

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 698**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 9/19</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/37</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/755</b>	(2006.01)
<b>F26B 3/12</b>	(2006.01)
<b>F26B 11/04</b>	(2006.01)
<b>F26B 5/06</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2016 PCT/EP2016/076640**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2017 WO17080915**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016 E 16791576 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3373912**

54 Título: **Procedimiento de producción de gránulos liofilizados que comprenden el factor VIII**

30 Prioridad:

**12.11.2015 EP 15194340**

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

**28.07.2020**

73 Titular/es:

**BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT  
(100.0%)  
Müllerstrasse 178  
13353 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**OLBRICH, CARSTEN;  
PLITZKO, MATTHIAS;  
LUY, BERNHARD y  
SCHNEID, STEFAN CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 775 698 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

Procedimiento de producción de gránulos liofilizados que comprenden el factor VIII

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de gránulos liofilizados que comprenden el factor VIII, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) congelar gotitas de una solución que comprende factor VIII para formar gránulos; y b) liofilizar los gránulos.

El factor VIII (FVIII) es una proteína que se encuentra en el plasma sanguíneo, que actúa como cofactor en la cascada de reacciones que conducen a la coagulación de la sangre. Una deficiencia en la cantidad de actividad de FVIII en la sangre da como resultado el trastorno de coagulación conocido como hemofilia A, una afección hereditaria que afecta principalmente a los varones. La hemofilia A se trata actualmente con preparaciones terapéuticas de FVIII derivadas de plasma humano o fabricadas utilizando tecnología de ADN recombinante. Dichas preparaciones se administran en respuesta a un episodio de sangrado (terapia a demanda) o a intervalos regulares frecuentes para prevenir el sangrado incontrolado (profilaxis).

Un procedimiento convencional para fabricar y envasar productos biofarmacéuticos parenterales implica la formulación de una solución a granel de acuerdo con la actividad biológica medida del material intermedio utilizado para formular la solución a granel. En muchos casos, particularmente al final del procedimiento, la solución a granel se congela y se almacena para realizar el ensayo. Con este fin, la solución congelada puede almacenarse durante varios días o incluso durante varias semanas. Para el posterior llenado de los envases finales, tales como viales, para su distribución a los usuarios finales, la solución intermedia congelada generalmente se descongela, se acumula y se carga en viales, y a continuación se liofiliza dentro de los viales.

La cantidad de solución a granel descongelada que se carga en los viales de envasado final se calcula sobre la base del ensayo de la solución intermedia. Este cálculo generalmente incorpora un gran margen de seguridad debido a (1) una gran variación del ensayo biológico y (2) pérdida de rendimiento en el posterior procedimiento de llenado y liofilización estéril. La pérdida de rendimiento se debe a la tensión del producto durante esta primera etapa de congelación, almacenamiento y descongelación, y el posterior segundo procedimiento de llenado, congelación y secado. Por supuesto, este cálculo es muy difícil y se basa en el conocimiento empírico dependiente del producto del procedimiento completo.

En los procedimientos convencionales, la liofilización se realiza generalmente en cámaras de liofilización estándar que no tienen paredes con temperatura controlada. Estos secadores, lamentablemente, proporcionan transferencia de calor no homogénea a los viales colocados en la cámara del secador. Especialmente los viales que se colocan en los bordes intercambian energía más intensamente que aquellos ubicados en el centro de las placas, debido al intercambio de calor radiante y por convección natural en el espacio entre la pared de la cámara y la pila de placas/estantes. Esta falta de uniformidad en la distribución de energía conduce a una variación de la cinética de congelación y secado entre los viales en los bordes y en el centro, y podría dar lugar a una variación en las actividades de los contenidos activos de los viales respectivos. Para garantizar la uniformidad del producto final, es necesario realizar un amplio trabajo de desarrollo y validación tanto a escala de laboratorio como de producción.

La publicación de Wang, D. Q., MacLean, D. y Ma, X. (2010) titulado Process Robustness in Freeze Drying of Biopharmaceuticals, en Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals (eds F. Jameel and S. Hershenson), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, Estados Unidos, desvela ciclos específicos de liofilización para el FVIII recombinante, pero aún reconoce variaciones de potencia en función de la posición del vial en la cámara de liofilización.

El documento WO 2010/054238 A1 informa sobre una formulación farmacéutica liofilizada estable de Factor VIII (FVIII) que comprende: (a) un FVIII; (b) uno o más agentes tampón; (c) uno o más antioxidantes; (d) uno o más agentes estabilizantes; y (e) uno o más tensioactivos; dicho FVIII comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: a) un polipéptido FVIII recombinante; b) un análogo, fragmento o variante biológicamente activo de a); comprendiendo dicho tampón un agente tampón de pH en un intervalo de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 500 mM y dicho pH está en un intervalo de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 12,0; dicho antioxidante está en una concentración de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1,0 mg/ml; dicho agente estabilizante está a una concentración de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 20 %; dicho tensioactivo está a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 1,0 %; y dicha formulación excluye cloruro de sodio (NaCl) o incluye solo una pequeña cantidad de NaCl.

El documento WO 2006/008006 A1 se refiere a un procedimiento para la fabricación estéril, incluyendo liofilización, almacenamiento, análisis y llenado de productos biofarmacéuticos granulados en recipientes finales, tales como viales. Se desvela un procedimiento para producir recipientes de un producto liofilizado, comprendiendo el procedimiento las etapas de congelar pequeñas gotas del producto para formar gránulos, liofilizar los gránulos, analizar los gránulos liofilizados y cargar los gránulos liofilizados en recipientes. De manera más específica, el procedimiento comprende las etapas de: a) congelar las pequeñas gotas del producto para formar gránulos, por el cual las gotas pequeñas se forman haciendo pasar una solución del producto a través de boquillas asistidas por frecuencia y los gránulos se forman a partir de dichas gotas pequeñas haciéndolas pasar a través de un flujo de gas

criogénico a contracorriente; b) liofilizar los gránulos; c) almacenar y homogeneizar los gránulos liofilizados; d) analizar los gránulos liofilizados mientras se almacenan y homogeneizan; y e) cargar los gránulos liofilizados en dichos recipientes.

