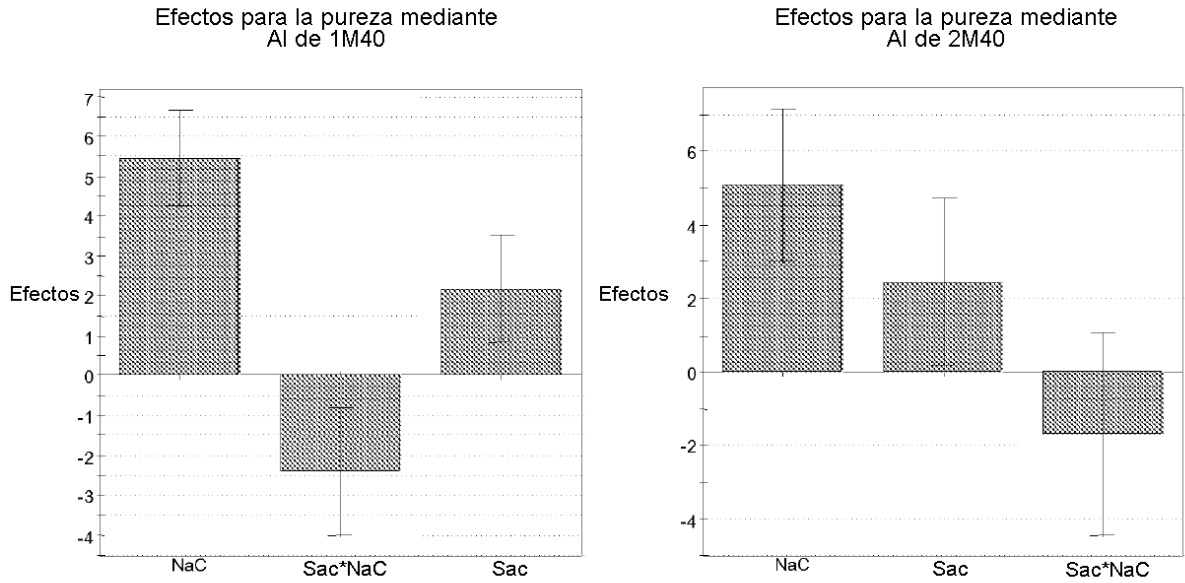
Los métodos para medir la actividad de entrecruzamiento de FXIII son muy conocidos en la técnica. La actividad de FXIII se puede medir utilizando kits que se pueden adquirir de distribuidores comerciales, tales como el kit de prueba Berichrom FXIIIR.

10 **Ensayo (IV): Método para medir el contenido de humedad**

Para estudiar el contenido de humedad de la composición de transglutaminasa anhidra, p. ej., FXIII, se puede utilizar la valoración de Karl Fischer.

