

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 296**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19	(2006.01)
A61K 47/02	(2006.01)
A61K 47/10	(2007.01)
A61K 47/18	(2007.01)
A61K 47/20	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)
A61K 38/37	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2009 PCT/US2009/063610**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2010 WO10054238**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2009 E 09756369 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2385825**

54 Título: **Formulaciones de Factor VIII**

30 Prioridad:

07.11.2008 US 112513 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.03.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF CONNECTICUT (33.3%)
263 Farmington Avenue
Farmington, CT 06030, US;
BAXALTA INCORPORATED (33.3%) y
BAXALTA GMBH (33.3%)**

72 Inventor/es:

**PIKAL, MICHAEL;
TCHESALOV, SERGUEI;
BJORNSON, ERIK;
JAMEEL, FEROZ y
BESMAN, MARC**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 706 296 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

Formulaciones de Factor VIII

5 Campo de la invención

Generalmente, la invención se refiere a una composición de Factor VIII formulada de manera que el NaCl no está presente en la formulación final o está presente en cantidades trazas, lo que permite una reducción concomitante en el tiempo del ciclo de liofilización y un aumento de la estabilidad del Factor VIII liofilizado.

10

Antecedentes de la invención

15

El Factor VIII (FVIII) es una proteína que se encuentra en el plasma sanguíneo, que actúa como un cofactor en la cascada de reacciones que conduce a la coagulación de la sangre. Una deficiencia en la cantidad de actividad de FVIII en la sangre da como resultado el trastorno de la coagulación conocido como hemofilia A, una afección hereditaria que afecta principalmente a los varones. La hemofilia A se trata en la actualidad con preparaciones terapéuticas de FVIII derivado de plasma humano o fabricado con el uso de tecnología de ADN recombinante. Tales preparaciones se administran ya sea en respuesta a un episodio de hemorragia (terapia a demanda) o a intervalos regulares frecuentes, para prevenir la hemorragia incontrolada (profilaxis).

20

Se conoce que el FVIII es relativamente inestable en preparaciones terapéuticas. En el plasma sanguíneo, el FVIII normalmente forma complejo con otra proteína plasmática, el factor de von Willebrand (vWF), que está presente en plasma en un exceso molar grande respecto al FVIII y se cree que protege al FVIII de la degradación prematura. Otra proteína plasmática circulante, la albúmina, también puede desempeñar un papel en la estabilización de FVIII *in vivo*. Por lo tanto las preparaciones de FVIII comercializadas en la actualidad se basan principalmente en el uso de albúmina y/o vWF para estabilizar el FVIII durante el proceso de fabricación y durante el almacenamiento.

25

30

La albúmina y el vWF usados en las preparaciones de FVIII comercializadas en la actualidad se derivan de plasma sanguíneo humano, sin embargo, el uso de este material tiene ciertos inconvenientes. Debido a que generalmente se añade un exceso molar grande de albúmina en comparación con FVIII para aumentar la estabilidad del FVIII en tales preparaciones, es difícil caracterizar la proteína FVIII en sí en estas preparaciones. La adición de albúmina de origen humano a FVIII también se percibe como una desventaja con respecto a las preparaciones de FVIII producidas de manera recombinante. Esto se debe a que, en ausencia de esta albúmina añadida, el riesgo teórico de transmisión de un virus se reducirá en las preparaciones de FVIII de origen recombinante.

35

40

Se han descrito varios intentos para formular FVIII sin albúmina o vWF (o con niveles relativamente bajos de estos excipientes). Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,565,427 (EP 508 194) concedida a Freudenberg (asignada a Behringwerke) describe preparaciones de FVIII que contienen combinaciones particulares de detergente y aminoácidos, específicamente arginina y glicina, además de excipientes tales como cloruro de sodio y sacarosa. El detergente, polisorbato 20 o polisorbato 80, se describe como presente en cantidades de entre 0,001 a 0,5 % (v/v), mientras que arginina y glicina están presentes en cantidades de entre 0,01 a 1 mol/l. La sacarosa se describe como presente en cantidades de entre 0,1 y 10 %. El Ejemplo 2 de esta patente afirma que las soluciones de (1) 0,75 % de sacarosa, 0,4 M de glicina, y 0,15 M de NaCl, y (2) 0,01 M de citrato de sodio, 0,08 M de glicina, 0,016 M de lisina, 0,0025 M de cloruro de calcio, y 0,4 M de cloruro de sodio no eran estables en solución por más de 16 horas, mientras que las soluciones de (3) 1 % de sacarosa, 0,14 M de arginina, 0,1 M de cloruro de sodio y (4) 1 % de sacarosa, 0,4 M de glicina, 0,14 M de arginina, 0,1 M de cloruro de sodio, y 0,05 % de TWEEN™. 80 (polisorbato 80) exhibieron estabilidad.

45

50

La patente de los Estados Unidos núm. 5,763,401 (EP 818 204) concedida a Nayer (asignada a Bayer) también describe una formulación terapéutica de FVIII sin albúmina, que comprende 15-60 mM de sacarosa, hasta 50 mM de NaCl, hasta 5 mM de cloruro de calcio, 65-400 mM de glicina, y hasta 50 mM de histidina. Las siguientes formulaciones específicas se identificaron como supuestamente estables: (1) 150 mM de NaCl, 2,5 mM de cloruro de calcio, y 165 mM de manitol; y (2) 1 % de sacarosa, 30 mM de cloruro de sodio, 2,5 mM de cloruro de calcio, 20 mM de histidina, y 290 mM de glicina. Se encontró que una formulación que contiene cantidades más altas de azúcar (10 % de maltosa, 50 mM de NaCl, 2,5 mM de cloruro de calcio, y 5 mM de histidina) exhibe supuestamente poca estabilidad en el estado liofilizado en comparación con la formulación (2).

55

60

La patente de los Estados Unidos núm. 5,733,873 (EP 627 924) concedida a Osterberg (asignada a Pharmacia & Upjohn) describe formulaciones que incluyen entre 0,01-1 mg/ml de un surfactante. Esta patente describe formulaciones que tienen los siguientes intervalos de excipientes: polisorbato 20 o 80 en una cantidad de al menos 0,01 mg/ml, preferentemente 0,02 - 1,0 mg/ml; al menos 0,1 M de NaCl; al menos 0,5 mM de sal de calcio; y al menos 1 mM de histidina. Más particularmente, se describen las siguientes formulaciones específicas: (1) 14,7, 50, y 65 mM de histidina, 0,31 y 0,6 M de NaCl, 4 mM de cloruro de calcio, 0,001, 0,02, y 0,025 % de polisorbato 80, con o sin 0,1 % de PEG 4000 o 19,9 mM de sacarosa; y (2) 20 mg/ml de manitol, 2,67 mg/ml de histidina, 18 mg/ml de NaCl, 3,7 mM de cloruro de calcio, y 0,23 mg/ml de polisorbato 80.

65

5 Se han descrito además otros intentos para usar concentraciones bajas o altas de cloruro de sodio. La patente de los Estados Unidos núm. 4,877,608 (EP 315 968) concedida a Lee (asignada a Rhone-Poulenc Rorer) describe formulaciones con concentraciones relativamente bajas de cloruro de sodio, específicamente formulaciones que comprenden 0,5 mM a 15 mM de NaCl, 5 mM de cloruro de calcio, 0,2 mM a 5 mM de histidina, 0,01 a 10 mM de clorhidrato de lisina y hasta 10 % de azúcar. El "azúcar" puede ser hasta 10 % de maltosa, 10 % de sacarosa, o 5 % de manitol.

10 La patente de los Estados Unidos núm. 5,605,884 (EP 0 314 095) concedida a Lee (asignada a Rhone-Poulenc Rorer) enseña el uso de formulaciones con concentraciones relativamente altas de cloruro de sodio. Estas formulaciones incluyen 0,35 M a 1,2 M de NaCl, 1,5 a 40 mM de cloruro de calcio, 1 mM a 50 mM de histidina, y hasta 10 % de un "azúcar" tal como manitol, sacarosa, o maltosa. Se pone como ejemplo una formulación que comprende 0,45 M de NaCl, 2,3 mM de cloruro de calcio, y 1,4 mM de histidina.

15 La Solicitud de patente internacional WO 96/22107 concedida a Roser (asignada a Quadrant Holdings Cambridge Limited) describe formulaciones que incluyen el azúcar trehalosa. Estas formulaciones comprenden: (1) 0,1 M de NaCl, 15 mM de cloruro de calcio, 15 mM de histidina, y 1,27 M (48 %) de trehalosa; o (2) 0,011 % de cloruro de calcio, 0,12 % de histidina, 0,002 % de Tris, 0,002 % de TWEEN™. 80, 0,004 % de PEG 3350, 7,5 % de trehalosa, y 0,13 % o 1,03 % de NaCl.

20 La patente de los Estados Unidos núm. 5,328,694 (EP 511 234) concedida a Schwinn (asignada a Octapharma AG) describe una formulación que incluye 100 a 650 mM de disacárido y 100 mM - 1,0 M de aminoácido. Específicamente, se describen las siguientes formulaciones: (1) 0,9 M de sacarosa, 0,25 M de glicina, 0,25 M de lisina, y 3 mM de cloruro de calcio; y (2) 0,7 M de sacarosa, 0,5 M de glicina, y 5 mM de cloruro de calcio. La Solicitud de patente internacional WO 00/48635 describe una formulación liofilizada obtenida a partir de una solución que comprende Factor VIII, 4-10 %
25 de un agente de relleno, 1-4 % de un agente estabilizante, 1-5 mM de sal de calcio, 100-300 mM de NaCl, un agente tamponante para mantener un pH de aproximadamente entre 6 y 8, menos de 0,1 % de un surfactante y un antioxidante.

30 Otras formulaciones terapéuticas de FVIII del estado de la técnica generalmente incluyen albúmina y/o vWF para el propósito de estabilizar FVIII y por lo tanto no son relevantes para la presente descripción. Aunque existe una amplia literatura enfocada en los problemas de formulación y de desarrollo de procesos con los productos secados por congelación, los estudios de FVIII secado por congelación se limitan al estudio de formulaciones basadas en el uso de NaCl como agente de relleno

35 Una complicación importante en el desarrollo de la formulación es la presencia de cloruro de sodio en la sustancia farmacéutica a granel, que generalmente se introduce en el proceso de purificación. Como resultado del proceso de purificación, cantidades de cloruro de sodio grandes y/o variables están presentes en la solución de sustancia farmacéutica a granel. El cloruro de sodio sin cristalizar reduce la temperatura de colapso y puede dejar el producto incapaz de fabricarse en nada que asemeje un producto elegante. Además, el cloruro de sodio amorfo puede comprometer la estabilidad del producto. La presente descripción involucra a formulaciones para secar por congelación
40 en donde el NaCl se elimina o está presente en cantidades trazas, que son capaces de mantener el FVIII almacenado establemente durante períodos de tiempo prolongados.

45 Breve descripción de la invención

Las composiciones de FVIII de la presente descripción, en una modalidad, se formulan de manera que el NaCl no está presente en la formulación final o está presente en cantidades trazas, lo que permite una reducción concomitante en el tiempo del ciclo de liofilización y el aumento de la estabilidad del FVIII liofilizado.

50 En una modalidad, una formulación farmacéutica liofilizada estable de Factor VIII (FVIII) comprende: (a) un FVIII; (b) uno o más agentes tamponantes; (c) uno o más antioxidantes; (d) uno o más agentes estabilizantes; y (e) uno o más surfactantes; en donde la formulación se prepara mediante la liofilización de una solución que comprende

- 55 (a) dicho FVIII que comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: a) un polipéptido FVIII recombinante; b) un análogo, fragmento o variante de a) biológicamente activo;
- (b) dicho tampón que comprende un agente tamponante de pH en un intervalo de 0,1 mM a 500 mM y que mantiene un pH en un intervalo de 2,0 a 12,0; 1
- (c) dicho antioxidante a una concentración de 0,005 a 1,0 mg/ml;
- (d) dicho agente estabilizante a una concentración de 0,005 a 20 %;
- 60 (e) dicho surfactante a una concentración de 0,001 % a 1,0 %; y dicha formulación excluye cloruro de sodio (NaCl) o incluye solamente una cantidad traza de NaCl.

65 En otra modalidad, se proporciona una formulación mencionada anteriormente en donde el agente tamponante se selecciona del grupo que consiste en citrato, glicina, histidina, HEPES, Tris y combinaciones de estos agentes. En una modalidad, el agente tamponante es histidina.

En otra modalidad, se proporciona una formulación mencionada anteriormente en donde el pH está en el intervalo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0 o aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5. Aún en otra modalidad, el agente tamponante es histidina y el pH es aproximadamente 7,0.

5 En una modalidad, se proporciona una formulación mencionada anteriormente en donde el antioxidante es glutatión. Aún en otra modalidad, el antioxidante está a un intervalo de concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 mg/ml. Aún en otra modalidad, el antioxidante es glutatión a una concentración de aproximadamente 0,2 mg/ml. Aún en otra modalidad, el agente tamponante es histidina y el pH es aproximadamente 7,0; y en donde el antioxidante es glutatión a una concentración de aproximadamente 0,2 mg/ml.

10 En otra modalidad, se proporciona una formulación mencionada anteriormente en donde el uno o más agentes estabilizantes se seleccionan del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, y rafinosa, y combinaciones de estos agentes estabilizantes. En una modalidad, los agentes estabilizantes son trehalosa a una concentración de aproximadamente 5 % y cloruro de calcio a una concentración de aproximadamente 4 mM. Aún en otra modalidad, los agentes estabilizantes son sacarosa a una concentración de aproximadamente 5 % y cloruro de calcio a una concentración de aproximadamente 4 mM.

20 En una modalidad, se proporciona una formulación mencionada anteriormente en donde el surfactante se selecciona del grupo que consiste en digitonina, Tritón X-100, Tritón X-114, TWEEN-20, TWEEN-80 y combinaciones de estos surfactantes. Aún en otra modalidad, el surfactante es TWEEN-80 a aproximadamente 0,03 %.

25 En una modalidad, se proporciona una formulación mencionada anteriormente en donde el agente tamponante es histidina a una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente pH 7,0; en donde el antioxidante es glutatión a una concentración de aproximadamente 0,2 mg/ml; en donde los agentes estabilizantes son trehalosa o sacarosa a una concentración de aproximadamente 5 % y cloruro de calcio a una concentración de aproximadamente 4 mM.; y en donde el surfactante es TWEEN-80 a aproximadamente 0,03 %.

30 Aún en otra modalidad, se proporciona una formulación mencionada anteriormente en donde el NaCl no se añade como excipiente. Aún en otra modalidad, el NaCl está presente en una cantidad traza después de la eliminación por diálisis o cromatografía de intercambio de solvente.

35 En la presente descripción se proporcionan métodos para preparar un FVIII liofilizado, estable. En una modalidad, se proporciona un método para preparar un FVIII liofilizado, estable que comprende las etapas de (a) preparar una formulación mencionada anteriormente; y (b) liofilizar la formulación de la etapa (a). Aún en otra modalidad, se proporciona el método mencionado anteriormente en donde la estabilidad del FVIII liofilizado es mayor en comparación con una formulación de FVIII que se liofiliza en presencia de cloruro de sodio.

40 En otra modalidad, se proporciona una formulación farmacéutica liofilizada estable de FVIII que comprende: (a) un FVIII; (b) uno o más agentes tamponantes; (c) uno o más antioxidantes; (d) uno o más agentes estabilizantes; y (e) uno o más surfactantes; el FVIII que comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: a) un polipéptido FVIII recombinante; b) un análogo, fragmento o variante de a) biológicamente activo; el tampón que comprende un agente tamponante de pH en un intervalo de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 500 mM y el pH está en un intervalo de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 12,0; el antioxidante está a una concentración de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1,0 mg/ml; el agente estabilizante está a una concentración de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 20 %; y el surfactante está a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 1,0 %.