5 El documento WO 2013/050156 A1 describe una línea de procedimiento para la producción de partículas liofilizadas en condiciones cerradas, que comprende al menos una cámara de pulverización para la generación de gotas y congelación de las gotas líquidas para formar partículas y un secador por congelación a granel para liofilizar las partículas, comprendiendo el liofilizador un tambor rotativo para recibir las partículas. Adicionalmente, se proporciona una sección de transferencia para una transferencia de producto desde la cámara de pulverización al liofilizador. Para la producción de las partículas en condiciones cerradas de extremo a extremo, cada uno de los dispositivos y la  
10 sección de transferencia se adapta por separado para la operación, preservando la esterilidad del producto que se va a liofilizar y/o contener.

15 El documento WO 2013/050161 A1 desvela una línea de procedimiento para la producción de partículas liofilizadas en condiciones cerradas, comprendiendo la línea de procedimiento un liofilizador para la producción a granel de partículas liofilizadas en condiciones cerradas, comprendiendo el liofilizador un tambor giratorio para recibir las partículas congeladas y una cámara de vacío estacionaria que aloja el tambor giratorio, en el que para la producción de las partículas en condiciones cerradas, la cámara de vacío está adaptada para la operación cerrada durante el procesamiento de las partículas. El tambor está en comunicación abierta con la cámara de vacío y se proporciona al menos una sección de transferencia para una transferencia de producto entre un dispositivo separado de la línea de procedimiento y el liofilizador, estando el liofilizador y la sección de transferencia adaptadas por separado para la  
20 operación cerrada, en la que la sección de transferencia comprende una superficie de pared interior de temperatura controlable.

Sería deseable producir gránulos liofilizados de factor VIII con menos variaciones en la actividad de los gránulos individuales en condiciones de separación estricta del exterior; esto incluye cualquier gas criogénico, tal como nitrógeno líquido. La presente invención tiene el objeto de proporcionar dicho procedimiento.

25 Este objeto se consigue según la presente invención mediante un procedimiento para la producción de gránulos liofilizados que comprenden factor VIII, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- a) congelar gotitas de una solución que comprende factor VIII para formar gránulos;
- b) liofilizar los gránulos;

30 en el que en la etapa a) las gotas pequeñas se forman por medio de la formación de gotas pequeñas de la solución que comprende factor VIII en una torre de refrigeración que tiene una superficie de la pared interna de temperatura controlable y una temperatura interior por debajo de la temperatura de congelación de la solución y en la etapa b) los gránulos se liofilizan en un recipiente giratorio que se encuentra dentro de una cámara de vacío.

35 El principio operativo del procedimiento de acuerdo con la invención tiene tres ventajas distintas. En primer lugar, debe observarse que en el procedimiento de acuerdo con la invención, las gotas pequeñas pulverizadas de la solución que comprende factor VIII no contactan con un gas criogénico a contracorriente, tal como se describe en el documento WO 2006/008006 A1. No es necesario introducir un gas criogénico en el espacio interior de la torre de refrigeración y, por lo tanto, se pueden omitir todas las etapas de manipulación y esterilización del gas criogénico.

40 En segundo lugar, al realizar la etapa de liofilización en un receptáculo giratorio dentro de la cámara de vacío, la posición espacial de cada gránulo individual se distribuye uniformemente a lo largo del tiempo. Esto garantiza condiciones de secado uniformes y, por lo tanto, elimina las variaciones espaciales de la actividad del factor VIII, como sería el caso de los viales liofilizados en una rejilla.

45 En tercer lugar, se descubrió experimentalmente que los gránulos producidos de acuerdo con la presente invención exhiben microcolapsos menores debido a que las condiciones generales del procedimiento a las que están expuestos los polipéptidos de FVIII son, de media, más suaves que los de la técnica anterior. Dicha disminución de la aparición de microcolapsos de los gránulos es visible en las imágenes REM de dichos gránulos que muestran una superficie más homogénea, lo que de nuevo da como resultado mejores propiedades de manipulación en etapas posteriores del procedimiento para esos gránulos.

50 La comparación directa con el procedimiento en cuanto a la divulgación del documento WO 2006/008006 A1 mostró, sorprendentemente, que la morfología superficial de los gránulos resultantes de la presente invención es significativamente más homogénea que la morfología superficial de los gránulos derivados del procedimiento WO 2006/008006 A1 y el procedimiento de la presente invención produce gránulos con una superficie específica aumentada adicional (BET-), mientras que los gránulos del procedimiento WO 2006/008006 A1 ya tenían una homogeneidad mejorada y una superficie específica en comparación con cualquier procedimiento de liofilización conocido de la técnica anterior.

55 Experimentalmente, se ha descubierto que las potencias reales de los gránulos después de la liofilización están entre 86,2 % y 89,9 % de las potencias objetivo para el factor VIII.

Todas las etapas del procedimiento de acuerdo con la invención pueden llevarse a cabo en condiciones estériles y sin comprometer la esterilidad entre las etapas individuales.

5 La creación de gránulos congelados se puede realizar con cualquiera de las tecnologías conocidas, tal como con un "Encapsulator Research" de Inotech Encapsulation, Suiza, o "Kryogen Rapid Pelletizer" de Messer-Griesheim, Alemania o "CRYOGENIC PELLETIZER" de IQFCRYOGRAN, Canadá. Sin embargo, estas técnicas de la técnica anterior se basan principalmente en dejar caer las gotas pequeñas en nitrógeno líquido para formar gránulos después del secado.

10 Debido a la posterior etapa de liofilización, se espera que los gránulos congelados tengan un tamaño de partícula estrecho. Posteriormente, los gránulos congelados se pueden transportar en condiciones estériles y frías a un liofilizador. Los gránulos se distribuyen después a través de las superficies de transporte dentro de la cámara de secado mediante la rotación del receptáculo. El secado por sublimación es en principio posible en cualquier tipo de liofilizador adecuado para gránulos. Son preferentes los liofilizadores que proporcionan espacio para el flujo de vapor de sublimación, temperaturas de pared controladas y áreas de sección transversal adecuadas entre la cámara de secado y el condensador.

15 Más adelante se describen los detalles de las variantes del factor VIII que pueden emplearse en el procedimiento de acuerdo con la invención. Preferentemente, se usa un factor VIII recombinante de células renales de hámster neonato sin proteínas adicionales.