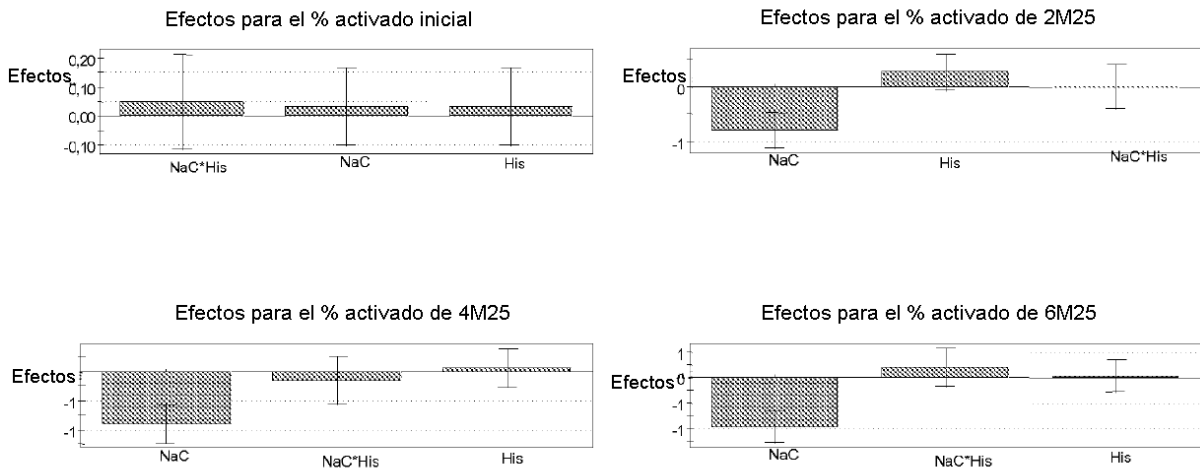
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de Factor XIII anhidra, dicha composición se puede obtener liofilizando una composición acuosa que comprende un compuesto de Factor XIII, una sal de cloruro sódico y al menos un componente adicional seleccionado del grupo compuesto por un azúcar, un aminoácido y un tampón, donde la concentración de sal de cloruro sódico en la composición acuosa está en el intervalo de 10 a 75 mM y donde el compuesto de Factor XIII es un compuesto de Factor XIII recombinante.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto de Factor XIII es un Factor XIII humano.
- 10 3. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la composición está en forma de polvo.



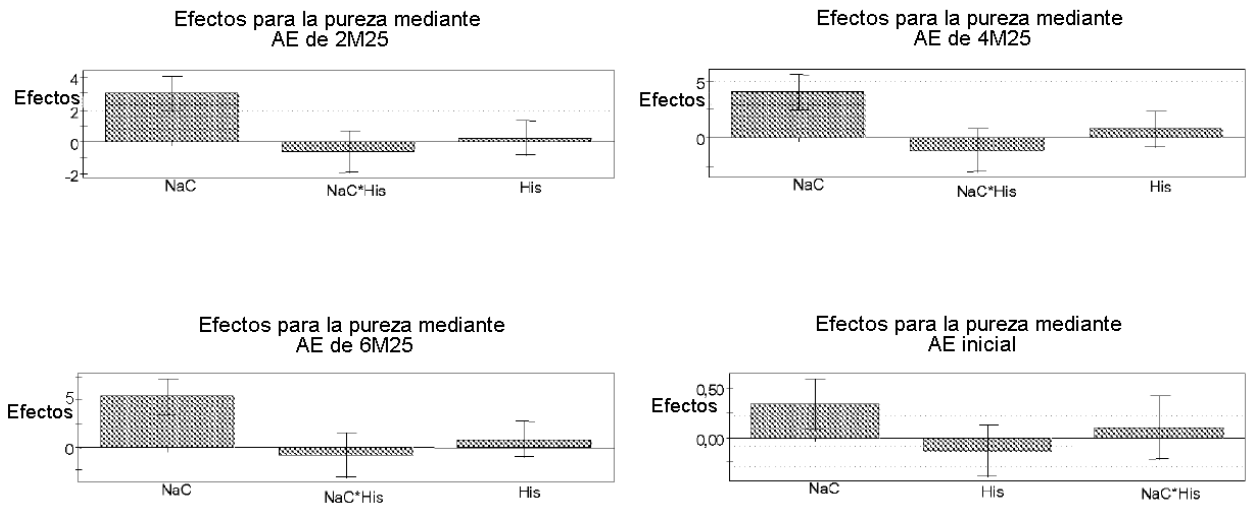
Evaluación de los niveles de sacarosa y NaCl. Análisis Modde del efecto de NaCl 25 mM en la pureza mediante AIE-HPLC de muestras almacenadas a 40 °C.

FIG. 1



Estudio factorial completo de los niveles de NaCl e histidina. Análisis Modde de los datos de rFXIIIa^o a 25 °C.

FIG. 2



**Estudio factorial completo de los niveles de NaCl e histidina.
Análisis Modde de los datos de pureza mediante AIE-HPLC.**

FIG. 3