Breve descripción de las figuras

50 Figura 1. Pérdida de FVIII durante la formulación y el secado por congelación. Las barras de error son el error estándar calculado a partir de determinaciones replicadas

Figura 2. Estabilidad de almacenamiento de rAHF secado por congelación en formulaciones basadas en manitol/trehalosa (Figura 2A) y glicina/trehalosa (Figura 2B) y cinética de raíz cuadrada del tiempo.

55 Figura 3. Constantes de velocidad para la degradación de rAHF secado por congelación en formulaciones seleccionadas: Estudio de tamizaje de formulaciones.

60 Figura 4. Los efectos de glutatión, histidina, y Hepes sobre la estabilidad de formulaciones basadas en Glicina: Trehalosa: Pérdida de actividad en el proceso y pérdida de actividad durante 9 meses de almacenamiento a 25 °C. La formulación "Básica" es: rAHF (103 IU/ml), glicina (8 %), trehalosa (2 %), NaCl (200 mM), 10 mM de Tris, 0,025 % de polisorbato 80, 4 mM de CaCl₂, a pH 7. Las otras formulaciones consisten en la formulación "Básica" a la que se ha añadido glutatión (0,2 g/L) y tampón Hepes (10 mM), tampón de histidina (50 mM), o el agente acomplejante de hierro Deferoxamina (0,25 mg/L). El proceso usado fue esencialmente el mismo que se proporciona en la Tabla 5.

65 Figura 5. Constantes de velocidad de degradación de rAHF secado por congelación. Los detalles de las formulaciones y los procesos se proporcionan en las Tablas 5 y 6. La constante de velocidad es a partir de la cinética de raíz cuadrada

del tiempo con el tiempo en meses. Las barras de error representan los errores estándar proporcionados por el análisis de regresión.

Descripción detallada de la invención
Definiciones

Como se usa en la presente descripción, los términos más abajo y las variaciones de estos se definen de la siguiente manera, a menos que se indique de otro modo:

A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan al experto una definición general de muchos de los términos usados en esta descripción: Singleton, y otros, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* (2da ed. 1994); *THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY* (Walker ed., 1988); *THE GLOSSARY OF GENETICS*, 5TA ED., R. Rieger, y otros (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY* (1991).

Cabe señalar aquí que, como se usa en esta descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Como se usa en la presente, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a éstos, a menos que se especifique lo contrario.

El término "que comprende," con respecto a un compuesto peptídico, significa que un compuesto puede incluir aminoácidos adicionales en cualquiera o en ambos extremos amino y carboxilo terminales de la secuencia dada. Por supuesto, estos aminoácidos adicionales no deben interferir significativamente con la actividad del compuesto. Con respecto a una composición de la presente descripción, el término "que comprende" significa que una composición puede incluir componentes adicionales. Estos componentes adicionales no deben interferir significativamente con la actividad de la composición. "Que comprende" como se refiere a formulaciones de FVIII excluye totalmente el cloruro de sodio (NaCl), o incluye NaCl solamente en cantidades trazas.

El término "farmacológicamente activo" significa que se determina que una sustancia así descrita tiene una actividad que afecta un parámetro médico o un estado patológico.

Como se usa en la presente descripción los términos "expresar," "que expresa" y "expresión" significan permitir o provocar que la información en un gen o secuencia de ADN se manifieste, por ejemplo, producir una proteína mediante la activación de las funciones celulares involucradas en la transcripción y traducción de un gen o secuencia de ADN correspondiente. Una secuencia de ADN se expresa en o por una célula para formar un "producto de expresión" tal como una proteína. El producto de expresión en sí, por ejemplo la proteína resultante, también puede llamarse "expresada." Un producto de expresión puede caracterizarse como intracelular, extracelular o secretado. El término "intracelular" significa en el interior de una célula. El término "extracelular" significa en el exterior de una célula, tal como una proteína transmembrana. Una sustancia se "secretada" por una célula si aparece en una medida significativa en el exterior de la célula, desde un lugar en o del interior de la célula.

Como se usa en la presente descripción un "polipéptido" se refiere a un polímero compuesto de residuos de aminoácidos, variantes estructurales, variantes estructurales relacionadas de origen natural, y análogos sintéticos de estos de origen no natural unidos por medio de enlaces peptídicos. Los polipéptidos sintéticos se preparan, por ejemplo, con el uso de un sintetizador de polipéptidos automático. El término "proteína" típicamente se refiere a polipéptidos grandes. El término "péptido" típicamente se refiere a polipéptidos cortos.

Como se usa en la presente descripción un "fragmento" de un polipéptido se refiere a cualquier porción de un polipéptido o proteína más pequeño que el producto de expresión de polipéptido o proteína de longitud completa.

Como se usa en la presente descripción un "análogo" se refiere a cualquiera de dos o más polipéptidos sustancialmente similares en estructura y que tienen la misma actividad biológica, pero pueden tener grados variables de actividad, respecto a la molécula completa, o a un fragmento de esta. Los análogos difieren en la composición de sus secuencias de aminoácidos en base a una o más mutaciones que involucran la sustitución, delección, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos. Las sustituciones pueden ser conservadoras o no conservadoras en base a la relación físico-química o funcional del aminoácido reemplazado y el aminoácido que lo reemplaza.

Como se usa en la presente descripción una "variante" se refiere a un polipéptido, proteína o análogo de este que se modifica de modo que comprende porciones químicas adicionales que normalmente no son parte de la molécula. Tales porciones pueden modular la solubilidad de la molécula, su absorción, su vida media biológica, etc. Alternativamente las porciones pueden disminuir la toxicidad de la molécula y eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseado de la molécula, etc. Las porciones capaces de mediar tales efectos se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (1980). El procedimiento para acoplar tales porciones a una molécula se conocen bien en la materia. Por ejemplo y sin

limitación, en un aspecto la variante es un factor de coagulación de la sangre que tiene una modificación química que confiere a la proteína una vida media más larga in vivo. En varios aspectos, los polipéptidos se modifican por glicosilación, pegilación, y/o polisialilación.

5 FVIII

En la presente descripción, el término "Factor VIII" o "FVIII" o "rAHF" se refiere a cualquier molécula de FVIII que tiene al menos una porción del dominio B intacta, y que exhibe actividad biológica que se asocia con el FVIII nativo. En una modalidad de la descripción, la molécula de FVIII es el FVIII de longitud completa. La molécula de FVIII es una proteína codificada por secuencias de ADN capaces de hibridarse al ADN que codifica FVIII:C. Una proteína de este tipo puede contener deleciones de aminoácidos en varios sitios entre o dentro de los dominios A1-A2-B-A3-C1-C2 (patente de los Estados Unidos núm. 4,868,112). La molécula de FVIII también puede ser un análogo del FVIII nativo en donde uno o más residuos de aminoácidos se han reemplazado mediante mutagénesis sitio dirigida.

De acuerdo con la presente descripción, el término "Factor VIII recombinante" (rFVIII) puede incluir cualquier rFVIII, heterólogo o de origen natural, obtenido por medio de tecnología de ADN recombinante, o un derivado biológicamente activo de este. En ciertas modalidades, el término abarca proteínas como se describió anteriormente y ácidos nucleicos, que codifican un rFVIII de la descripción. Tales ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo y sin limitación, genes, pre-ARNm, ARNm, variantes polimórficas, alelos, mutantes sintéticos y de origen natural. Las proteínas abarcadas por el término rFVIII incluyen, por ejemplo y sin limitación, las proteínas y polipéptidos descritos anteriormente en la presente descripción, las proteínas codificadas por un ácido nucleico descrito anteriormente, homólogos interespecies y otros polipéptidos que: (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % o más identidad de secuencia de aminoácidos, en una región de al menos aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, o más aminoácidos (hasta la secuencia de longitud completa de 406 aminoácidos de la proteína nativa madura), con un polipéptido codificado por un ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos de referencia descritos en la presente descripción; y/o (2) se une específicamente a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales, generados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de referencia como se describe en la presente descripción, un fragmento inmunogénico de esta, y/o una variante de esta modificada de manera conservadora.

Como se usa en la presente descripción, "FVIII endógeno" incluye el FVIII que se origina del mamífero previsto para recibir tratamiento. El término incluye además el FVIII transcrito a partir de un transgén o cualquier otro ADN extraño presente en dicho mamífero. Como se usa en la presente descripción, "FVIII exógeno" incluye el FVIII que no se origina de dicho mamífero.

La molécula de FVIII existe naturalmente y en preparaciones terapéuticas como una distribución heterogénea de polipéptidos provenientes de un solo producto génico (ver, por ejemplo, Andersson y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2979 2983, Mayo 1986). El término "Factor VIII" como se usa en la presente descripción se refiere a todos estos polipéptidos, ya sean derivados de plasma sanguíneo o producidos a través del uso de técnicas de ADN recombinante e incluye, pero no se limita a miméticos de FVIII, conjugados fc-FVIII, FVIII modificado químicamente con polímeros solubles en agua y otras formas o derivados de FVIII. Los ejemplos disponibles en el mercado de preparaciones terapéuticas que contienen FVIII incluyen las vendidas bajo los nombres comerciales de HEMOFIL M y RECOMBINATE (comercializado por Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, Ill., Estados Unidos). Otras preparaciones comprenden principalmente una sola subpoblación de moléculas de FVIII, que carecen de la porción del dominio B de la molécula.

El material de partida de la presente descripción es FVIII, que puede derivarse de plasma humano, o producirse por técnicas de ingeniería recombinante, como se describe en las patentes patente de los Estados Unidos núm. 4,757,006; patente de los Estados Unidos núm. 5,733,873; patente de los Estados Unidos núm. 5,198,349; patente de los Estados Unidos núm. 5,250,421; patente de los Estados Unidos núm. 5,919,766; EP 306 968.

Las moléculas de FVIII útiles para la presente descripción incluyen la proteína de longitud completa, precursores de la proteína, subunidades o fragmentos biológicamente activos o funcionales de la proteína, y derivados funcionales de esta, así como variantes de esta como se describe en la presente descripción más abajo. La referencia a FVIII pretende incluir todas las formas potenciales de tales proteínas y en donde cada una de las formas de FVIII tiene al menos una porción o la totalidad de la secuencia del dominio B nativo intacta.

Los polinucleótidos que codifican un rFVIII de la descripción incluyen, sin limitación, aquellos que (1) se hibridan específicamente bajo condiciones de hibridación rigurosas a un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de referencia como se describe en la presente descripción, y variantes de esta modificadas de manera conservadora; (2) tienen una secuencia de ácido nucleico que tiene más de aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o más identidad de secuencia de nucleótidos, en una región de al menos aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 100,

aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 500, aproximadamente 1000, o más nucleótidos (hasta la secuencia de longitud completa de 1218 nucleótidos de la proteína madura), con una secuencia de ácido nucleico de referencia como se describe en la presente descripción.

5 Las variantes (o análogos) de polipéptidos incluyen variantes de inserción, en donde uno o más residuos de aminoácidos se añaden a una secuencia de aminoácidos de FVIII de la descripción. Las inserciones pueden localizarse en cualquiera o en ambos extremos terminales de la proteína, y/o pueden posicionarse dentro de regiones internas de la secuencia de aminoácidos de FVIII. Las variantes de inserción, con residuos adicionales en cualquiera o en ambos extremos terminales, incluyen por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen etiquetas de aminoácidos u otros marcadores de aminoácidos. En un aspecto, la molécula de FVIII puede contener opcionalmente una Met N-terminal, especialmente cuando la molécula se expresa de manera recombinante en una célula bacteriana tal como *E. coli*.

10 En las variantes de delección, se eliminan uno o más residuos de aminoácidos en un polipéptido FVIII como se describe en la presente descripción. Las delecciones pueden efectuarse en uno o ambos extremos terminales del polipéptido FVIII, y/o con eliminación de uno o más residuos dentro de la secuencia de aminoácidos de FVIII. Las variantes de delección, por lo tanto, incluyen todos los fragmentos de una secuencia de polipéptido FVIII.

15 En las variantes de sustitución, uno o más residuos de aminoácidos de un polipéptido FVIII se eliminan y se reemplazan con residuos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son de naturaleza conservadora y las sustituciones conservadoras de este tipo se conocen bien en la técnica. Alternativamente, la descripción también abarca sustituciones que son no conservadoras. Las sustituciones conservadoras ilustrativas se describen en Lehninger, [Biochemistry, 2da Edición; Worth Publishers, Inc., Nueva York (1975), pp.71-77] y se exponen inmediatamente más abajo.

20 Sustituciones conservadoras

CARACTERÍSTICA DE LA CADENA LATERAL	Aminoácido
No polar (hidrofóbica):	
A. Alifática	A L I V P
B. Aromática	F W
C. Que contiene azufre	M
D. Fronteriza	G
Polar sin carga:	
A. Hidroxilo	S T Y
B. Amidas	N Q
C. Sulfhidrilo	C
D. Fronteriza	G
Con carga positiva (básica)	K R H
Con carga negativa (ácida)	D E

45 Alternativamente, las sustituciones conservadoras ilustrativas se exponen inmediatamente más abajo.

Sustituciones conservadoras ii

RESIDUO ORIGINAL	SUSTITUCIÓN ILUSTRATIVA
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Una secuencia de polinucleótido o polipéptido "de origen natural" es típicamente de un mamífero que incluye, pero no se limita a, primate, por ejemplo, ser humano; roedor, por ejemplo, rata, ratón, hámster; vaca, cerdo, caballo, oveja, o cualquier mamífero. Los ácidos nucleicos y proteínas de la descripción pueden ser moléculas recombinantes (por ejemplo, heterólogas y que codifican la secuencia de tipo silvestre o una variante de esta, o de origen no natural). Las secuencias de polinucleótido y polipéptido de referencia incluyen, por ejemplo, P00451 (FA8_HUMAN) de UniProtKB/Swiss-Prot; Gitschier J y otros, Characterization of the human Factor VIII gene, Nature, 312(5992): 326-30 (1984); Vehar GH y otros, Structure of human Factor VIII, Nature, 312(5992):337-42 (1984); y Thompson AR. Structure and Function of the Factor VIII gene and protein, Semin Thromb Hemost, 2003;29;11-29 (2002), (referencias incorporadas en la presente descripción en su totalidad).

Como se usa en la presente descripción "derivado biológicamente activo" o "variante biológicamente activa" incluye cualquier derivado o variante de una molécula que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales y/o biológicas de dicha molécula, tales como propiedades de unión, y/o la misma base estructural, tal como una cadena principal peptídica o una unidad polimérica básica.

Como se usa en la presente descripción, "FVIII derivado de plasma" o "plasmático" incluye todas las formas de la proteína que se encuentran en la sangre obtenida de un mamífero que tienen la propiedad de activar la vía de coagulación.

En varios aspectos, la producción de rFVIII incluye cualquier método conocido en la técnica para (i) la producción de ADN recombinante por ingeniería genética, (ii) la introducción de ADN recombinante en células procariontas o eucariotas mediante, por ejemplo y sin limitación, transfección, electroporación o microinyección, (iii) el cultivo de dichas células transformadas, (iv) la expresión de rFVIII, por ejemplo constitutivamente o tras inducción, y (v) el aislamiento de dicho rFVIII, por ejemplo del medio de cultivo o mediante la cosecha de las células transformadas, para (vi) obtener rFVIII purificado.

En otros aspectos, el rFVIII se produce mediante la expresión en un sistema hospedero procarionta o eucariota adecuado caracterizado por producir una molécula de rFVIII farmacológicamente aceptable. Ejemplos de células eucariotas son las células de mamífero, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep, y HepG2.