20 En el presente documento, 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 está asociada con el FVIII nativo. En una realización de la divulgación, la molécula de FVIII es FVIII de longitud completa. La molécula de FVIII es una proteína que está codificada por secuencias de ADN capaces de hibridar con el ADN que codifica FVIII. Dicha proteína puede contener deleciones de secuencia en varios sitios entre o dentro de los dominios A1-A2-B-A3-C1-C2 (patente de Estados Unidos n.º 4,868,112). La molécula de FVIII también puede ser un análogo del FVIII nativo, en el que se han sustituido uno o más restos de aminoácidos mediante mutagénesis dirigida a sitio.

25 Según la presente divulgación, la expresión "Factor VIII recombinante" (rFVIII) puede incluir cualquier rFVIII, heterólogo o de origen natural, obtenido mediante tecnología de ADN recombinante, o un derivado biológicamente activo del mismo. En ciertas realizaciones, el término abarca proteínas como se ha descrito anteriormente y ácidos nucleicos, que codifican un rFVIII de la divulgación. Dichos 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 el presente documento, proteínas codificadas por un ácido nucleico descrito anteriormente, homólogos entre especies 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 de 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 2.332 aminoácidos para la proteína nativa madura), con un polipéptido codificado por un ácido nucleico referenciado o una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento; y/o (2) se unen específicamente a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales, generados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos referenciada como se describe en el presente documento, un fragmento inmunogénico del mismo, y/o una variante del mismo modificada de forma conservadora.

45 Como se usa en el presente documento, "FVIII endógeno" incluye FVIII que se origina en el mamífero destinado a recibir tratamiento. El término también incluye FVIII transcrito a partir de un transgén o cualquier otro ADN extraño presente en dicho mamífero. Como se usa en el presente documento, "FVIII exógeno" incluye FVIII que no se origina en dicho mamífero.

50 La molécula de FVIII existe de forma natural y en preparaciones terapéuticas como una distribución heterogénea de polipéptidos que surgen de un solo producto génico (véase, por ejemplo, Andersson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2979-2983, May 1986). El término "Factor VIII" como se usa en el presente documento se refiere a todos esos polipéptidos, ya sea derivados del plasma sanguíneo o producidos mediante el uso de técnicas de ADN recombinante e incluyen, pero sin limitaciones, miméticos del FVIII, conjugados de fc-FVIII, FVIII modificado químicamente con polímeros solubles en agua y otras formas o derivados de FVIII. Los ejemplos comercialmente disponibles de preparaciones terapéuticas que contienen FVIII incluyen las vendidas con los nombres comerciales de HEMOFILM y RECOMBINATE (disponibles en Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, Ill., EE.UU.). Otras preparaciones comprenden principalmente una subpoblación única de moléculas de FVIII, que carecen de la porción del dominio B de la molécula.

55 El material de partida de la presente divulgación es FVIII, que puede derivarse de plasma humano o producirse mediante técnicas de ingeniería recombinante, como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 4,757,006;

patente de los Estados Unidos n.º 5,733,873; patente de los Estados Unidos n.º 5,198,349; patente de los Estados Unidos n.º 5,250,421; patente de los Estados Unidos n.º 5,919,766; documento EP 306 968.

5 Las moléculas de FVIII útiles para la presente divulgación incluyen la proteína de longitud completa, precursores de la proteína, subunidades o fragmentos biológicamente activos o funcionales de la proteína, y derivados funcionales de la misma, así como a sus variantes como se describe más adelante en el presente documento. Se hace referencia a FVIII para incluir todas las formas potenciales de tales proteínas y en las que cada una de las formas de FVIII tiene al menos una porción o toda la secuencia de dominio B nativa intacta.

10 Los polinucleótidos que codifican un rFVIII de la divulgación incluyen, aunque no de forma limitativa, los que (1) hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos referenciada como se describe en el presente documento, y variantes modificadas de forma conservadora de la misma; (2) tienen una secuencia de ácido nucleico que tiene más de aproximadamente el 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o mayor 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 6.996 nucleótidos de la proteína madura), con una secuencia de ácido nucleico de referencia como se describe en el presente documento.

15 Los polipéptidos variantes (o análogos) incluyen variantes de inserción, en las que uno o más restos de aminoácidos se añaden a una secuencia de aminoácidos de FVIII de la divulgación. Las inserciones se pueden localizar en uno cualquiera o en ambos extremos de la proteína y/o pueden encontrarse dentro de las regiones internas de la secuencia de aminoácidos del FVIII. Las variantes de inserción, con restos adicionales en uno o ambos extremos, incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen marcadores 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 forma recombinante en una célula bacteriana como E. coli.

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

25 En las variantes de sustitución, uno o más restos de aminoácidos de un polipéptido de 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 son bien conocidas en la técnica. Como alternativa, la divulgación abarca sustituciones que también son no conservadoras. Las sustituciones conservadoras de ejemplo se describen en Lehninger, [Biochemistry, 2ª Edición; Worth Publishers, Inc., New York (1975), pp.71-77] y se expone inmediatamente a continuación.

30 A continuación se describirán realizaciones y aspectos adicionales de la presente invención. Se pueden combinar libremente a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

35 Para la presente invención cualquier variación delecionada, sustituida y/o de otro tipo del polipéptido FVIII puede procesarse sin la necesidad de una variación adicional del procedimiento mismo. Sin embargo, es relevante para el procedimiento que se procese un polipéptido de FVIII, porque es específico de las formulaciones de FVIII resultantes que comprenden solo una fracción menor del polipéptido de FVIII real en comparación con la cantidad total de los constituyentes de las mismas.

40 A partir de ello, es evidente que el procedimiento debe ser tal que cualquier daño potencial al polipéptido de FVIII liofilizado como parte de la fórmula se evite porque una ligera disminución de la actividad del polipéptido de FVIII en la fórmula finalmente liofilizada da como resultado un impacto de porcentaje alto de la actividad en el producto final.

45 En una realización del procedimiento según la invención, el procedimiento comprende además las etapas c), d) y e) después de la etapa b):

c) almacenar y homogeneizar los gránulos liofilizados

d) analizar los gránulos liofilizados mientras se almacenan y homogeneizan;

e) cargar los gránulos liofilizados en recipientes.

50 La etapa c) de almacenamiento y homogeneización también se pueden realizar en el receptáculo giratorio dentro de la cámara de vacío usada para la liofilización. Se extrae un número estadísticamente relevante de muestras para realizar un ensayo. Después de ello, el recipiente de almacenamiento separado opcional se envasa en un recipiente estéril. Después de analizar el contenido de cada recipiente de almacenamiento, todas las propiedades necesarias, tales como, por ejemplo, el contenido de principios activos, se conocen. A continuación, puede comenzar el procedimiento de llenado en los recipientes finales con las cantidades de gránulos definidas por el usuario. Los recipientes de almacenamiento se transfieren a una línea de llenado aislada y se acoplan en una estación de

acoplamiento estéril. El contenido de los recipientes se transfiere dentro del aislador al almacenamiento de la máquina de llenado.