Aún en otros aspectos, una amplia variedad de vectores se usan para la preparación del rFVIII y se seleccionan de vectores de expresión en eucariotas y procariotas. Los ejemplos de vectores para la expresión en procariotas incluyen plásmidos tales como, y sin limitación, pRSET, pET, y pBAD, en donde los promotores usados en vectores de expresión en procariotas incluyen uno o más de, y sin limitación, lac, trc, trp, recA, o araBAD. Los ejemplos de vectores para la expresión en eucariotas incluyen: (i) para la expresión en levaduras, vectores tales como, y sin limitación, pAO, pPIC, pYES, o pMET, que usan promotores tales como, y sin limitación, AOX1, GAP, GAL1, o AUG1; (ii) para la expresión en células de insecto, vectores tales como y sin limitación, pMT, pAc5, pIB, pMIB, o pBAC, que usan promotores tales como y sin limitación PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, o polh, y (iii) para la expresión en células de mamífero, vectores tales como y sin limitación pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, o pBPV, y vectores derivados, en un aspecto, de sistemas virales tales como y sin limitación el virus vaccinia, virus adenoasociados, virus herpes, o retrovirus, que usan promotores tales como y sin limitación de CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, y β -actina.

"Unidad Internacional," o "IU," del inglés, es una unidad de medida de la actividad de coagulación de la sangre (potencia) de FVIII medida por un ensayo estándar tal como un ensayo en una etapa. Los ensayos en una etapa se conocen en la técnica, tales como los descritos en N Lee, Martin L, y otros, An Effect of Predilution on Potency Assays of FVIII Concentrates, Thrombosis Research (Pergamon Press Ltd.) 30, 511 519 (1983). Otro ensayo estándar es un ensayo cromogénico. Los ensayos cromogénicos pueden adquirirse en el mercado, tal como el Coatest Factor VIII, comercializado por Chromogex AB, Molndal, Suecia.

El término "recocido" se usará para indicar una etapa en el proceso de liofilización de una preparación farmacéutica que se somete a liofilización, antes de las etapas de secado de la preparación, en la que la temperatura de la preparación congelada se eleva de una temperatura más baja a una temperatura más alta y después se vuelve a enfriar después de un período de tiempo.

Los agentes de relleno son aquellas entidades químicas que proporcionan estructura a la "torta" o masa sólida residual de una preparación farmacéutica después de liofilizarla y que la protege contra el colapso. Un agente de relleno cristalizante significa un agente de relleno como se describe en la presente descripción que puede cristalizarse durante la liofilización, que no es cloruro de sodio. HES no se incluye en este grupo de agentes de relleno cristalizables.

Secado por congelación, a menos que se indique de otro modo en el contexto en el que aparece, se usará para denotar la porción de un proceso de liofilización en la que la temperatura de una preparación farmacéutica se eleva para extraer el agua de la preparación. Las etapas de "congelación" de un proceso de liofilización son aquellas etapas que se producen antes de la etapa de secado por congelación. "Liofilización," a menos que se indique de otro modo, se referirá al proceso completo de liofilización, que incluye tanto las etapas de congelación como las etapas de secado por congelación.

A menos que se indique de otro modo, los términos en porcentaje expresan los porcentajes en peso/volumen y las temperaturas están en la escala de grados Celsius.

40 Desarrollo de la formulación y la liofilización

Para lograr la máxima estabilidad, las composiciones de FVIII de la presente descripción, en un aspecto, se liofilizan. Durante la liofilización, FVIII pasa de estar en una fase acuosa a estar en una fase sólida amorfa, la cual se considera protectora de la proteína frente a la inestabilidad química y/o conformacional. La preparación liofilizada no solo contiene una fase amorfa, sino que también incluye un componente que cristaliza durante la liofilización. Se considera que la inclusión de un componente de este tipo permite la liofilización rápida de la composición de FVIII y la formación de una torta más elegante (es decir, un torta con retención de la estructura de torta y encogimiento mínimo desde los laterales del envase en el que se liofilizó). En las formulaciones de la presente descripción, los agentes estabilizantes se han seleccionado de modo que existan en una fase amorfa del producto liofilizado, mientras que los agentes de rellenos (excepto HES) se han seleccionado de modo que cristalicen durante la congelación.

Tanto el FVIII como el estabilizante, en un aspecto, se encuentran dispersos en la fase amorfa de la torta liofilizada. La masa del estabilizante es además, en un aspecto, grande en comparación con los otros excipientes en la forma amorfa. Además, la temperatura de transición vítrea aparente (T_g) de la fase amorfa, en un aspecto, es relativamente alta durante el secado por congelación, y la temperatura de transición vítrea (T_g) del sólido es del mismo modo preferentemente alta durante el almacenamiento. Se descubrió que la cristalización del cloruro de sodio en el producto es conveniente, dado que el cloruro de sodio amorfo reducirá la T_g de la fase amorfa.

Para evitar el colapso de la torta de una composición particular, el secado primario, en un aspecto, se lleva a cabo a una temperatura del producto por debajo de la temperatura de transición vítrea aparente del concentrado congelado. Puede requerirse además un aumento del tiempo de secado para compensar una disminución de la T_g . Información adicional sobre la liofilización puede encontrarse en Carpenter, J. F. y Chang, B. S., Lyophilization of Protein Pharmaceuticals, Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing and Preservation, K. E. Avis y V. L. Wu, eds. (Buffalo Grove, Ill.: Interpharm Press, Inc.), pp. 199 264 (1996), las patentes de los Estados Unidos núm. 7,247,707, 7,087,723, 6,586,573.

La liofilización se lleva a cabo con el uso de técnicas comunes en la técnica y deberá optimizarse para la composición que se desarrolla [Tang y otros, Pharm Res. 21:191-200, (2004) y Chang y otros, Pharm Res. 13:243-9 (1996)].

5 Un ciclo de liofilización, en un aspecto, se compone de tres etapas: congelación, secado primario, y secado secundario [A.P. Mackenzie, Phil Trans R Soc Londres, Ser B, Biol 278:167 (1977)]. En la etapa de congelación, la solución se enfría para iniciar la formación de hielo. Además, esta etapa induce la cristalización del agente de relleno. El hielo se sublima en la etapa de secado primario, lo que se realiza mediante la reducción de la presión de la cámara por debajo de la presión de vapor del hielo, con el uso de un vacío e introducción de calor para promover la sublimación. Por último, el agua adsorbida o ligada se elimina en la etapa de secado secundario bajo presión de la cámara reducida y a una temperatura de platina elevada. El proceso produce un material conocido como una torta liofilizada. De ahí en adelante la torta puede reconstituirse con agua estéril o un diluyente para inyección adecuado.

15 El ciclo de liofilización no solo determina el estado físico final de los excipientes sino que también afecta otros parámetros tales como el tiempo de reconstitución, la apariencia, la estabilidad y el contenido de humedad final. La estructura de la composición en el estado congelado atraviesa varias transiciones (por ejemplo, transiciones vítreas y cristalizaciones) que se producen a temperaturas específicas y la estructura puede usarse para entender y optimizar el proceso de liofilización. La T_g y/o la T_g' pueden proporcionar información acerca del estado físico de un soluto y pueden determinarse por calorimetría diferencial de barrido (DSC). La T_g y la T_g' son un parámetro importante que debe tenerse en cuenta cuando se diseña el ciclo de liofilización. Por ejemplo, la T_g' es importante para el secado primario. Además, en el estado seco, la temperatura de transición vítrea proporciona información sobre las temperaturas de almacenamiento probablemente aceptables para el producto final.

25 Además del fármaco activo, los componentes de la formulación, en un aspecto, incluyen estabilizantes, un surfactante, tampones, y un agente de relleno en el caso de un fármaco de baja dosis. Los componentes especiales dirigidos a las necesidades únicas de la proteína, tales como Ca^{+2} con FVIII, también se incluyen, en varios aspectos. Muchos aditivos, tales como azúcares, glicerol, ciertos aminoácidos y aminos pueden servir como estabilizantes. La estabilidad frecuentemente se racionaliza en términos de "dinámica vítrea" es decir, la formulación deberá formar un sólido amorfo 'no reactivo', o cristal, durante el secado por congelación, en el que la proteína se encuentra molecularmente dispersa y acoplada a la matriz cristalina inmóvil de manera que la movilidad de la proteína y los reactivos potenciales se encuentra restringida en gran medida. Inmovilización significa estabilización, al menos cualitativamente, dado que cualquier proceso de degradación requerirá movilidad molecular de algún tipo. La matriz cristalina de los concentrados congelados y la fase amorfa seca se caracterizan por sus temperaturas de transición vítrea, T_g' y T_g , respectivamente. Por debajo de la temperatura de transición vítrea, la movilidad se vuelve muy limitada, y por el contrario, muy por encima de la transición vítrea, la movilidad se vuelve lo suficientemente alta para soportar los procesos rápidos de degradación química y física. Como regla general, la temperatura del producto (T_p) durante el secado primario debe controlarse cerca o por debajo de la T_g' ($T_p < T_g'$) para evitar el colapso de una matriz amorfa durante el secado por congelación (es decir, evitar un cambio físico no deseado) y mantenerse por debajo de la T_g durante el almacenamiento para evitar la degradación rápida. Sin embargo, el simple almacenamiento por debajo de la T_g no garantiza necesariamente una estabilidad aceptable. Los disacáridos tienen propiedades que les permiten funcionar tanto como sustitutos eficaces del agua como buenos formadores de cristales. Típicamente, la sacarosa y la trehalosa, se usan como estabilizantes.

45 Como se describe en la presente descripción, un agente de relleno es otro excipiente importante en una formulación de proteína. La función de un agente de relleno es proporcionar "elegancia" y más importante, proteger al producto del "desprendimiento." Es decir, en el caso de un fármaco de baja dosis, la concentración del fármaco puede ser tan pequeña que el producto seco resultante, o torta, tiene poca resistencia mecánica. Por lo tanto, la transferencia de momento desde el flujo de vapor de agua puede desintegrar la torta y transferir pedazos del producto fuera del frasco hacia la cámara de secado. Típicamente, los materiales solubles, fácilmente cristalizables con temperaturas eutécticas altas funcionan bien como agentes de relleno porque son fáciles de secar por congelación sin daños debido al colapso. El manitol y la glicina se emplean comúnmente en productos farmacéuticos. Es necesario que el agente de relleno esté presente como componente principal para garantizar una cristalización esencialmente completa.

Formulaciones y excipientes en general

55 Los excipientes son aditivos que imparten o mejoran la manufacturabilidad y/o la calidad del producto final, tal como la estabilidad y suministro de un producto farmacéutico (por ejemplo, una proteína). Independientemente del motivo para su inclusión, los excipientes son un componente integral de una formulación y por lo tanto es necesario que sean seguros y bien tolerados por los pacientes. Para los fármacos proteicos, la elección de los excipientes es particularmente importante porque afectan tanto la eficacia como la inmunogenicidad del fármaco. Por tanto, es necesario desarrollar las formulaciones de proteínas con una selección adecuada de los excipientes que brindan estabilidad, seguridad, y comerciabilidad adecuadas.

65 Una formulación liofilizada, en una modalidad, se compone de al menos uno o más de un tampón, un agente de relleno, y un estabilizante. En esta modalidad, la utilidad de un surfactante se evalúa y selecciona en casos donde la agregación durante la etapa de liofilización o durante la reconstitución se vuelve un problema. Un agente tamponante adecuado se incluye para mantener la formulación dentro de zonas estables de pH durante la fabricación (por ejemplo dilución,

filtración estéril, envasado, etc) y después de la reconstitución del producto liofilizado. Una comparación de los componentes excipientes contemplados para formulaciones de proteínas líquidas y liofilizadas se proporciona en la siguiente tabla:

5 Componentes excipientes de formulaciones de proteínas liofilizadas

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Componente excipiente	Función en la formulación liofilizada
Tampón	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mantener el pH de la formulación durante el procesamiento y tras la reconstitución
estabilizante	<ul style="list-style-type: none"> ○ Los estabilizantes incluyen crioprotectores y lioprotectores
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Los ejemplos incluyen polioles, azúcares y polímeros
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Los crioprotectores protegen a las proteínas del estrés de congelación
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Los lioprotectores estabilizan las proteínas en el estado seco por congelación
Agente de relleno	<ul style="list-style-type: none"> ○ Usado para mejorar la elegancia del producto y prevenir el desprendimiento
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Proporciona resistencia estructural a la torta liofilizada
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Los ejemplos incluyen manitol y glicina
Surfactante	<ul style="list-style-type: none"> ○ Se emplea si la agregación durante el proceso de liofilización es un problema
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Puede servir para reducir los tiempos de reconstitución
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Los ejemplos incluyen polisorbato 20 y 80
Antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> ○ Las reacciones de oxidación en la torta liofilizada se retardan en gran medida
Iones metálicos/agente quelante	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pueden incluirse si un ion metálico específico se incluye solamente como un cofactor o cuando el metal se requiere para la actividad de proteasas
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Los agentes quelantes generalmente no son necesarios en las formulaciones liofilizadas, pero pueden usarse para retardar las oxidaciones catalizadas por iones metálicos
Conservante	<ul style="list-style-type: none"> ○ Solo para formulaciones de múltiples dosis
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Proporciona protección contra el crecimiento microbiano en la formulación
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Se incluye normalmente en el diluyente de reconstitución (por ejemplo bWFI)

55

60

El reto principal en el desarrollo de formulaciones para proteínas es estabilizar el producto contra el estrés de fabricación, envío y almacenamiento. El papel de los excipientes de la formulación es proporcionar estabilización contra estos tipos de estrés. Los excipientes se emplean además para reducir la viscosidad de formulaciones de proteínas a alta concentración para hacer posible su suministro y mejorar la comodidad del paciente. En general, los estabilizantes pueden clasificarse en base a los mecanismos mediante los cuales estabilizan a las proteínas contra varios tipos de estrés químicos y físicos. Algunos estabilizantes se usan para aliviar los efectos de un estrés específico o para regular una susceptibilidad particular de una proteína específica. Otros estabilizantes tienen efectos más generales sobre las estabilidades físicas y covalentes de las proteínas. Los estabilizantes descritos en la presente descripción se organizan ya sea por su tipo químico o su papel funcional en las formulaciones. Se proporcionan breves descripciones de los modos de estabilización cuando se analiza cada tipo de estabilizante.

65

Dadas las enseñanzas y las orientaciones proporcionadas en la presente descripción, los expertos en la técnica conocerán qué cantidad o intervalo de excipiente puede incluirse en cualquier formulación particular para lograr una

formulación biofarmacéutica de la descripción que probablemente promueva la retención de la estabilidad del producto biofarmacéutico (por ejemplo, una proteína).

5 Por supuesto, un experto en la técnica reconocerá que las concentraciones de los excipientes descritos en la presente descripción comparten una interdependencia dentro de una formulación particular. A modo de ejemplo, la concentración de un agente de relleno, en un aspecto, se reduce cuando, por ejemplo, hay una alta concentración de proteína o cuando, por ejemplo, hay una alta concentración de agente estabilizante. Además, un experto en la técnica reconocerá que, para mantener la isotonicidad de una formulación particular en la que no hay agente de relleno, la concentración de un agente estabilizante podría aumentarse en consecuencia (es decir, se usaría una cantidad de estabilizante "tonificante"). Los excipientes comunes se conocen en la técnica y pueden encontrarse en Powell y otros, *Compendium of Excipients for Parenteral Formulations* (1998), *PDA J. Pharm. Sci. Technology*, 52:238-311.