5 En otra realización del procedimiento de acuerdo con la invención en la etapa a), las gotas pequeñas se forman por medio de la formación de gotas pequeñas de la solución pasando a través de boquillas asistidas por frecuencia. Preferentemente, la frecuencia oscilante es  $\geq 1.000$  Hz a  $\leq 2.000$  Hz.

10 Independiente de que la boquilla sea asistida por frecuencia, el diámetro de la boquilla puede estar en el intervalo de 100  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$ , preferentemente, en el intervalo de 200  $\mu\text{m}$  a 400  $\mu\text{m}$ , muy preferentemente en el intervalo de 350  $\mu\text{m}$  a 450  $\mu\text{m}$ . Dichos diámetros de boquilla dan como resultado tamaños de gota pequeña en el intervalo de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1.000  $\mu\text{m}$ , preferentemente en el intervalo de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 900  $\mu\text{m}$ , muy preferentemente en el intervalo de aproximadamente 700  $\mu\text{m}$  a 900  $\mu\text{m}$

En este contexto, un tamaño de "aproximadamente" significa que los tamaños de las gotas pequeñas resultantes no se desvían más de  $\pm 30$  % del tamaño mencionado con respecto al valor  $d_{90}$  de la distribución. Por ejemplo, se entiende que un tamaño de gota pequeña resultante de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  como las gotas pequeñas que se producen que varían en tamaño entre 280  $\mu\text{m}$  y 520  $\mu\text{m}$  con respecto al valor  $d_{90}$  de la distribución.

15 Las gotas pequeñas formadas muestran una cierta distribución del tamaño de las gotas pequeñas alrededor de la mediana de un valor que debería ser aproximadamente el mencionado anteriormente.

En las realizaciones de la invención en las que la boquilla es asistida por frecuencia, la variación alrededor de la mediana del valor es menor. En esas realizaciones, el significado de "aproximadamente" se puede restringir a gotas pequeñas que no se desvían más del  $\pm 30$  % del tamaño mencionado.

20 En el ejemplo mencionado anteriormente, un tamaño de gota pequeña resultante de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  puede entenderse como las gotas pequeñas que se producen varían en tamaño entre 280  $\mu\text{m}$  y 520  $\mu\text{m}$  con respecto al valor  $d_{90}$  de la distribución. En vista de los efectos descritos a continuación, pasar las gotas pequeñas a través de una boquilla asistida por frecuencia es, por lo tanto, una ventaja adicional para reducir aún más el impacto negativo potencial sobre los gránulos liofilizados finales.

25 En general, las gotas pequeñas de los tamaños dados anteriormente son ventajosas, ya que se descubrió que las etapas posteriores b) a e) se pueden realizar con un mayor rendimiento en la actividad de FVIII.

30 Sin desear quedar anclado a ello, se hipotetiza que las gotas más pequeñas se congelan demasiado rápido en la etapa de liofilización b) debido a la relación superficie/volumen mucho mayor y que, por lo tanto, el polipéptido de FVIII frágil se destruye parcialmente. Además, las gotas más pequeñas dan como resultado gránulos más pequeños que tienen una mayor tendencia a quedar cargados electrostáticamente, mientras que esto último se altera con la posterior manipulación de dichos gránulos. Las gotas más grandes no se congelan de manera homogénea, lo que da como resultado la destrucción parcial del polipéptido de FVIII en la cubierta externa del gránulo liofilizado y la liofilización incompleta del compartimento interno de las gotas con la destrucción parcial resultante del polipéptido de FVIII durante el almacenamiento.

35 En otra realización del procedimiento de acuerdo con la invención en la etapa a), la superficie interna de la torre de refrigeración tiene una temperatura no superior a  $-120$  °C, preferentemente  $\geq -150$  °C a  $\leq -120$  °C. Preferentemente, la temperatura es  $\geq -140$  °C a  $\leq -130$  °C.

40 Las temperaturas mencionadas anteriormente de  $\geq -140$  °C a  $\leq -130$  °C están optimizadas para tamaños de gota en el intervalo de aproximadamente  $\geq 700$   $\mu\text{m}$  a aproximadamente  $\leq 900$   $\mu\text{m}$  que se congelan mientras caen una distancia de 3 m a 4 m.

Mientras la temperatura se mantenga por debajo de  $-120$  °C en la superficie interna de la torre de refrigeración, los resultados beneficiosos de la presente invención pueden obtenerse ajustando la distancia de caída y el tamaño de la gota.

45 En otra realización del procedimiento de acuerdo con la invención, la superficie interna de la torre de refrigeración se enfría haciendo pasar un refrigerante a través de una o más tuberías que están en contacto térmico con la superficie interna. El refrigerante puede ser nitrógeno líquido o vapor de nitrógeno de una temperatura deseada.

50 En otra realización del procedimiento de acuerdo con la invención, se establece una dosis objetivo para el factor VIII, el ensayo en la etapa d) determina el contenido activo del factor VIII en los gránulos liofilizados y los recipientes se cargan con una cantidad de gránulos liofilizados que proporciona una dosis que es igual a la dosis objetivo o excede la dosis objetivo en  $\leq 25$  %. Preferentemente, la dosis objetivo se supera en  $\leq 10$  %, más preferentemente en  $\leq 5$  %.

Es un resultado directo de la presente invención que permite una congelación suave del polipéptido de FVIII que permite no exceder drásticamente la dosis objetivo después del llenado, porque el procedimiento no disminuye la actividad del polipéptido de FVIII.

En otra realización del procedimiento según la invención, los gránulos obtenidos en la etapa a) tienen un máximo de

la distribución de tamaño de partícula  $d_{50}$  de aproximadamente  $\geq 200 \mu\text{m}$  a aproximadamente  $\leq 1.500 \mu\text{m}$ . Se prefiere un máximo de la distribución de tamaño de partícula  $d_{50}$  de aproximadamente  $\geq 700 \mu\text{m}$  a aproximadamente  $\leq 900 \mu\text{m}$ .