Tampones y agentes tamponantes

15 Se observa que normalmente la estabilidad de una formulación de proteína farmacológicamente activa es máxima en un intervalo estrecho de pH. Es necesario identificar este intervalo de pH de estabilidad óptima temprano durante los estudios de preformulación. Varios enfoques, tales como estudios de estabilidad acelerada y estudios de tamizaje calorimétrico, son útiles en este empeño (Remmele R.L. Jr., y otros, *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999)). Una vez que una formulación finaliza, la proteína debe fabricarse y mantenerse en toda su vida en estante. Por tanto, los agentes tamponantes se emplean casi siempre para controlar el pH en la formulación.

20 La capacidad de tamponamiento de las especies tamponantes es máxima a un pH igual al pKa y disminuye a medida que el pH aumenta o disminuye alejándose de su valor. El noventa por ciento de la capacidad de tamponamiento existe dentro de una unidad de pH de este pKa. La capacidad de tamponamiento también aumenta proporcionalmente con el aumento de la concentración de tampón.

25 Es necesario considerar varios factores cuando se elige un tampón. En primer lugar y más importante, es necesario definir la especie tamponante y su concentración en base a su pKa y al pH deseado de la formulación. Igualmente importante es garantizar que el tampón sea compatible con la proteína y otros excipientes de la formulación, y que no catalice ninguna de las reacciones de degradación. Un tercer aspecto importante a considerar es la sensación de escozor e irritación que el tampón puede inducir tras la administración. Por ejemplo, se conoce que el citrato provoca escozor tras la inyección (Laursen T, y otros, *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 98(2): 218-21 (2006)). El potencial de escozor e irritación es mayor para fármacos que se administran por medio de las rutas subcutánea (SC) o intramuscular (IM), donde la solución de fármaco permanece en el sitio durante un período de tiempo relativamente mayor que cuando se administra por la ruta IV donde la formulación se diluye rápidamente en la sangre tras la administración. Para las formulaciones que se administran por infusión IV directa, es necesario controlar la cantidad total de tampón (y cualquier otro componente de la formulación). Se tiene que ser particularmente cuidadoso con los iones potasio administrados en la forma del tampón de fosfato de potasio, que pueden inducir efectos cardiovasculares en un paciente (Hollander-Rodriguez JC, y otros, *Am. Fam. Physician.*, 73(2): 283-90 (2006)).

30 Los tampones para las formulaciones liofilizadas necesitan consideración adicional. Algunos tampones como el fosfato de sodio pueden cristalizar separándose de la fase amorfa proteica durante la congelación lo que da como resultado desplazamientos del pH. Otros tampones comunes tales como acetato e imidazol pueden sublimarse o evaporarse durante el proceso de liofilización, lo que desplaza de este modo el pH de la formulación durante la liofilización o después de la reconstitución.

35 En una modalidad, el sistema tamponante presente en las composiciones se selecciona de modo que sea compatible fisiológicamente y mantenga un pH deseado de la formulación farmacéutica. En otra modalidad, el pH de la solución está entre pH 2,0 y pH 12,0. Por ejemplo, en varias modalidades el pH de la solución puede ser 2,0, 2,3, 2,5, 2,7, 3,0, 3,3, 3,5, 3,7, 4,0, 4,3, 4,5, 4,7, 5,0, 5,3, 5,5, 5,7, 6,0, 6,3, 6,5, 6,7, 7,0, 7,3, 7,5, 7,7, 8,0, 8,3, 8,5, 8,7, 9,0, 9,3, 9,5, 9,7, 10,0, 10,3, 10,5, 10,7, 11,0, 11,3, 11,5, 11,7, o 12,0.

40 El compuesto tamponante de pH puede estar presente en cualquier cantidad adecuada para mantener el pH de la formulación a un nivel predeterminado. Cuando se usan niveles adecuadamente bajos de tampón, puede evitarse la cristalización y el desplazamiento del pH. En una modalidad, la concentración del tampón de pH está entre 0,1 mM y 500 mM (1 M). Por ejemplo, se contempla que el agente tamponante de pH es al menos 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, o 500 mM.

45 Los agentes tamponantes de pH ilustrativos usados para el tamponamiento de la formulación como se expone en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a ácidos orgánicos, glicina, histidina, glutamato, succinato, fosfato, acetato, citrato, Tris, HEPES, y aminoácidos o mezclas de aminoácidos, que incluyen, pero no se limitan a aspartato, histidina, y glicina. En una modalidad de la presente descripción, el agente tamponante es histidina.

65

Estabilizantes y agentes de relleno

En una modalidad de las presentes formulaciones farmacéuticas, se añade un estabilizante (o una combinación de estabilizantes) para prevenir o reducir la agregación y la degradación química inducidas por el almacenamiento. Una solución nublada o turbia tras la reconstitución normalmente indica que la proteína ha precipitado o al menos se ha agregado. El término "estabilizante" significa un excipiente capaz de prevenir la agregación, o la degradación química (por ejemplo, autólisis, desamidación, oxidación, etc.). En ciertas modalidades, los estabilizantes contemplados incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, glicina, arginina HCL, compuestos polihidroxilados, que incluyen polisacáridos tales como dextrana, almidón, hidroxietil almidón, ciclodextrinas, N-metil piroolideno, celulosa y ácido hialurónico, cloruro de sodio, cloruro de calcio [Carpenter y otros, Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)]. En una modalidad de la descripción, se usa trehalosa como agente estabilizante. En otra modalidad de la descripción, se usa sacarosa como agente estabilizante. En las presentes formulaciones, el estabilizante se incorpora, en ciertas modalidades, en una concentración de aproximadamente 0,1, 0,5, 0,7, 0,8 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900, o 1000 mM. Del mismo modo, en ciertas modalidades de la descripción, el estabilizante se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,5, 0,7, 0,8 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 % p/v.

Si se desea, las formulaciones también incluyen cantidades adecuadas de agentes de relleno y reguladores de la osmolaridad. En varias modalidades de la descripción, los agentes de relleno incluyen, por ejemplo y sin limitación, manitol, glicina, sacarosa, polímeros tales como dextrana, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, lactosa, sorbitol, trehalosa, o xilitol. En una modalidad, el agente de relleno es manitol. El agente de relleno se incorpora, en varias modalidades de la descripción, en una concentración de aproximadamente 0,1, 0,5, 0,7, 0,8 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900, o 1000 mM.

Surfactantes

Las proteínas tienen una alta tendencia a interactuar con las superficies lo que las hace susceptibles a la adsorción y desnaturalización en las interfaces aire-líquido, frasco-líquido, y líquido-líquido (aceite de silicona). Se ha observado que esta vía de degradación depende de manera inversa de la concentración de la proteína y da como resultado la formación de agregados proteicos solubles e insolubles o la pérdida de proteína de la solución por medio de la adsorción a las superficies. Además de la adsorción a la superficie del envase, la degradación inducida por la superficie se exacerba con la agitación física, como la que se experimenta durante el envío y la manipulación del producto.

Los surfactantes se usan comúnmente en formulaciones de proteínas para prevenir la degradación inducida por las superficies. Los surfactantes son moléculas anfipáticas con la capacidad de competir con las proteínas por las posiciones entre las fases (y/o promover el replegamiento adecuado de una molécula proteica estructuralmente alterada). Las porciones hidrofóbicas de las moléculas de surfactante ocupan las posiciones entre las fases (por ejemplo, aire/líquido), mientras que las porciones hidrofílicas de las moléculas permanecen orientadas hacia el volumen del solvente. A concentraciones suficientes (típicamente alrededor de la concentración micelar crítica del detergente), una capa superficial de moléculas de surfactante sirve para prevenir que las moléculas proteicas se adsorban en la interfase. De este modo, se minimiza la degradación inducida por las superficies. Los surfactantes contemplados en la presente descripción incluyen, sin limitación, ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitano, es decir polisorbato 20 y polisorbato 80. Los dos difieren solamente en la longitud de la cadena alifática que imparte el carácter hidrofóbico a las moléculas, C-12 y C-18, respectivamente. En consecuencia, el polisorbato-80 es más activo en la superficie y tiene una concentración micelar crítica menor que el polisorbato-20.

Los detergentes también pueden afectar la estabilidad conformacional termodinámica de las proteínas. Los surfactantes no iónicos generalmente son útiles en la estabilización de las proteínas. Los surfactantes iónicos (detergentes) normalmente desestabilizan las proteínas. Una vez más, los efectos de un excipiente de tipo detergente dado serán específicos de la proteína. Por ejemplo, se ha demostrado que los polisorbatos reducen la estabilidad de algunas proteínas y aumentan la estabilidad de otras. La desestabilización de proteínas por detergente puede racionalizarse en términos de las colas hidrofóbicas de las moléculas de detergente que pueden involucrarse en la unión específica con los estados de desplegamiento parcial o total de la proteína. Estos tipos de interacciones podrían provocar un desplazamiento del equilibrio conformacional hacia los estados más expandidos de la proteína (es decir con aumento de la exposición de las porciones hidrofóbicas de la molécula proteica en complemento a la unión con polisorbato). Alternativamente, si el estado nativo de la proteína exhibe algunas superficies hidrofóbicas, la unión del detergente al estado nativo puede estabilizar esa conformación.

Otro aspecto de los polisorbatos es que son inherentemente susceptibles a la degradación oxidativa. Frecuentemente, como materias primas, estos contienen cantidades de peróxidos suficientes para provocar la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de la proteína, especialmente metionina. El potencial de daño oxidativo proveniente de la adición de estabilizante enfatiza el punto de que deberán usarse las concentraciones eficaces más bajas de excipientes en las formulaciones. Para los surfactantes, la concentración eficaz para una proteína dada dependerá del mecanismo de estabilización.

Los surfactantes también se añaden en cantidades adecuadas para prevenir el fenómeno de agregación relacionada con la superficie durante la congelación y el secado [Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)]. Por lo tanto, los surfactantes ilustrativos incluyen, sin limitación, surfactantes aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos, y anfóteros que incluyen surfactantes derivados de aminoácidos de origen natural. Los surfactantes aniónicos incluyen, pero no se limitan a, lauril sulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato de sodio y dioctil sulfonato de sodio, ácido quenodesoxicólico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, colato de sodio hidratado, desoxicolato de sodio, y sal sódica del ácido glicodesoxicólico. Los surfactantes catiónicos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidratado, y bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Los surfactantes zwitteriónicos incluyen, pero no se limitan a, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, y SB3-12. Los surfactantes no iónicos incluyen, pero no se limitan a, digitonina, Tritón X-100, Tritón X-114, TWEEN-20, y TWEEN-80. Los surfactantes también incluyen, pero no se limitan a laurumacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado y polietoxietilenado 10, 40, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, lecitina de soya y otros fosfolípidos tales como dioleil fosfatidil colina (DOPC), dimiristoilfosfatidil glicerol (DMPG), dimiristoilfosfatidil colina (DMPC), y (dioleil fosfatidil glicerol) DOPG; éster de ácido graso de sacarosa, metil celulosa y carboximetil celulosa. Por lo tanto se proporcionan además composiciones que comprenden estos surfactantes, ya sea individualmente o como una mezcla en diferentes proporciones. En una modalidad de la presente descripción, el surfactante es TWEEN-80. En las presentes formulaciones, el surfactante se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 g/L. En las formulaciones proporcionadas, en varias modalidades, la concentración de surfactante es 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 g/L. Del mismo modo, en ciertas modalidades de la descripción, el surfactante se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, o 1,0 % p/v.

Sales

Las sales se añaden frecuentemente para aumentar la fuerza iónica de la formulación, que puede ser importante para la solubilidad de la proteína, su estabilidad física, y la isotonicidad. Las sales pueden afectar la estabilidad física de las proteínas en una variedad de maneras. Los iones pueden estabilizar el estado nativo de las proteínas mediante la unión a residuos cargados en la superficie de la proteína. Alternativamente, las sales pueden estabilizar el estado desnaturalizado mediante la unión a grupos peptídicos a lo largo de la cadena principal de la proteína (-CONH-). Las sales también pueden estabilizar la conformación nativa de la proteína bloqueando las interacciones electrostáticas de repulsión entre los residuos dentro de una molécula proteica. Las sales en las formulaciones de proteínas también pueden bloquear las interacciones electrostáticas de atracción entre moléculas proteicas que pueden conducir a la agregación e insolubilidad de la proteína. Las sales (es decir, electrolitos) generalmente reducen significativamente la Tg', lo que de este modo hace más difícil, y algunas veces imposible, secar por congelación la formulación. Por este motivo, solo deberá incluirse la sal suficiente para mantener la estabilidad estructural de la proteína en la formulación, y normalmente este nivel de electrolito es muy bajo.

En ciertas modalidades, la concentración de sales de las formulaciones es entre 0,0 (es decir, sin sal), 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,010, 0,011, 0,012, 0,013, 0,014, 0,015, 0,020, 0,050, 0,080, 0,1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300, y 500 mM. En una modalidad de la descripción, se incluye 0,0 mM de NaCl (es decir, sin NaCl) en la formulación. Un experto en la técnica apreciará que aunque el NaCl se omita o se elimine de acuerdo con varias modalidades de la presente descripción, pueden estar presentes cantidades trazas de NaCl (es decir, debido a las limitaciones de la eliminación del NaCl por medio de diálisis o procedimientos cromatográficos). Por lo tanto, en varias modalidades, "que excluye el NaCl" significa que el NaCl nunca se añadió a la formulación, y "cantidad traza de NaCl" significa que el NaCl se eliminó de la formulación (por ejemplo, en la medida posible por diálisis, cromatografía de intercambio de solvente, y similares).

Otros componentes excipientes comunes

Aminoácidos

Los aminoácidos han encontrado un uso versátil en las formulaciones de proteínas como tampones, agentes de relleno, estabilizantes y antioxidantes. Por lo tanto, en un aspecto la histidina y el ácido glutámico se emplean para el tamponamiento de formulaciones de proteínas en el intervalo de pH de 5,5 - 6,5 y 4,0 - 5,5 respectivamente. El grupo imidazol de la histidina tiene un pKa = 6,0 y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico tiene un pKa de 4,3 lo que hace a estos aminoácidos adecuados para el tamponamiento en sus intervalos de pH respectivos. El ácido glutámico es particularmente útil en tales casos. La histidina se encuentra comúnmente en formulaciones de proteínas comercializadas, y este aminoácido proporciona una alternativa al citrato, un tampón conocido por escocer tras la inyección. Curiosamente, se ha informado que la histidina también tiene un efecto estabilizante, con respecto a la agregación cuando se usa a concentraciones altas tanto en presentaciones líquidas como liofilizadas (Chen B, y otros, Pharm Res., 20(12): 1952-60 (2003)). Otros han observado que la histidina también reduce la viscosidad de una formulación de alta concentración de proteína. Sin embargo, en el mismo estudio, los autores observaron un aumento de la agregación y la decoloración en formulaciones que contienen histidina durante los estudios de congelación y descongelación del anticuerpo en envases de acero inoxidable. Otra nota de cautela con la histidina es que experimenta fotooxidación en presencia de iones metálicos (Tomita M, y otros, Biochemistry, 8(12): 5149-60 (1969)). El uso de

metionina como un antioxidante en formulaciones parece prometedor; se ha observado que es eficaz contra una serie de estrés oxidativos (Lam XM, y otros, *J Pharm Sci.*, 86(11): 1250-5 (1997)).

5 En varios aspectos, se proporcionan formulaciones que incluyen uno o más de los aminoácidos glicina, prolina, serina, arginina y alanina que han demostrado estabilizar las proteínas mediante el mecanismo de exclusión preferencial. La glicina es además un agente de relleno usado comúnmente en formulaciones liofilizadas. La arginina ha demostrado ser un agente eficaz para inhibir la agregación y se ha usado tanto en formulaciones líquidas como liofilizadas.