5 Los gránulos de un tamaño más pequeño que  $200 \mu\text{m}$  son menos favorables, ya que en esos gránulos la congelación sería más rápida, lo que puede provocar daños en el polipéptido liofilizado y, por lo tanto, pérdida de potencia que requiere una dosis objetivo más alta. Además, las influencias electrostáticas del polvo resultante aumentan drásticamente en tamaños inferiores a  $200 \mu\text{m}$ , lo que conduce a propiedades de manipulación inferiores del producto del presente procedimiento, y pueden esperarse pérdidas de rendimiento debido al atrapamiento de los gránulos en vapor de agua.

10 El aumento del tamaño del gránulo a más de  $1.500 \mu\text{m}$  puede poner en peligro la congelación completa del gránulo en la configuración descrita y, por lo tanto, perjudicar la eficacia general de un producto posterior.

En otra realización del procedimiento según la invención, la solución que comprende el factor VIII en la etapa a) tiene un contenido de sólidos disueltos de  $\geq 8 \%$  en peso a  $\leq 12 \%$  en peso. Se prefiere un contenido de sólidos disueltos de  $\geq 9 \%$  en peso a  $\leq 11 \%$  en peso.

15 En principio, las cargas más altas de sólidos disueltos de aproximadamente  $15$  a  $20 \%$  en peso se considerarían favorables en los procedimientos del tipo en cuestión en el presente documento porque normalmente se esperaría que los gránulos resultantes se congelaran más fácilmente y se secasen de manera más robusta.

20 Sin embargo, en el presente caso, los intervalos anteriores son mejores, ya que el sólido manipulado (que comprende FVIII) más tarde tiene que ser reconstituido e inyectado en un ser humano que (a cargas más altas) daría como resultado una osmolalidad incompatible de la solución de inyección que da como resultado el daño potencial al tejido y/o el dolor por inyección o, de otra manera, requeriría volúmenes de reconstitución significativamente más altos para evitar aquello que de hecho hace que la solución ya no sea prácticamente inyectable.

25 En otra realización del procedimiento según la invención, la solución que comprende el factor VIII en la etapa a) tiene la siguiente composición con respecto a  $1$  gramo de la solución, siendo el resto agua para inyectables:

Factor VIII	$\geq 99 \text{ UI a } \leq 101 \text{ UI}$ ,
Sacarosa	$\geq 68 \text{ mg a } \leq 72 \text{ mg}$ , preferentemente $\geq 70 \text{ mg a } \leq 71,8 \text{ mg}$
Histidina	$\geq 2 \text{ mg a } \leq 4 \text{ mg}$ , preferentemente $\geq 3 \text{ mg a } \leq 3,8 \text{ mg}$
Glicina	$\geq 23 \text{ mg a } \leq 26 \text{ mg}$ , preferentemente $\geq 23,5 \text{ mg a } \leq 25,7 \text{ mg}$
NaCl	$\geq 1 \text{ mg a } \leq 3 \text{ mg}$ , preferentemente $\geq 1,5 \text{ mg a } \leq 2,5 \text{ mg}$
CaCl <sub>2</sub>	$\geq 0,2 \text{ mg a } \leq 0,4 \text{ mg}$ , preferentemente $\geq 0,25 \text{ mg a } \leq 0,35 \text{ mg}$
Polisorbato 80	$\geq 0,07 \text{ mg a } \leq 0,1 \text{ mg}$ , preferentemente $\geq 0,075 \text{ mg a } \leq 0,095 \text{ mg}$

La presente invención se describirá adicionalmente con referencia a las siguientes figuras y ejemplos sin querer limitarse a ellas.

#### Figuras:

- La figura 1 muestra esquemáticamente un aparato para el procedimiento según la invención
- 30 La figura 2 muestra el perfil de temperatura a lo largo del tiempo en una torre de refrigeración
- La figura 3 muestra un perfil de temperatura y presión durante una etapa de liofilización
- La figura 4 muestra otro perfil de temperatura y presión durante una etapa de liofilización
- La figura 5 muestra el desarrollo de potencia de las muestras después de diferentes tiempos de almacenamiento a temperatura ambiente (TA) o a  $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$
- 35 La figura 6 muestra la distribución del agregado/fragmento de producto de las muestras después de diferentes tiempos de almacenamiento a temperatura ambiente (TA) o a  $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$
- La figura 7 muestra una imagen de microscopia electrónica de barrido (SEM) de un gránulo producido según la presente invención con un aumento de  $200$  veces
- 40 La figura 8 muestra una imagen de microscopia electrónica de barrido (SEM) de un gránulo producido según la presente invención con un aumento de  $2000$  veces
- La figura 9 muestra una imagen de microscopia electrónica de barrido (SEM) de un gránulo producido según el procedimiento descrito en el documento WO 2006/008006 A1 con un aumento de  $200$  veces
- La figura 10 muestra una imagen de microscopia electrónica de barrido (SEM) de un gránulo producido según el

procedimiento descrito en el documento WO 2006/008006 A1 con un aumento de 2000 veces

La figura 11 muestra una imagen de microscopia electrónica de barrido (SEM) de un liofilizado producido según la liofilización estándar con un aumento de 200 veces

5 La figura 12 muestra una imagen de microscopia electrónica de barrido (SEM) de un liofilizado producido según la liofilización estándar con un aumento de 2000 veces

La figura 1 representa esquemáticamente un aparato para llevar a cabo el procedimiento según la invención. El aparato comprende, como componentes principales, la torre de refrigeración 100 y la cámara de secado al vacío 200. La torre de refrigeración comprende una pared interior 110 y una pared exterior 120, definiendo de este modo un espacio 130 entre la pared interior 110 y la pared exterior 120.

10 Este espacio 130 alberga un medio de refrigeración 140 en forma de tubería. Un refrigerante puede entrar y salir del medio de refrigeración 140 como indican las flechas del dibujo.

15 El refrigerante que fluye a través de los medios de refrigeración 140 conduce a un enfriamiento de la pared interior 110 y, por lo tanto, al enfriamiento del interior de la torre de refrigeración 100. En la producción de gránulos congelados (criogránulos), se pulveriza líquido en la torre de refrigeración a través de la boquilla 150. Las gotas de líquido se simbolizan de acuerdo con el número de referencia 160.