10 En las formulaciones proporcionadas, la concentración de aminoácido es entre 0,1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300, y 500 mM. En una modalidad de la presente descripción, el aminoácido es glicina.

Antioxidantes

15 La oxidación de residuos de proteína proviene de una serie de orígenes diferentes. Más allá de la adición de antioxidantes específicos, la prevención del daño oxidativo de las proteínas involucra el control cuidadoso de una serie de factores a lo largo del proceso de fabricación y el almacenamiento del producto tales como el oxígeno atmosférico, la temperatura, la exposición a la luz, y la contaminación química. Por lo tanto la descripción contempla el uso de los antioxidantes farmacéuticos que incluyen, sin limitación, agentes reductores, depuradores de oxígeno/radicales libres, o agentes quelantes. Los antioxidantes en las formulaciones terapéuticas de proteínas, en un aspecto, son solubles en agua y permanecen activos a lo largo de la vida en estante del producto. Los agentes reductores y depuradores de oxígeno/radicales libres funcionan mediante la ablación de las especies activas del oxígeno en solución. Los agentes quelantes tales como EDTA son eficaces por la unión a metales trazas contaminantes que promueven la formación de radicales libres. Por ejemplo, el EDTA se utilizó en la formulación líquida de factor de crecimiento de fibroblastos ácido para inhibir la oxidación de los residuos de cisteína catalizada por iones metálicos. En una modalidad de la descripción, el glutatión se incluye en la formulación. En varias modalidades de las formulaciones proporcionadas en la presente descripción, la concentración de antioxidante es 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 mg/ml.

30 Además de la eficacia de varios excipientes para prevenir la oxidación de proteínas, el potencial de los antioxidantes en sí para inducir otros cambios covalentes o físicos a la proteína es de interés. Por ejemplo, los agentes reductores pueden provocar la ruptura de enlaces disulfuro intramoleculares, lo que puede conducir al intercambio de disulfuro. En presencia de iones de metales de transición, el ácido ascórbico y el EDTA han demostrado promover la oxidación de la metionina en una serie de proteínas y péptidos (Akers MJ, y Defelippis MR. *Peptides and Proteins as Parenteral Solutions*. En: *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard, editores. *Pharmaceutical Science*. Taylor y Francis, Reino Unido (1999)); Fransson J.R., *J. Pharm. Sci.* 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, y otros, *Pharm Res.*, 21(12): 2377-83 (2004)). Se ha informado que el tiosulfato de sodio reduce los niveles de oxidación de la metionina inducida por luz y temperatura en rhuMab HER2; sin embargo, la formación de un aducto tiosulfato-proteína también se informó en este estudio (Lam XM, Yang JY, y otros, *J Pharm Sci.* 86(11): 1250-5 (1997)). La selección de un antioxidante adecuado se realiza de acuerdo con los tipos de estrés y sensibilidades específicas de la proteína. Los antioxidantes contemplados en ciertos aspectos incluyen, sin limitación, agentes reductores y depuradores de oxígeno/radicales libres, agentes acomplejantes de metales tales como EDTA, y tiosulfato de sodio.

Iones metálicos

45 En general, los iones de los metales de transición no se desean en las formulaciones de proteínas porque pueden catalizar reacciones de degradación física y química en las proteínas. Sin embargo, se incluyen iones metálicos específicos en las formulaciones cuando son cofactores de las proteínas y en formulaciones de proteínas en suspensión donde estos forman complejos de coordinación (por ejemplo, suspensión de insulina con zinc). Recientemente, se ha propuesto el uso de iones magnesio (10 -120 mM) para inhibir la isomerización de ácido aspártico a ácido isoaspártico (documento WO 2004039337).

50 Dos ejemplos donde los iones metálicos confieren estabilidad o mayor actividad en proteínas son desoxirribonucleasa humana (rhDNase, Pulmozyme®), y FVIII. En el caso de rhDNase, los iones Ca^{+2} (hasta 100 mM) aumentaron la estabilidad de la enzima a través de un sitio de unión específico (Chen B, y otros, *J Pharm Sci.*, 88(4): 477-82 (1999)). De hecho, la eliminación de los iones de calcio de la solución con EDTA provocó un aumento en la desamidación y la agregación. Sin embargo, este efecto se observó solamente con iones Ca^{+2} , se observó que otros cationes divalentes Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} desestabilizan la rhDNase. Se observaron efectos similares en FVIII. Los iones Ca^{+2} y Sr^{+2} estabilizaron la proteína mientras que otros como Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+2} desestabilizaron la enzima (Fatouros, A., y otros, *Int. J. Pharm.*, 155, 121-131 (1997). En un estudio separado con FVIII, se observó un aumento significativo en la velocidad de agregación en presencia de iones Al^{+3} (Derrick TS, y otros, *J. Pharm. Sci.*, 93(10): 2549-57 (2004)).

Conservantes

65 Los conservantes son necesarios cuando se desarrollan formulaciones parenterales de múltiples usos que involucran más de una extracción del mismo envase. Su función primaria es inhibir el crecimiento microbiano y garantizar la

esterilidad del producto a lo largo de la vida en estante o término de uso del producto farmacéutico. Los conservantes usados comúnmente incluyen, sin limitación, alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes tienen una larga historia de uso, el desarrollo de formulaciones de proteínas que incluyen conservantes puede ser un reto. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizante (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor importante que limita su uso en formulaciones de proteínas de múltiples dosis (Roy S, y otros, J Pharm Sci., 94(2): 382-96 (2005)). Cuando son prácticos, los conservantes deberán incluirse en la formulación diluyente y no incluirse en la formulación a secar por congelación.

Hasta la fecha, la mayoría de los fármacos proteicos se han formulado solamente para uso único. Sin embargo, cuando las formulaciones de múltiples dosis son posibles, tienen la ventaja adicional de hacer posible la comodidad del paciente, y una mayor comerciabilidad. Un buen ejemplo es el de la hormona del crecimiento humana (hGH) donde el desarrollo de las formulaciones conservadas ha conducido a la comercialización de presentaciones de pluma de inyección de múltiples usos, más convenientes. Al menos cuatro de tales dispositivos tipo pluma que contienen formulaciones conservadas de hGH están disponibles en el mercado en la actualidad. Norditropin® (líquida, Novo Nordisk), Nutropin AQ® (líquida, Genentech) & Genotropin (liofilizada - cartucho de dos cámaras, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol mientras que Somatrop® (Eli Lilly) se formula con m-cresol.

Es necesario considerar varios aspectos durante el desarrollo de la formulación de formas de dosificación conservadas. La concentración eficaz de conservante en el producto farmacéutico debe optimizarse. Esto requiere probar un conservante dado en la forma de dosificación con intervalos de concentración que confieren eficacia antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de la proteína. Por ejemplo, tres conservantes se tamizaron con éxito en el desarrollo de una formulación líquida para el receptor de interleucina-1 (Tipo I), con el uso de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los conservantes se clasificaron en base a su impacto sobre la estabilidad a concentraciones usadas comúnmente en los productos comercializados (Remmele RL Jr., y otros, Pharm Res., 15(2): 200-8 (1998)).

El desarrollo de formulaciones líquidas que contienen conservantes es más difícil que el de formulaciones liofilizadas. Los productos secados por congelación pueden liofilizarse sin el conservante y reconstituirse con un diluyente que contiene conservante en el momento del uso. Esto acorta el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con la proteína lo que minimiza significativamente los riesgos asociados a la estabilidad. Con las formulaciones líquidas, la eficacia del conservante y la estabilidad tienen que mantenerse durante toda la vida en estante del producto (~ 18 -24 meses). Un punto importante a señalar es que la eficacia del conservante tiene que demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes excipientes.

Algunos conservantes pueden provocar reacciones en el sitio de inyección, que es otro factor que necesita consideración cuando se elige un conservante. En los ensayos clínicos que se enfocan en la evaluación de conservantes y tampones en Norditropin, se observó que la percepción de dolor es menor en formulaciones que contienen fenol y alcohol bencílico en comparación con una formulación que contiene m-cresol (Kappelgaard A.M., Horm Res. 62 Supl 3:98-103 (2004)). Curiosamente, entre los conservantes usados comúnmente, el alcohol bencílico posee propiedades anestésicas (Minogue SC, y Sun DA., Anesth Analg., 100(3): 683-6 (2005)). En varios aspectos el uso de conservantes proporciona un beneficio que compensa cualquier efecto secundario.

Métodos de Preparación

La presente descripción contempla además métodos para la preparación de formulaciones farmacéuticas.

Los presentes métodos comprenden una o más de las siguientes etapas: añadir un agente estabilizante como se describe en la presente descripción a dicha mezcla antes de liofilizar, añadir al menos un agente seleccionado de un agente de relleno, un agente regulador de la osmolaridad, y un surfactante, cada uno de ellos como se describe en la presente descripción, a dicha mezcla antes de la liofilización.

La práctica de reconstitución estándar para el material liofilizado es añadir un volumen de agua pura o agua estéril para inyección (WFI) (típicamente, pero no necesariamente, equivalente al volumen eliminado durante la liofilización), aunque algunas veces se usan soluciones diluidas de agentes antibacterianos en la producción de productos farmacéuticos para la administración parenteral [Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)]. En consecuencia, se proporcionan métodos para la preparación de composiciones de FVIII reconstituidas que comprenden la etapa de añadir un diluyente a una composición de FVIII liofilizada de la descripción.

El material liofilizado puede reconstituirse como una solución acuosa. Una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua estéril para inyección, agua con conservantes para el uso de múltiples dosis, o agua con cantidades adecuadas de surfactantes (por ejemplo, una suspensión acuosa que contiene el compuesto activo mezclado con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas). En varios aspectos, tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo y sin limitación, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes son un fosfátido de origen natural, por ejemplo y sin limitación, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo y sin limitación, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo y sin limitación, heptadecaetilenooxicetanol, o productos de

condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo y sin limitación, monooleato de polietileno sorbitano. En varios aspectos, las suspensiones acuosas contienen además uno o más conservantes, por ejemplo y sin limitación, etil, o n-propil, p-hidroxibenzoato.

Administración

Para administrar composiciones a seres humanos o animales de prueba, en un aspecto, las composiciones comprenden uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Las frases "farmacéuticamente" o "farmacológicamente" aceptables se refiere a entidades moleculares y composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas tal como los productos de agregación y escisión, y además no producen alérgicas, u otras reacciones adversas cuando se administran con el uso de rutas bien conocidas en la técnica, como se describe más abajo. Los "portadores farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción clínicamente útiles y similares, con inclusión de los agentes descritos anteriormente.

Las formulaciones farmacéuticas se administran por ruta oral, tópica, transdérmica, parenteral, o por aerosol de inhalación, vaginal, rectal, o por inyección intracraneal. El término parenteral como se usa en la presente descripción incluye inyecciones subcutáneas, inyecciones intravenosas, intramusculares, intracisternales, o técnicas de infusión. La administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intracecal, retrobulbar, intrapulmonar, y o implantación quirúrgica en un sitio particular también se contempla. Generalmente, las composiciones son esencialmente libres de pirógenos, así como de otras impurezas que pudieran ser dañinas al receptor.

Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones se llevan a cabo con el patrón y los niveles de dosis que se seleccionan por el médico especialista. Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación adecuada depende del tipo de enfermedad a tratar, como se definió anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el fármaco se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al fármaco, y el criterio del médico especialista.

Kits

Como un aspecto adicional, la descripción incluye kits que comprenden una o más composiciones liofilizadas empaquetadas de una manera que facilita su uso para la administración a sujetos. En una modalidad, tal kit incluye la formulación farmacéutica descrita en la presente descripción (por ejemplo, una composición que comprende una proteína o péptido terapéutico), empaquetada en un envase tal como una botella o recipiente sellado, con una etiqueta pegada al envase o incluida en el empaque que describe el uso del compuesto o composición al practicar el método. En una modalidad, la formulación farmacéutica está empaquetada en el envase de manera tal que la cantidad de espacio vacío en el envase (por ejemplo, la cantidad de aire entre la formulación líquida y la parte superior del envase) es muy pequeña. Preferentemente, la cantidad de espacio vacío es insignificante (es decir, casi ninguna). En una modalidad, el kit contiene un primer envase que tiene una composición de proteína o péptido terapéutico y un segundo envase que tiene una solución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición. En un aspecto, la formulación farmacéutica está empaquetada en forma de una unidad de dosificación. El kit puede incluir además un dispositivo adecuado para administrar la formulación farmacéutica de acuerdo con una ruta de administración específica. Preferentemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de las formulaciones farmacéuticas.

Dosificaciones

El régimen de dosificación involucrado en un método para tratar una afección descrita en la presente descripción se determinará por el médico especialista, considerando varios factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la edad, afección, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el tiempo de administración y otros factores clínicos. A modo de ejemplo, una dosis típica de un FVIII recombinante de la presente descripción es aproximadamente 30 IU/kg a 50 IU/kg.

En un aspecto, las formulaciones de la descripción se administran por un bolo inicial seguido por una infusión continua para mantener niveles circulantes terapéuticos del producto farmacéutico. Como otro ejemplo, el compuesto de la invención se administra como una dosis de una vez. Los expertos en la técnica optimizarán fácilmente la dosificación eficaz y los regímenes de administración según lo determinado por la buena práctica médica y la afección clínica del paciente individual. La frecuencia de la dosificación depende de los parámetros farmacocinéticos del agente y la ruta de administración. La formulación farmacéutica óptima se determina por un experto en la técnica en dependencia de la ruta de administración y la dosificación deseada. Ver por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18va Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435-1712, cuya descripción se incorpora de este modo como referencia. Tales formulaciones influyen en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo*, y la velocidad de aclaramiento *in vivo* de los agentes administrados. En dependencia de la ruta de administración, se calcula una dosis adecuada de acuerdo con el peso corporal, el área superficial del cuerpo o el tamaño del órgano. Las dosificaciones adecuadas pueden determinarse a través del uso de ensayos establecidos para la determinación de los

niveles sanguíneos de las dosificaciones junto con los datos de dosis-respuesta adecuados. El régimen de dosificación final se determina por el médico especialista, considerando varios factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo la actividad específica del fármaco, la gravedad del daño y la capacidad de respuesta del paciente, la edad, afección, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el tiempo de administración y otros factores clínicos. A medida que se realicen los estudios, emergerá información adicional respecto a los niveles de dosificación adecuados y la duración del tratamiento para varias enfermedades y afecciones.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de modalidades específicas de la descripción.

10 Ejemplo 1

Materiales y Métodos

15 Materiales

Los excipientes usados son reactivos de calidad analítica. D-manitol, trehalosa, rafinosa, sorbitol y sacarosa se adquirieron de Pfanstiehl Lab. Inc. La glicina se obtuvo de Chattem Chemicals. M-hidroxietyl almidón, arginina, y alanina se obtuvieron de Ajinomoto Co., Inc. Cloruro de sodio, cloruro de calcio y Tris base se obtuvieron de Mallinckrodt Inc. Hepes, L-histidina y polisorbato-80 se obtuvieron de E. M. Science, Tanabe, Co. Inc. y Spectrum Int. Inc., respectivamente. El glutatión reducido se obtuvo de Sigma.