Las gotas de líquido eventualmente se solidifican (congelan) en su camino hacia abajo, que se simboliza de acuerdo con el número de referencia 170. Los gránulos congelados 170 viajan por una rampa 180 en la que una válvula 190 permite la entrada en la cámara de secado al vacío 200.

20 Si bien no se muestra en el presente documento, por supuesto, también es posible, e incluso preferente, que el canal 180 esté controlado por temperatura de tal manera que mantenga los gránulos 170 en un estado congelado mientras se acumulan antes de la válvula cerrada 190.

25 Dentro de la cámara de secado al vacío 200 se encuentra un tambor giratorio 210 para acomodar los gránulos congelados que se van a secar. La rotación se produce alrededor del eje horizontal para lograr una transferencia de energía eficiente en los gránulos. El calor se puede introducir a través del tambor o mediante un calentador infrarrojo encapsulado. Como resultado final, se obtienen gránulos liofilizados simbolizados por el número de referencia 220.

## Ejemplos

### General: determinación de la potencia del fármaco rFVIII

30 La potencia se ha medido mediante el uso de un ensayo cromogénico utilizando el kit Coatest™ FVIII. El procedimiento del ensayo cromogénico que consiste en dos etapas consecutivas en las que la intensidad del color es proporcionar actividad al FVIII. En la primera etapa, el Factor X se activa en el Factor Xa por acción del Factor IXa con su cofactor, el Factor VIIIa, en presencia de cantidades óptimas de iones de calcio y fosfolípidos, con 5 minutos de incubación a 37 °C. Las cantidades excesivas de Factor X están presentes de tal manera que la velocidad de activación del Factor X depende únicamente de la cantidad de Factor VIII. En la segunda etapa, el factor Xa hidroliza el sustrato cromogénico para producir un cromóforo y la intensidad del color se lee fotométricamente a 405 nm. La validez del ensayo se confirma usando un procedimiento estadístico de regresión lineal contra un patrón de potencia establecida y se calcula la potencia de una muestra desconocida. La potencia se indica en unidades internacionales por ml (UI/ml). En este caso, la potencia se conoce en el presente documento como un valor de [%], dicho valor se entiende de forma consistente como un porcentaje de una "potencia diana" en UI/ml (valores normalizados). Obviamente, se prefieren valores mayores de % - potencia.

### 40 General: Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para determinar la distribución de fragmentos/agregados del producto

Los componentes principales de las preparaciones de rFVIII se separan en regiones en función de su volumen hidrodinámico o tamaño molecular en una columna de gel TSK G4000SWXL con dimensiones 7,8 mm DI x 30 cm, tamaño de partícula de 8 mm; tamaño de poro de 450 Angstrom.

45 A continuación, se cuantifican en función de su emisión de fluorescencia a 340 nm después de la excitación a 276 nm. Los resultados cuantitativos se expresan como % del área de pico relativo para estas regiones. El procedimiento informa los resultados para regiones específicas del cromatograma y se utiliza para medir los agregados de rFVIII y la integridad de las cadenas.

50 Se determinan tres regiones (Región 1, Región 2 y Región 3), mientras que la Región 2 (en % de la muestra total) se desea que sea máxima, ya que allí se resumen todas las moléculas de rFVIII que no se agregan ni fragmentan.

### General: área de superficie específica según BET

La determinación de la superficie específica a través de BET se realizó en una medición multipunto (adsorción de

nitrógeno a 77 Kelvin) y para cada muestra, dos cantidades independientes de material se llenaron en recipientes BET y se analizaron por separado. Los recipientes estaban bien cerrados con tapones, se transfieren a la estación de preparación de muestras, se evacuan y pretratan durante 16 horas a 30 °C al vacío (<0,2, bar) para eliminar los componentes volátiles. Posteriormente, las muestras se ventilaron con nitrógeno, se pesaron y se midieron según la norma DIN ISO 9277 utilizando nitrógeno.

General - Mediciones de microscopia electrónica de barrido (SEM)

La preparación de las muestras se realizó en una bolsa de guantes en atmósfera de nitrógeno, cada muestra se preparó individualmente. La muestra se colocó en un soporte y se pulverizó con oro. Posteriormente se realizó la medición por microscopia electrónica de barrido.

**Ejemplo 1**

Se fabricaron criogránulos de una solución de Kogenate® PF. Kogenate® PF es un factor VIII humano recombinante libre de proteínas plasmáticas. La formulación para 1 g de la solución se da a continuación:

Sólidos	Objetivo: 10 %	Real: 10,3 %
Kogenate® PF	100 UI	100 UI
Sacarosa	70,87 mg	71,79 mg
Histidina	3,32 mg	3,59 mg
Glicina	23,6 mg	25,54 mg
Cloruro sódico	1,88 mg	2,03 mg
Cloruro cálcico	0,28 mg	0,30 mg
Polisorbato 80	0,08 mg	0,09 mg
Agua para inyectables	añadir 1 g	añadir 1 g

La solución a granel se pulverizó en una torre de refrigeración refrigerada por la pared de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención. La boquilla de pulverización tenía una abertura con un diámetro de 400 µm. Esto corresponde al tamaño de gota objetivo de 800 µm. La frecuencia de oscilación fue de 1.375 Hz, la presión de deflexión 0,2 bar y la bomba funcionaba a 22 rpm. Después de una duración total de 35 minutos, se recogieron 879,3 g de gránulos congelados (96 % de rendimiento).

Se monitorizaron las temperaturas interiores de la torre de refrigeración y su desarrollo a lo largo del tiempo se representa en la figura 2. La curva 1000 representa la lectura del sensor desde una parte superior de la torre de refrigeración, la curva 1010, la lectura del sensor desde una parte central de la torre de refrigeración y la curva 1020, la lectura del sensor desde una parte inferior de la torre de refrigeración. A las 14:45 en punto, cuando las temperaturas habían alcanzado -126,0 °C (sensor superior), -129,7 °C (sensor central) y -133,1 °C (sensor inferior), se inició la operación de pulverización. Esto está representado por la marca 1030 en la figura 2. A las 15:20 en punto, se detuvo la operación de pulverización (marca 1040) con temperaturas registradas de -130,7 °C (sensor superior), -133,5 °C (sensor central) y -135,2 °C (sensor inferior). Los gránulos congelados se recogieron en un recipiente enfriado que tenía una temperatura entre -55 °C y -53 °C.