20 Preparación de la formulación (ejemplo de referencia)

Las formulaciones descritas se prepararon con el uso de sustancia farmacéutica a granel (BDS), suministrada por Baxter Healthcare Ltd. La BDS estaba compuesta por 3130 IU/ml de rAHF (es decir, rFVIII); 50 mM de Tris base, 0,4 M de NaCl, 0,1 % de polisorbato-80 (surfactante), 4 mM de CaCl₂, pH 7. El CaCl₂ y el surfactante están presentes para estabilizar la conformación nativa y reducir las pérdidas por procesamiento, respectivamente, y el pH 7 se seleccionó para la estabilidad óptima en solución, aunque otros pH también proporcionarían estabilidad óptima. La BDS se diluyó con agua destilada y se mezcló con varios excipientes para preparar una serie de soluciones de formulación y se neutralizó a pH 7. Antes de llenar los frascos, las soluciones de formulación que contiene proteína se filtraron con el uso de un filtro de 0,22 µ de tamaño de poro obtenido de Millipore antes de llenar (5 ml) en frascos tubulares Tipo I de 30 cc, de 20 mm. Los frascos y los tapones (Flurotec) se adquirieron de Daikyo Seiko.

35 Secado por congelación

El secado por congelación se realizó en un secador por congelación Dura-Stop/Dura-Dry o un LyoStar (FTS). Ambos secadores por congelación tienen 3 platinas móviles, con un área total de 4,0 y 4,6 pies cuadrados, respectivamente. La presión de la cámara se midió con el uso de un manómetro de capacitancia diferencial (MKS). Las temperaturas del producto y de platina se midieron por medio de termopares de cobre y constantán de calibre 30 colocados en el centro del fondo de los frascos, que toman muestras de la temperatura tanto del borde como del interior de los frascos. Los detalles de los diferentes procesos usados se proporcionan en las secciones de resultados y discusión adecuadas.

40 Ensayo de potencia

El ensayo se llevó a cabo mediante el uso de un instrumento COAG-A-MATE (Organon Teknika Corp., Durham, NC). La actividad de FVIII se determinó mediante el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada en una etapa (APTT), con el uso de plasma deficiente en FVIII humano como sustrato y sílice micronizada como activador. La potencia de FVIII se determinó mediante la prueba de dos frascos separados por dos analistas diferentes, cada frasco se probó por duplicado. Por lo tanto, los datos de actividad informados son el promedio de las determinaciones de cuatro réplicas. El valor promedio se comparó con el valor de potencia correspondiente de la muestra almacenada a -70 °C y se informó como el por ciento del "control a -70 °C". La desviación estándar normal para las determinaciones replicadas era aproximadamente 5 %, lo que significa que el error estándar en la media era aproximadamente 2,5 %.

55 Ensayo del contenido de agua

Los contenidos de humedad en las tortas secadas por congelación se determinaron mediante titulación coulombimétrica de Karl Fisher, AF7LC (Fisher Scientific). Las muestras secadas por congelación se suspendieron en 2 ml de metanol previamente secado y se agitaron durante aproximadamente 5 minutos para garantizar que el metanol humedeció todo el polvo en el frasco y formó una suspensión fina. Los 2 ml de la suspensión se transfirieron rápidamente al titulador para minimizar la exposición de la muestra a la atmósfera. Con el uso del mismo tipo de frascos y tapones, se realizó una serie de corridas de blanco con metanol solamente, siguiendo el mismo procedimiento como se describió anteriormente. La cantidad de agua en las muestras secadas por congelación se calculó a partir de la diferencia de los valores del título de las muestras y el blanco. Cada medición se repitió tres veces mediante el uso de tres frascos diferentes. Los contenidos de agua informados eran la media de las tres mediciones y fueron precisos dentro de ± 0,1 % o mejor.

Análisis térmico

Se usó un calorímetro diferencial de barrido de TA Instruments (DSC-2920) para medir las temperaturas de transición vítrea, T_g , de las tortas secadas por congelación y para medir la temperatura de transición vítrea del concentrado secado por congelación en sistemas congelados, la T_g' que normalmente se obtiene para representar la temperatura ligeramente menor que la temperatura de colapso, que es la temperatura máxima normalmente recomendada para el secado primario. El DSC se operó en modo "modulado" bajo condiciones de "calentamiento total" con una amplitud de 0,796 °C, un período de 60 segundos, y una velocidad de barrido lineal de 2 °C/min. Las muestras secas se manipularon en una bolsa seca, que se lavó continuamente con gas nitrógeno seco para mantener la humedad relativa a menos de 2 %. Aproximadamente 5 - 10 mg de las muestras secadas por congelación se compactaron en discos de ~ 3-4 mm de grosor antes de sellarlos en las bandejas de aluminio. Para las mediciones de soluciones congeladas, se transfirió aproximadamente 50 µl de solución a la bandeja de Al del DSC, y se selló. Todas las mediciones de DSC se realizaron en una atmósfera de nitrógeno seco (50 ml/min.). La calibración de la temperatura y la energía se realizó de acuerdo con el procedimiento estándar con el uso de alta pureza de indio. Las transiciones vítreas se determinaron como el punto medio de la transición proporcionado por la señal de inversión y son reproducibles dentro de aproximadamente $\pm 0,5$ °C.

Microscopía del secado por congelación

Las mediciones de la temperatura de colapso se realizaron con el uso de microscopía del secado por congelación. La muestra se coloca entre dos cubreobjetos de vidrio y se congela rápidamente a una temperatura por debajo de -50 °C. La cámara que contiene la muestra se evacúa a ≈ 200 mTorr, y el proceso de secado por congelación se observa a través de un microscopio a temperaturas crecientes de la muestra. El secado por congelación con retención de la "estructura de torta" en la región seca se observa por debajo de la temperatura de colapso. A una temperatura por encima de la temperatura de colapso, se observa pérdida de la estructura en la región seca. Las temperaturas de colapso son reproducibles dentro de ± 1 °C.

Difracción de rayos X de polvo

Los estudios de difracción de rayos X de polvo emplearon un difractómetro de polvo Norelco con una fuente $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54$ Å) que funciona a una carga de tubo de 40 kv y 40 mA. Las muestras secadas por congelación se trituraron suavemente para formar un polvo fino, se dispersaron sobre un portamuestras, y se presionaron suavemente antes de cargarlas. Todas las exploraciones se realizaron bajo condiciones ambientales de temperatura y humedad. Las muestras se exploraron de 10° a 60° (2D) a una velocidad de exploración de 0,5 °/minuto.

Ejemplo 2 (ejemplo de referencia)

Dado que la variación en el nivel de NaCl generalmente no es aceptable, particularmente en un producto comercial, y dado que la cristalización de un componente generalmente se facilita por el aumento de la concentración de ese componente con relación a los otros componentes, se decidió añadir NaCl para aumentar el nivel hasta un valor por encima del nivel más alto esperado en el proceso y suficientemente alto de modo que la cristalización del NaCl durante la etapa de congelación sea posible. Se usó calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) para estudiar la congelación de varias concentraciones de cloruro de sodio en una formulación que contenía además 0,02 % (p/v) de polisorbato-80, 10 mM de Tris, 4 mM de cloruro de calcio, y 2 % (p/v) de sacarosa. Pare este experimento, se usó 200 mM de cloruro de sodio. Podrían usarse otras concentraciones, que incluyen, pero no se limita a aquellas en el intervalo de 1 mM a 10 000 mM, o 10 mM a 1000 mM o 100 mM a 500 mM, o 150 mM a 300 mM para garantizar que se produjo la cristalización completa del cloruro de sodio durante la congelación.

En una modalidad preferida, se usaron muestras que contienen 200 mM de cloruro de sodio, lo que dio como resultado un valor de (T_g') del sólido congelado (-39 °C) que se aproximaba a la T_g' del sistema en ausencia de cloruro de sodio (-36 °C), lo que sugiere que la mayor parte del cloruro de sodio había cristalizado. Las temperaturas de colapso (por medio de microscopía del secado por congelación) estaban dentro de aproximadamente 1 °C del valor de T_g' . Las soluciones que contienen 150 mM o menos de cloruro de sodio proporcionaron valores de T_g' menores que -50 °C, lo que indica la presencia de cloruro de sodio sin cristalizar (es decir cloruro de sodio amorfo). Esta observación se confirmó en estudios limitados del material secado por congelación en frascos. Cuando se liofilizaron, las soluciones que contienen menos de 200 mM de cloruro de sodio exhibieron grados variables de colapso en la estructura de la torta, como se predijo por los datos de T_g' , pero a ≥ 200 mM de NaCl, se evitó el colapso, y se produjo agente de relleno y NaCl cristalino (difracción de rayos X de polvo).

Ejemplo 3 (ejemplo de referencia)

Se examinó el efecto que tienen diferentes concentraciones de rAHF sobre la estabilidad de rAHF cuando el rAHF se expone a estrés en diferentes etapas de secado por congelación. Dos muestras que contienen diferentes concentraciones de rAHF, 600 y 60 IU/ml (correspondientes a 150 & 15 µg/ml) se usaron sin ningún estabilizante. La composición de la formulación para estas muestras era: 8 % de manitol (agente de relleno), 10 mM de tampón Tris, 200 mM de NaCl, 4 mM de CaCl_2 , 0,02 % de polisorbato-80, pH 7,0. Una tercera muestra usó una formulación que

empleaba 2 % de sacarosa como estabilizante además de estos componentes. El proceso de secado usado, descrito en la Tabla 1, produce temperaturas del producto de aproximadamente -42 °C, lo cual es suficientemente bajo para prevenir el colapso en la mayoría de las formulaciones; aunque este proceso no se optimizó.

5 Tabla 1. Procedimiento de congelación y liofilización para estudios preliminares de la estabilidad de rAHF.

Etapa del proceso	Descripción
Congelación	• Enfriar hasta +5 °C, mantener durante 10 minutos
	• Enfriar hasta -5 °C a 1 °C/minuto, mantener durante 20 minutos
	• Enfriar hasta -20 °C a 1 °C/minuto, mantener durante 1 h
	• Enfriar hasta -45 °C a 0,5 °C/minuto, mantener durante 1 h
	• Tomar 3 muestras para el ensayo de potencia
Mantenimiento en congelación a -35 °C	Después de la "Congelación"
	• Mantener a -35 °C durante 48 h
	• Extraer 3 muestras para el ensayo de potencia
Mantenimiento en congelación a -35 °C y -20 °C	Después de "Mantenimiento en congelación a -35 °C"
	• Mantener a -20 °C durante 48 h
	•tomar 3 muestras para el ensayo de potencia
Secado por congelación	• Después de "Mantenimiento en congelación a -35 °C y -20 °C"
	•Enfriar hasta -45 °C a 0,5 °C/minuto, mantener durante 1 h
	•Ajustar la presión de la cámara a 65 mTorr
	• Ajustar la platina a -32 °C; secado primario durante ≈ 55 horas.
	• Ajustar la platina a +40 °C a 0,2 °C/minuto; mantener durante 3 horas de secado secundario
	• Tomar 3 muestras para el ensayo de potencia

El efecto de la concentración de la proteína sobre la estabilidad de rAHF en el proceso se evaluó mediante la extracción de pequeñas alícuotas de cada muestra en cada etapa del proceso de secado por congelación (como se describió en la Tabla 1) y la determinación de la actividad de rAHF. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2 Estabilidad de rAHF durante el procesamiento y el almacenamiento del sólido secado por congelación a 40 °C: Estudio preliminar de estabilidad. Los detalles del procesamiento se proporcionan en la Tabla 1. La incertidumbre proporcionada para las constantes de velocidad es el error estándar proporcionado por el análisis de regresión. El error estándar en los datos de % de pérdida es aproximadamente 3 %. La constante de velocidad, k, se define por la expresión cinética "tiempo extendido", Actividad = (Actividad, control a - 70 °)·exp(-k · √t), donde el tiempo, t, es en meses.

Protocolo, o etapa de procesamiento	% de pérdida de la actividad de rAHF durante la etapa o constante de velocidad		
	Solución A, 600 IU/ml	Solución B 60 IU/ml	Solución C, 60 IU/ml, con sacarosa
Congelación	3	35	39
Mantenimiento en congelación a -35 °C	2	9	4
Mantenimiento en congelación a -35 °C y -20 °C	7	12	5
Secar	20	24	18
Almacenamiento del sólido seco @ 40 °C, constante de velocidad (k)	1,34±0,16	1,85±0,17	0,45±0,05

Las formulaciones (muestras B y C) que contienen el nivel más bajo de rAHF (60 IU/ml) perdieron 35-39 % de la potencia inicial del rAHF durante la congelación, mientras que la formulación (muestra A) que contiene el nivel más alto de rAHF (600 IU/ml) solo perdió aproximadamente 3 %. Note que la incertidumbre en los datos es aproximadamente 3 %; por lo tanto, la pérdida de la actividad durante la congelación de la fórmula de concentración alta fue insignificante. Durante el tratamiento térmico y la liofilización posteriores, la formulación que contiene una concentración de rAHF más alta también tuvo una pérdida de actividad menor que la formulación que contiene una concentración más baja de rAHF y sin sacarosa. Estas observaciones sugieren que las concentraciones de rAHF más altas tienen un efecto de autoprotección. La pérdida de actividad durante el secado fue significativa (18-24 %) y comparable para todas las formulaciones. La estabilidad durante el almacenamiento fue ligeramente mejor para la muestra de concentración alta (A) que para la muestra de concentración baja (B), y mucho mejor para la muestra de formulación que contiene sacarosa (C).

Ejemplo 4

Las muestras de formulación se tamizaron en cuanto a la estabilidad y al comportamiento en el secado por congelación para identificar las formulaciones preferidas para rAHF. En una modalidad, las formulaciones involucraron varias combinaciones de agentes de relleno (generalmente 8 %) y estabilizantes (2 %), aunque el experto reconocerá que otras concentraciones de agentes de relleno y estabilizantes son de igual manera adecuadas. En esta misma modalidad, las formulaciones que usan hidroxietil almidón (HES) (ejemplos de la invención) o NaCl (ejemplos de referencia) como agentes de relleno los usan a concentraciones de 4 % y 2,3 %, respectivamente, aunque nuevamente, el experto reconocerá que otras concentraciones para estos excipientes son de igual manera adecuadas. Además, todas las formulaciones incluyeron los siguientes excipientes y condiciones: 220 mM de NaCl, 0,03 % (v/v) de polisorbato-80, 4 mM de CaCl₂, 10 mM de tampón TRIS, y pH 7. El ciclo de secado por congelación usó las combinaciones específicas de estabilizantes y agentes de relleno descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Ciclo de secado por congelación y formulaciones para los estudios de tamizaje de estabilidad. En cada caso el sistema tamponante fue: 220 mM de NaCl, 0,03 % (v/v) de polisorbato-80, 4 mM de CaCl₂, 10 mM de tampón Tris, pH 7

	Ciclo de secado por congelación	Estabilizante (p/v)	Agente de relleno (p/v)
5		2 % de Sacarosa	8 % de Manitol
	<u>Congelación:</u>	2 % de Trehalosa	8 % de Manitol
10	1. Aplicar rampa hasta -5 °C a 0,5 °C/min, mantener durante ½ h.	2 % de Rafinosa	8 % de Manitol
	2. Aplicar rampa hasta -22 °C a 0,5 °C/min, mantener durante 3 h.	2 % de Arginina	8 % de Manitol
15	3. Aplicar rampa hasta -45 °C a 0,5 °C/min, mantener durante 1 h.	2 % de Lisina	8 % de Manitol
	<u>Secado:</u>	2 % de Sorbitol	8 % de Manitol
20	1. Ajustar la presión de la cámara a 65 mTorr	2 % de Glicina	8 % de Manitol
	•Aplicar rampa hasta -32 °C a 0,5 °C/min; mantener durante 66,7 h.	2 % de Sacarosa	4 % de HES
	•Temperaturas del producto ≈ -42 °C		
25	2. Aplicar rampa hasta +40 °C a 0,2 °C/min, mantener durante 3 h.	2 % de Sacarosa	8 % de Glicina
		2 % de Trehalosa	8 % de Glicina
30		2 % de Sacarosa	2,34 % de NaCl
		2 % de Sacarosa	8 % de Alanina

35 Todas las formulaciones contenían 100 IU/ml de rAHF en la solución inicial. Se seleccionó el nivel más bajo de rAHF debido a que la inestabilidad de rAHF sería máxima a una concentración de proteína más baja, lo que permitió por lo tanto una evaluación más fácil de las diferencias de estabilidad. El tamizaje de las formulaciones para identificar los candidatos de formulación potencial usó dos conjuntos de criterios, (1) las características físicas y (2) la estabilidad.