**Ejemplo 2**

Este ejemplo se refiere a la liofilización de una muestra de criogránulos obtenida en el ejemplo 1. En esta etapa se empleó un liofilizador LyoMotion de Meridion. Esta máquina comprende un tambor giratorio en el que los criogránulos se agitan y se someten a secado.

Se aisló un total de 21,3 g de gránulos liofilizados (72,6 % de rendimiento) con una humedad residual de 0,95 %.

Los perfiles de temperatura y presión de la etapa de liofilización se muestran en la figura 3. La curva 1050 representa la temperatura del producto, la curva 1060, la temperatura del condensador de la máquina de liofilización y la curva 1070, la presión interna dentro de la cámara de vacío de la máquina de liofilización.

**Ejemplo 3**

Este ejemplo se refiere a la liofilización de otra muestra de criogránulos obtenida en el ejemplo 1. En esta etapa se empleó un liofilizador LyoMotion de Meridion. Esta máquina comprende un tambor giratorio en el que los criogránulos se agitan y se someten a secado.

Se aisló un total de 21,4 g de gránulos liofilizados (73,7 % de rendimiento) con una humedad residual de 0,70 %.

Los perfiles de temperatura y presión de la etapa de liofilización se muestran en la figura 4. La curva 1080 representa la temperatura del producto, la curva 1090, la temperatura del condensador de la máquina de liofilización y la curva 1100, la presión interna dentro de la cámara de vacío de la máquina de liofilización.

Resultados

Los ensayos de potencia y los análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de los productos obtenidos se dan en la tabla a continuación para las muestras tomadas del procedimiento directamente después de la fabricación.

Muestra	Potencia [ % de potencia objetivo]	Cromatografía de exclusión por tamaño (promedio de 2 muestras) [área relativa %]		
		Región 1 (HMW)	Región 2	Región 3
Ej. 2	86,2 %	0,6	75,0	17,2
Ej. 2	89,9 %	0,5	74,6	17,5
Ej. 3	87,9 %	0,5	73,8	18,3
Ej. 3	88,4 %	0,5	74,5	17,6

5 Se analizaron dos muestras de cada ejemplo con respecto a la potencia del factor VIII en las mismas. Las potencias objetivo fueron 250,0 mg/vial. Se espera una pérdida de potencia durante el procesamiento de la solución a granel y la liofilización. Las potencias reales determinadas entre 86,2 % y 89,9 % fueron considerablemente menores en variación que las observadas en la liofilización convencional en un vial. En este caso, se pueden observar potencias que varían del 80,9 % al 91,2 % dependiendo de la posición del vial individual en la cámara de secado.

Para referencia, la siguiente tabla proporciona datos analíticos para los precursores de los ejemplos 2 y 3 (valores de IPC).

Muestra	Potencia objetivo [UI/ml]	Potencia [ % de potencia objetivo]	Cromatografía de exclusión por tamaño (promedio de 2 muestras) [área relativa %]		
			Región 1 (HMW)	Región 2	Región 3
Solución Kogenate® PF después de descongelar	1.220,0	101,2 %	0,4	74,5	17,6
Solución a granel Kogenate® PF después de la dilución	100,0	96,8 %	0,6	73,6	17,5
Ej. 1 (criogránulos)	100,0	111,7 %	0,6	73,0	18,0

10 Además, las propiedades anteriores de las muestras se evaluaron durante hasta 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente (TA) y a 2-8 °C.

15 Se puede ver en las Figuras 5 y 6 (las muestras se prepararon a partir de diferentes materiales de partida de menor actividad) que no se han producido cambios significativos en la potencia o en la composición de fragmentos/agregados de las muestras, que subraya la robustez del procedimiento de acuerdo con la presente invención con respecto a las propiedades de los gránulos producidos de este modo.

**Ejemplo 4: comparación directa con la técnica anterior**

20 Se prepararon y procesaron soluciones del lote idéntico de LA sustancia farmacológica Factor VIII con la misma composición de formulación proporcionada en el Ejemplo 1 a través de diferentes procedimientos de secado. Se congelaron 3.000 ml de solución en una torre de refrigeración según el Ejemplo 1, y los gránulos congelados se liofilizaron en dos liofilizadores rotatorios diferentes (LyoMotion) con un tamaño de lote de 319 g y 2614 g.

25 Se procesó una parte separada de la solución de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2006/008006 A1. Se pulverizó un total de 1.200 ml de solución en porciones de 200 ml a través de una boquilla de 400 µm y se atomizó a una frecuencia de 900 Hz con una velocidad de aproximadamente 16,5 g/min. Las gotas se congelaron en un recipiente aislado lleno de nitrógeno líquido que se colocó aproximadamente 25 cm debajo de la boquilla y se agitó durante todo el procedimiento. Después de completar la pulverización de cada porción, los gránulos congelados se eliminaron vertiendo el nitrógeno líquido a través de un tamiz preenfriado y almacenándolos a baja temperatura. Una vez que se recogieron todas las porciones, se colocaron en 2 gradillas forradas con papel de plástico en el estante preenfriado de un liofilizador Virtis Advantage Pro y se liofilizaron. El secado primario se realizó a una temperatura de almacenamiento de -10 °C durante un período de 60 horas, seguido de un secado secundario durante 8 horas a 25 °C. Después de completar el secado, los gránulos secos se transfirieron instantáneamente a botellas de vidrio y se cerraron firmemente. Posteriormente, se pesaron 250 mg de gránulos en viales de vidrio 10R tipo I bajo una atmósfera de nitrógeno.

35 Una tercera parte separada de la solución se introdujo en viales de vidrio 10R de tipo I y se liofilizó en un liofilizador de viales convencional. Se llenó un total de 488 viales con 2,5 ml de solución por vial (1.241 g de solución en total), semi-tapado y cargado en un liofilizador HOF. La solución se congeló a -45 °C y el secado primario se realizó a -20 °C, seguido de una segunda etapa de secado a 25 °C. El procedimiento completo de liofilización requirió aproximadamente 65 horas. Los viales se taparon dentro del liofilizador y se sellaron directamente después de la descarga.

Las tres muestras, las del primer procesamiento según el ejemplo 1, las procesadas como se describe en el documento WO 2006/008006 A1 y los de un procedimiento convencional de liofilización de viales, en el que posteriormente se someten a un área de superficie específica según las mediciones BET y microscopia electrónica de barrido (SEM).