40 Características físicas: Las características físicas de los productos secados por congelación se valoraron por los siguientes criterios: (1) la capacidad de secarse por congelación sin colapsar a baja humedad residual (normalmente <1 %) dentro de un tiempo razonable, (2) la temperatura de transición vítrea de los sólidos secados por congelación, (3) la apariencia del producto secado por congelación, y (4) el tiempo de reconstitución determinado por disolución de los contenidos del frasco en 5 ml de agua estéril para inyección. Los resultados de la caracterización física se muestran en la Tabla 4.

45

Tabla 4. Características físicas de las formulaciones secadas por congelación del estudio de tamizaje. El término, "Elegante", significa secado por congelación sin pérdida significativa de la estructura de la torta.

I.D. de la muestra	Contenido de agua (%)	T _g (°C)	Reconstitución (s)	Apariencia
Manitol/sacarosa	n/c	54	64	Aceptable
Manitol/trehalosa	1,4	53	62	Parte superior parcialmente colapsada
Manitol/rafinosa	1,7	54	77	Elegante
Manitol/arginina	-	-	-	Colapso parcial
Manitol/lisina	-	-	-	Colapso total
Manitol/sorbitol	0,6	<10 °C	63	Elegante
Manitol/glicerol	-	<10 °C	-	Elegante

I.D. de la muestra	Contenido de agua (%)	T _g (°C)	Reconstitución (s)	Apariencia
HES/sacarosa	0,7	86	49	Elegante, pero con encogimiento
Glicina/sacarosa	0,8	54	22	Elegante
Glicina/trehalosa	-	63	18	Elegante
NaCl/sacarosa	0,4	66	11	Elegante (capa en el fondo)
Alanina/sacarosa	0,5	-	57	Elegante

En general, todos los sólidos secados por congelación tuvieron un tiempo de reconstitución aceptable. Sin embargo, todos tuvieron contenidos de humedad residual mayores y temperaturas de transición vítrea menores que las deseadas, especialmente las formulaciones basadas en manitol. Además, los datos de difracción de rayos X de polvo (los datos no se muestran) mostraron evidencias de picos de manitol hidratado, lo que indica que parte del manitol cristalizó a manitol hidratado, que es difícil de desolvatar. Además, al menos para los sistemas que contienen manitol, la cristalización incompleta del manitol disminuirá significativamente la T_g de la fase amorfa dado que la T_g del manitol amorfo es solo aproximadamente 13 °C.

Estabilidad en el proceso: Todas las formulaciones excepto manitol/lisina se prepararon, se filtraron, se envasaron y se liofilizaron con el uso del proceso descrito en la Tabla 3. La estabilidad en el proceso se estimó por la recuperación de la potencia del rAHF de la formulación inicial. La Figura 1 resume el por ciento de actividad de rAHF después del procesamiento en varias formulaciones con relación a la actividad inicial. La actividad de rAHF en la formulación con manitol/glicerol esencialmente se perdió en su totalidad (99,8 % de pérdida); por lo tanto, los datos para esta formulación no se muestran en la figura. La actividad de rAHF en las formulaciones que contienen manitol/sorbitol y glicina/rafinosa también experimentó pérdidas significativas de la actividad durante el procesamiento. La poca estabilidad de rAHF en el proceso en formulaciones que contienen glicerol y sorbitol se atribuye a las temperaturas de transición vítrea muy bajas, T_g'(<-50 °C) de los sistemas congelados y las T_g' esperadas bajas de los sistemas en el secado secundario. La T_g del sorbitol es -1,6 °C (20) y la del glicerol es incluso más baja.

Estabilidad de almacenamiento: Las muestras secadas por congelación se colocaron en prueba de estabilidad a diferentes temperaturas (-70 °C, 5 °C, 25 °C, 40 °C y 50 °C, 60 °C) durante tiempos seleccionados. En cada punto de tiempo, se extrajeron dos frascos de cada muestra para el ensayo de actividad. La actividad de rAHF en cada punto de tiempo se normalizó respecto a la actividad de las muestras de rAHF de control mantenidas a -70 °C. Este procedimiento garantizó que la variación a largo plazo en el ensayo se cancelara (no se observó dependencia temporal en el ensayo de las muestras almacenadas a -70°). Como es común para la degradación en sólidos amorfos, la degradación siguió una cinética de "tiempo extendido" y fue totalmente consistente con la ecuación lineal,

$$P = P_0 - k\sqrt{t} \quad (1)$$

Donde,

P = Actividad de FVIII en el tiempo t

5 P_0 = Potencia inicial de FVIII (= potencia del control a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$)

k = Constante de velocidad para la degradación

t = tiempo (en meses)

10

La ecuación 1 es consistente con la degradación de una multitud de microestados independientes, que no están en equilibrio en el estado cristalino, cada uno con diferentes velocidades de degradación. Por lo tanto, la constante de velocidad (k) determinada a partir de la ecuación 1 representa una combinación de las constantes de velocidad de una serie de configuraciones proteicas diferentes dentro de la matriz liofilizada, cada una de las cuales se degrada a una velocidad diferente. En general, se espera que la ecuación de velocidad involucre el log de la actividad que es lineal en el tiempo elevado a alguna potencia menor que la unidad, esa potencia es frecuentemente $\frac{1}{2}$, pero en casos de niveles bajos de degradación la ecuación lineal (ecuación 1) es una aproximación válida. En muchas muestras la degradación no es mínima, y de hecho los datos preliminares proporcionados en la Tabla 2, donde el grado de degradación fue particularmente grande, no se ajustaron bien a la ecuación 1 y requirieron la expresión logarítmica. Para varias muestras estudiadas en la presente descripción, podría obtenerse un buen ajuste con la versión logarítmica de la ecuación 1, pero la expresión lineal, la ecuación 1, realmente se ajusta ligeramente mejor a los datos en casi cada caso. Por lo tanto, empíricamente, el uso de la ecuación 1 es aceptable, y es razonable comparar las constantes de velocidad derivadas de esta expresión. La idoneidad de la ecuación 1 para representar los datos se ilustra en la Figura 2 donde el por ciento de pérdida de actividad con relación a la muestra a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ de control se representa gráficamente como una función de la raíz cuadrada del tiempo para dos formulaciones de rAHF almacenadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. La linealidad de los resultados representados en el gráfico fue excelente.

15

20

25

Las constantes de velocidad de degradación de rAHF en las diversas formulaciones a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ se obtuvieron por análisis de regresión, con el uso de la ecuación 1, y se comparan en la Figura 3. Los resultados muestran que la formulación basada en NaCl fue menos estable que las formulaciones que carecen de NaCl.

30

Selección de las formulaciones candidatas finales: Las siguientes formulaciones se sometieron a análisis adicional debido a sus características preferidas: manitol/arginina, glicina/trehalosa y manitol/trehalosa. La formulación con manitol/trehalosa comprende una modalidad preferida porque produce una torta elegante y la trehalosa tiene una temperatura de transición vítrea muy alta ($-117\text{ }^{\circ}\text{C}$) y por lo tanto estará menos sujeta a problemas de temperatura de transición vítrea si aumentara el agua residual, como por ejemplo por medio de la absorción de agua por los tapones durante el almacenamiento. Además, el manitol es fácilmente cristizable, y la falta de cristalización completa tiene un impacto menos grave sobre la T_g' que la cristalización incompleta de la glicina, un resultado directo de la T_g' mucho menor para la glicina que para el manitol.

35

40

Minimización de la oxidación: Las funciones del glutatión y la histidina

La oxidación es una vía mediante la cual los productos de rAHF pierden su actividad funcional. La N-acetil-L-cistina, el ácido lipoico, y/o el glutatión reducido son estabilizantes adecuados para el uso en una modalidad preferida de la descripción, siendo el glutatión el antioxidante más eficaz (los datos no se muestran). En consecuencia, se añadió $0,2\text{ mg/ml}$ de glutatión reducido a las formulaciones en estudio.

45

Tabla 5. Proceso, formulación, y características físicas para la formulación basada en Manitol: Trehalosa con tampón de histidina y antioxidante glutatión.

5	Ciclo de secado por congelación	Formulación	Características
	<u>Congelación:</u>		
10	1. Aplicar rampa a la platina a 0,5 °C/min. hasta -5 °C; mantener durante ½ h.	<u>Tampón:</u> • 25 mM de Histidina	• Agua residual: 0,2±0,02 %
15	2. Aplicar rampa a la platina a 0,5 °C/min. hasta -40 °C; mantener durante 1 h.	•0,2 g/L de Glutatión •0,03 % de Tween-80	•T _g : 69±2 °C
20	3. Aplicar rampa a la platina a 0,5 °C/min. hasta -22 °C; mantener durante 3 h.	•225 mM de NaCl •4 mM de CaCl ₂ ·2H ₂ O	•Apariencia elegante
25	4. Aplicar rampa a la platina a 0,5 °C/min. hasta -55 °C; mantener durante 1,5 h.	•PH=7	
30	5. Aplicar rampa a la platina a 0,5 °C/min. hasta -33 °C; mantener durante 4 h.	<u>Formulación:</u> •Tampón	
35	6. Aplicar rampa a la platina a 0,5 °C/min. hasta -45 °C; mantener durante 1 h.	+2 % de Trehalosa +8 % de Manitol	
	<u>Secar</u>	+77,4 U/ml de rAHF	
40	1. Ajustar la presión de la cámara a 65 mTorr, y aplicar rampa a la platina a 0,5 °C/min hasta -35 °C; mantener durante 90 h. Temperatura del producto ≈ - 41 °C.		
45	2. Aplicar rampa a la platina a 0,2 °C/min. hasta 40 °C; mantener durante 3 h.		
	3. Aplicar rampa a la platina a 0,2 °C/min. hasta 45 °C; mantener durante 3 h.		
	4. Aplicar rampa a la platina a 0,2 °C/min. hasta 50 °C; mantener durante 3 h.		
	TIEMPO DE CICLO TOTAL: 113 h		

50 Las formulaciones estudiadas incluyeron uno o más de los siguientes tampones: TRIS, histidina y/o HEPES.

Aunque el pKa de la histidina es demasiado bajo para un tamponamiento óptimo a pH 7, la histidina era atractiva debido a que se especulaba que la histidina podría actuar como un quelante de hierro, lo que limitaría de este modo la oxidación catalizada por hierro. Otra ventaja potencial de la histidina respecto al hepes es su T_g inherente (37 °C) mayor que la de HEPES (11 °C), lo que contribuye por lo tanto a una mayor temperatura de transición vítrea en las tortas secadas por congelación finales. Generalmente se reconoce que la adición de glutatión mejora la estabilidad de almacenamiento, los resultados que se muestran en la Figura 4 son típicos. En la Figura 4, se realiza una comparación respecto a la pérdida en el procesamiento y la pérdida durante 9 meses de almacenamiento a 25 °C para cuatro formulaciones con glicina/trehalosa. La degradación en el proceso fue esencialmente la misma para todas las formulaciones. La formulación "Básica", sin histidina o glutatión, fue claramente la menos estable durante el almacenamiento, pero las otras tres formulaciones, todas las cuales incluían glutatión, mostraron el mismo nivel de degradación durante el almacenamiento a 25 °C. Es decir, tanto la formulación "Básica" más el quelante de hierro, deferoxamina, como la formulación "Básica" más 10 mM de HEPES proporcionaron la misma estabilidad que la formulación con histidina.

65 Una alternativa de formulación simple: Formulaciones de disacárido solo sin NaCl (ejemplo de la invención)

Se examinaron las características del secado por congelación y la estabilidad de las formulaciones cuando se eliminó el NaCl. El NaCl se eliminó de la BDS por diálisis contra un tampón sin NaCl. La BDS resultante contenía en una modalidad, cantidades trazas de NaCl y en otra modalidad, no contenía NaCl. Las composiciones tamponantes y las composiciones de formulación, así como las características físicas de los productos secados por congelación, y el proceso usado se proporcionan en la Tabla 6.

Aun con el uso del ciclo de secado por congelación no optimizado, las formulaciones con excipientes donde se eliminó el NaCl y sin adición de NaCl como excipiente durante la preparación de la formulación final antes de la liofilización, especialmente la formulación basada en trehalosa, proporcionaron productos con un contenido de humedad residual extremadamente bajo y valores de T_g altos, todo con un proceso que era sustancialmente más corto que el necesario para las formulaciones donde se añadió NaCl como excipiente (83 h vs 113 h, ver las Tablas 5 y 6).

Tabla 6. Proceso, formulación, y características físicas de formulaciones basadas en trehalosa y sacarosa sin agente de relleno o NaCl.

Ciclo de secado por congelación	Formulaciones	Agua residual, %	T_g (°C)
<u>Congelación:</u>	<u>Tampón:</u>		
1. Aplicar rampa a la platina a 1,0 °C/min. hasta -5 °C; mantener durante 20 min.	25 mM de Histidina 0,2 mg/ml de Glutati3n		
2. Aplicar rampa a la platina a 1,0 °C/min. hasta -43 °C; mantener durante 1 h.	0,03 % de Tween-80, 4 mM de CaCl ₂ .2H ₂ O PH=7		
<u>Secado:</u>			
1. Ajustar la presi3n de la c3mara a 45 mTorr y aplicar rampa a la platina a 1,0 °C/min hasta -30 °C; mantener durante 70 h. Temperatura del producto ≈ -41 °C.	<u>Formulaci3n 1:</u>	0,05±0,02	114±2
	Tamp3n+5 % de trehalosa +53,4 IU/ml de rAHF		
2. Aplicar rampa a la platina a 0,1 °C/min. hasta 40 °C; mantener durante 4 h.	<u>Formulaci3n 2:</u>		
	Tamp3n+5 % de sacarosa +54,2 IU/ml de rAHF	0,11±0,01	80±2
3. Aplicar rampa a la platina a 0,1 °C/min. hasta 45 °C; mantener durante 4 h			
4. Aplicar rampa a la platina a 0,1 °C/min. hasta 50 °C; mantener durante 4 h			
TIEMPO DE CICLO TOTAL: 83 h			

La estabilidad de almacenamiento de rAHF en las formulaciones solo con disac3rido donde se elimin3 el NaCl de la BDS se compar3 con la estabilidad en una formulaci3n donde la adici3n de NaCl como excipiente a la BDS fue m3nima como se muestra en la Figura 5. Todas las formulaciones contienen glutati3n e histidina y solo difieren en la presencia de agente de relleno (manitol) y NaCl, as3 como una concentraci3n de rAHF ligeramente m3s baja en la formulaci3n solo con disac3rido debido a la p3rdida (o diluci3n) que se produjo en la di3lisis. Las formulaciones donde se elimin3 el NaCl y no se a3nadi3 NaCl a la BDS como excipiente durante la formulaci3n, se secaron por congelaci3n m3s r3pidamente que las formulaciones donde se a3nadi3 NaCl como excipiente y dieron como resultado un producto elegante. Adem3s, la estabilidad es significativamente mejor sin NaCl, particularmente para la formulaci3n con trehalosa a 40 ° y 60 °C. Dados los datos en la Figura 5, y asumiendo un comportamiento de Arrhenius, la constante de velocidad a 25 °C es 3,0 (tiempo en meses) para la formulaci3n que contiene NaCl, mientras que la constante de velocidad correspondiente para la formulaci3n solo con trehalosa es 1,44. Esta diferencia se traduce en que es necesario un per3odo de tiempo de 4 a3os para que la formulaci3n con trehalosa y sin NaCl se degrade en 10 % pero solo 11 meses para que la formulaci3n que incluye NaCl se degrade en 10 %. En resumen, la estabilidad a temperatura ambiente es una realidad despu3s de la eliminaci3n del NaCl por di3lisis y sin adici3n de NaCl despu3s de la di3lisis como excipiente de formulaci3n, con el resultado de que el per3odo de tiempo de liofilizaci3n se acorta.

Considerando lo anterior, en una modalidad de la descripción se proporciona una formulación de acuerdo con la Tabla 6.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica liofilizada estable de Factor VIII (FVIII) que comprende: (a) un FVIII; (b) uno o más agentes tamponantes; (c) uno o más antioxidantes; (d) uno o más agentes estabilizantes; y (e) uno o más surfactantes; en donde la formulación se prepara mediante la liofilización de una solución que comprende
 - (a) dicho FVIII que comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - a) un polipéptido FVIII recombinante;
 - b) un análogo, fragmento o variante de a) biológicamente activo;
 - (b) un tampón que comprende dicho agente tamponante de pH en un intervalo de 0,1 mM a 500 mM y que mantiene un pH en un intervalo de 2,0 a 12,0;
 - (c) dicho antioxidante a una concentración de 0,005 a 1,0 mg/ml;
 - (d) dicho agente estabilizante a una concentración de 0,005 a 20 %;
 - (e) dicho surfactante a una concentración de 0,001 % a 1,0 %; y
 dicha formulación excluye cloruro de sodio (NaCl) o incluye solamente una cantidad traza de NaCl.
2. La formulación de conformidad con la reivindicación 1 en donde el agente tamponante se selecciona del grupo que consiste en citrato, glicina, histidina, HEPES, Tris y combinaciones de estos agentes.
3. La formulación de conformidad con la reivindicación 1 o 2 en donde el pH de la solución está en el intervalo de 6,0 a 8,0, por ejemplo 6,5 a aproximadamente 7,5.
4. La formulación de conformidad con la reivindicación 1 en donde el agente tamponante es histidina y el pH de la solución es aproximadamente 7,0.
5. La formulación de cualquier reivindicación anterior en donde el antioxidante es glutatión.
6. La formulación de conformidad con la reivindicación 5 en donde el antioxidante está a un intervalo de concentración de 0,1 a 0,5 mg/ml, por ejemplo aproximadamente 0,2 mg/ml en la solución.
7. La formulación de conformidad con la reivindicación 1 en donde el agente tamponante de la solución es histidina y el pH es aproximadamente 7,0; y en donde el antioxidante es glutatión a una concentración de aproximadamente 0,2 mg/ml en la solución.
8. La formulación de cualquier reivindicación anterior en donde el uno o más agentes estabilizantes se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, y rafinosa, y combinaciones de estos agentes estabilizantes.
9. La formulación de conformidad con la reivindicación 8 en donde los agentes estabilizantes son trehalosa a una concentración de aproximadamente 5 % en la solución y cloruro de calcio a una concentración de aproximadamente 4 mM en la solución.
10. La formulación de conformidad con la reivindicación 8 en donde los agentes estabilizantes son sacarosa a una concentración de aproximadamente 5 % en la solución y cloruro de calcio a una concentración de aproximadamente 4 mM en la solución.
11. La formulación de cualquier reivindicación anterior en donde el surfactante se selecciona del grupo que consiste en digitonina, Tritón X-100, Tritón X-114, TWEEN-20, TWEEN-80 y combinaciones de estos surfactantes.
12. La formulación de conformidad con la reivindicación 11 en donde el surfactante es TWEEN-80 a aproximadamente 0,03 % en la solución.
13. La formulación de conformidad con la reivindicación 1 en donde el agente tamponante es histidina a una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente pH 7,0 en la solución; en donde el antioxidante es glutatión a una concentración de aproximadamente 0,2 mg/ml en la solución; en donde los agentes estabilizantes son trehalosa o sacarosa a una concentración de aproximadamente 5 % en la solución y cloruro de calcio a una concentración de aproximadamente 4 mM en la solución; y en donde el surfactante es TWEEN-80 a aproximadamente 0,03 % en la solución.
14. La formulación de cualquier reivindicación anterior en donde el NaCl no se añade como excipiente.

15. La formulación de conformidad con la reivindicación 1 en donde el cloruro de sodio está presente en una cantidad traza después de su eliminación por diálisis o cromatografía de intercambio de solvente.
- 5 16. Un método para preparar un FVIII liofilizado, estable que comprende las etapas de
(a) preparar una formulación líquida acuosa que tiene los constituyentes (a) a (e) definidos en la reivindicación 1;
y
(b) liofilizar la formulación de la etapa (a).
- 10 17. El método de acuerdo con la reivindicación 16 en donde la estabilidad del FVIII liofilizado es mayor en comparación con una formulación de FVIII que se liofiliza en presencia de NaCl.

Figura 1

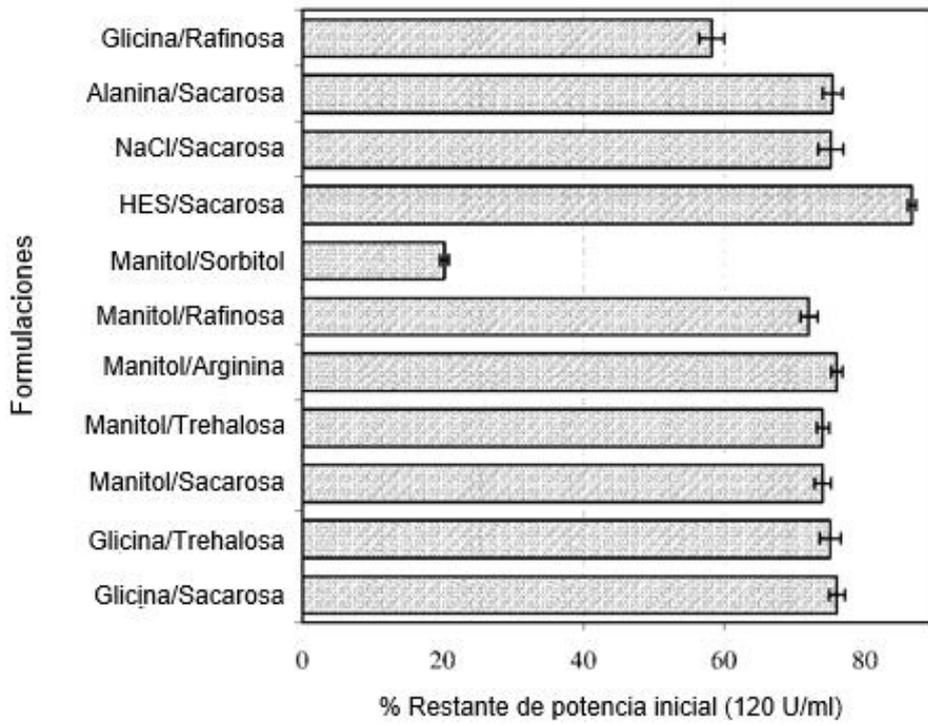


Figura 2

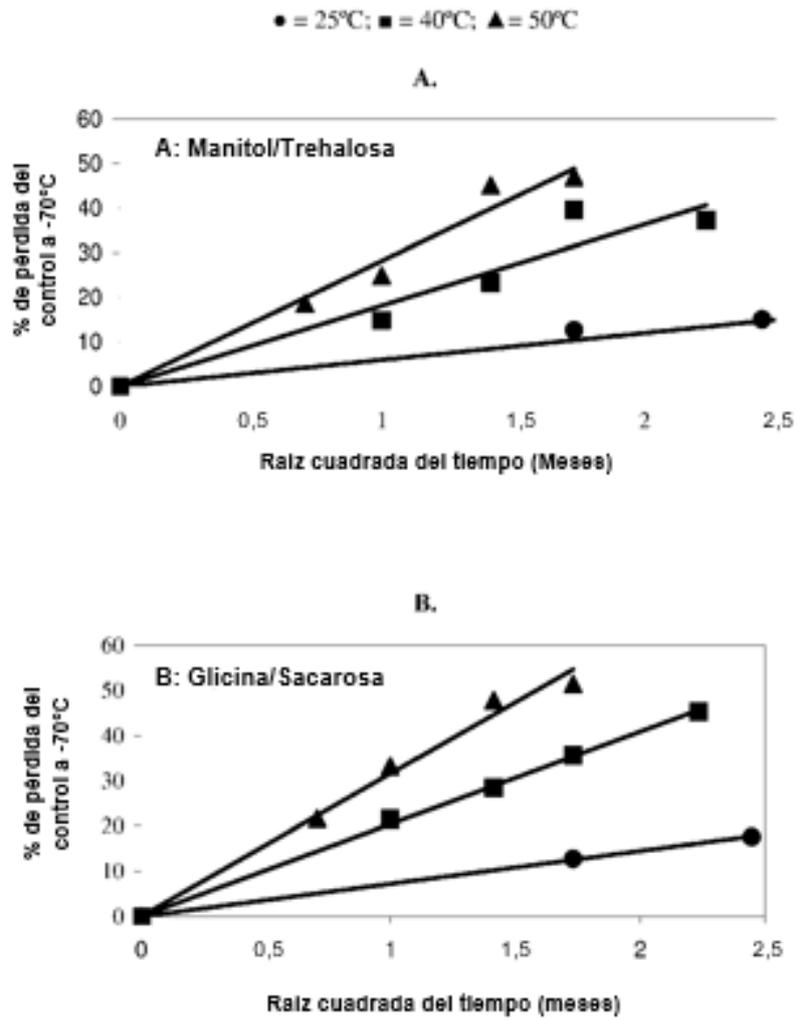


Figura 3

Leyenda: barras abiertas = 50 °C, barras sombreadas = 40 °C, barras sólidas = 25 °C. Las barras de error representan los errores estándar proporcionados por el análisis de regresión. En general, los tiempos de almacenamiento máximos fueron 3 meses (50 °C), 6 meses (40 °C), y 12 meses (25 °C).

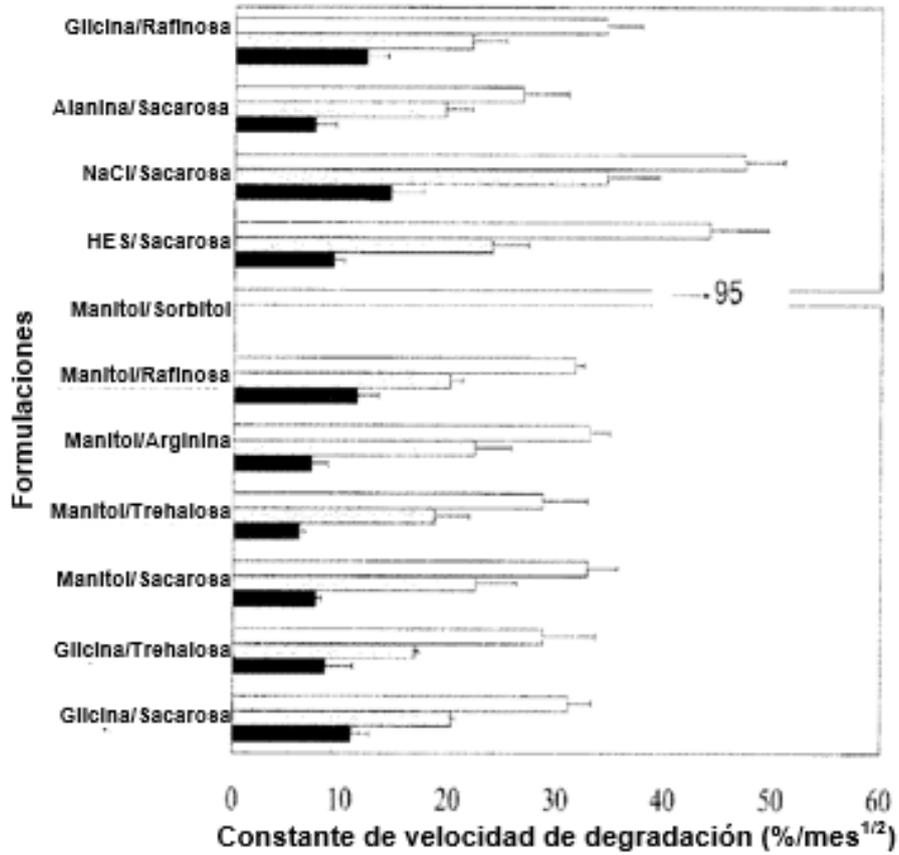


Figura 4

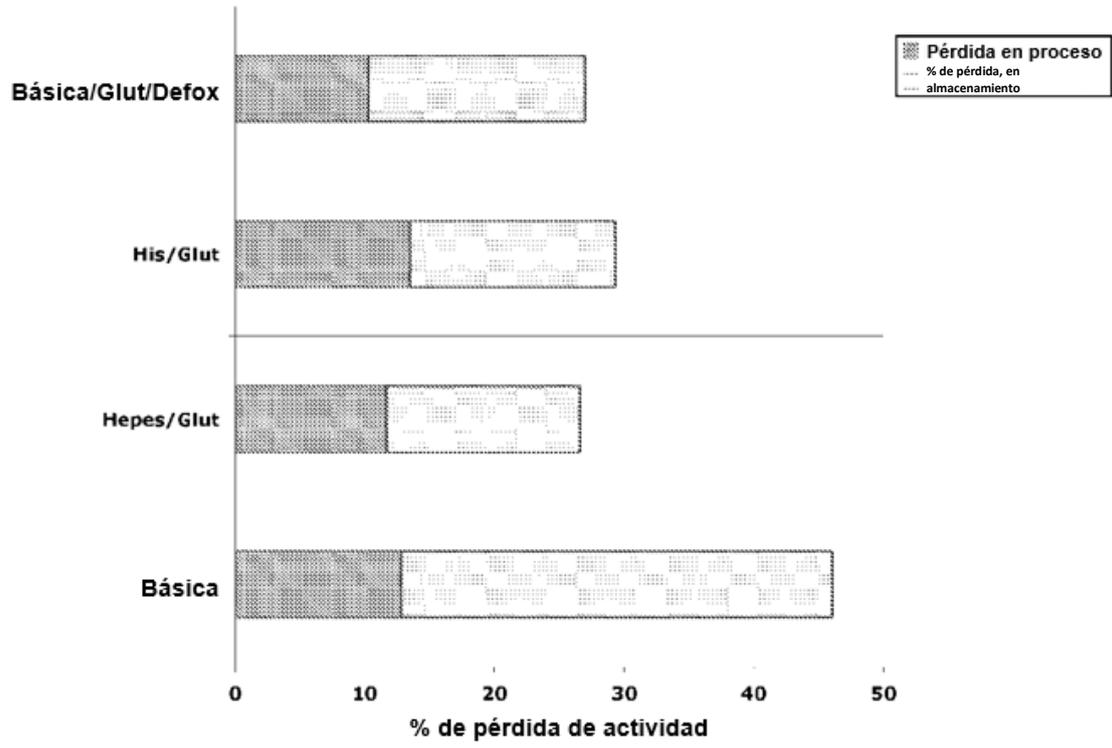


Figura 5

Leyenda: Barra sólida = Manitol:Trehalosa (sin NaCl), Barra sombreada = 5 % de Trehalosa, Barra abierta = 5 % de Sacarosa