- 5 Se puede ver que los gránulos producidos según la presente invención muestran un área superficial específica más alta, que mejora la reconstitución del sólido liofilizado en un líquido para administración, y una morfología más homogénea, lo que mejora las propiedades de manipulación en las etapas posteriores del procedimiento para esos gránulos.

El área de superficie específica respectiva según BET se resume de la siguiente manera:

Gránulo producido...	Área de superficie específica según BET [m <sup>2</sup> / g]
de acuerdo con la presente invención	5,2
según el documento WO 2006/008006 A1	0,8
liofilización estándar	0,4

- 10 Es evidente que el área superficial específica de los gránulos producidos por la presente invención es significativamente mayor que la de los gránulos producidos de acuerdo con procedimientos similares de la técnica anterior (tal como el documento WO 2006/008006 A1) y particularmente en comparación con la liofilización estándar.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de producción de gránulos liofilizados que comprende factor VIII, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 a) congelar gotitas de una solución que comprende factor VIII para formar gránulos;  
b) liofilizar los gránulos;
- caracterizado porque**  
en la etapa a) las gotas se forman por medio de la formación de gotas de la solución que comprende factor VIII en una torre de refrigeración (100) que tiene una superficie de la pared interior (110) controlable por temperatura y una temperatura interior por debajo de la temperatura de congelación de la solución  
10 y porque  
en la etapa b) los gránulos se liofilizan en un receptáculo giratorio (210) que se aloja dentro de una cámara de vacío (200).
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además las etapas c), d) y e) después de la etapa b):
- 15 c) almacenar y homogeneizar los gránulos liofilizados  
d) analizar los gránulos liofilizados mientras se almacenan y homogeneizan;  
e) cargar los gránulos liofilizados en recipientes.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que en la etapa a) las gotas se hacen por medio de la formación de gotas haciendo pasar la solución a través de boquillas asistidas por frecuencia.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la frecuencia de oscilación es  $\geq 1.000$  Hz a  $\leq 2.000$  Hz.
5. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que en la etapa a) la superficie interna (110) de la torre de refrigeración (100) tiene una temperatura de  $\leq -120$  °C.
- 25 6. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la superficie interna (110) de la torre de refrigeración (100) se enfría haciendo pasar un refrigerante a través de una o más tuberías (140) que están en contacto térmico con la superficie interna (110).
7. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 6, en el que se establece una dosis objetivo para el factor VIII, el ensayo en la etapa d) determina el contenido activo del factor VIII en los gránulos liofilizados y los recipientes se cargan con una cantidad de gránulos liofilizados que proporciona una dosis que es igual a la dosis objetivo o excede la dosis objetivo en  $\leq 25$  %.
- 30 8. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los gránulos obtenidos en la etapa a) tienen un máximo de la distribución de tamaño de partícula  $d_{50}$  de  $\geq 200$   $\mu$ m a  $\leq 1.500$   $\mu$ m.
9. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la solución que comprende el factor VIII en la etapa a) tiene un contenido de sólidos disueltos de  $\geq 8$  % en peso a  $\leq 12$  % en peso.
- 35 10. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la solución que comprende el factor VIII en la etapa a) tiene la siguiente composición con respecto a 1 gramo de la solución, siendo el resto agua para inyección:

Factor VIII	$\geq 99$ UI a $\leq 101$ UI
Sacarosa	$\geq 68$ mg a $\leq 72$ mg
Histidina	$\geq 2$ mg a $\leq 4$ mg
Glicina	$\geq 23$ mg a $\leq 26$ mg
NaCl	$\geq 1$ mg a $\leq 3$ mg
CaCl <sub>2</sub>	$\geq 0,2$ mg a $\leq 0,4$ mg
Polisorbato 80	$\geq 0,07$ mg a $\leq 0,1$ mg

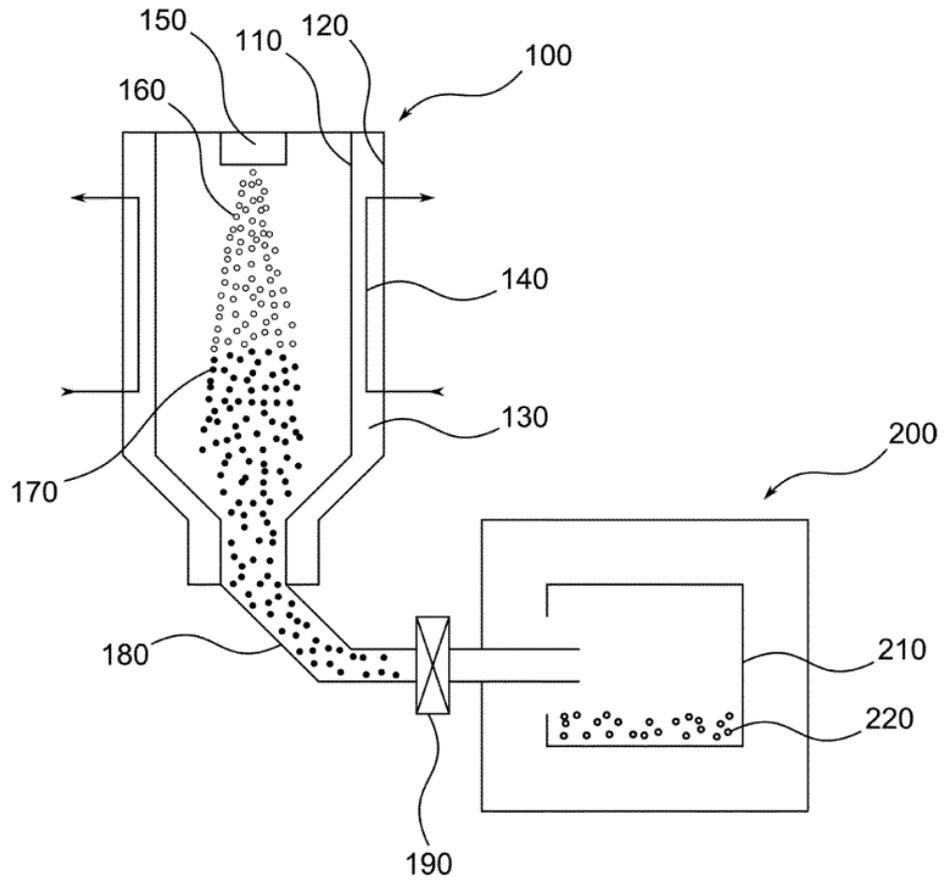


FIG. 1

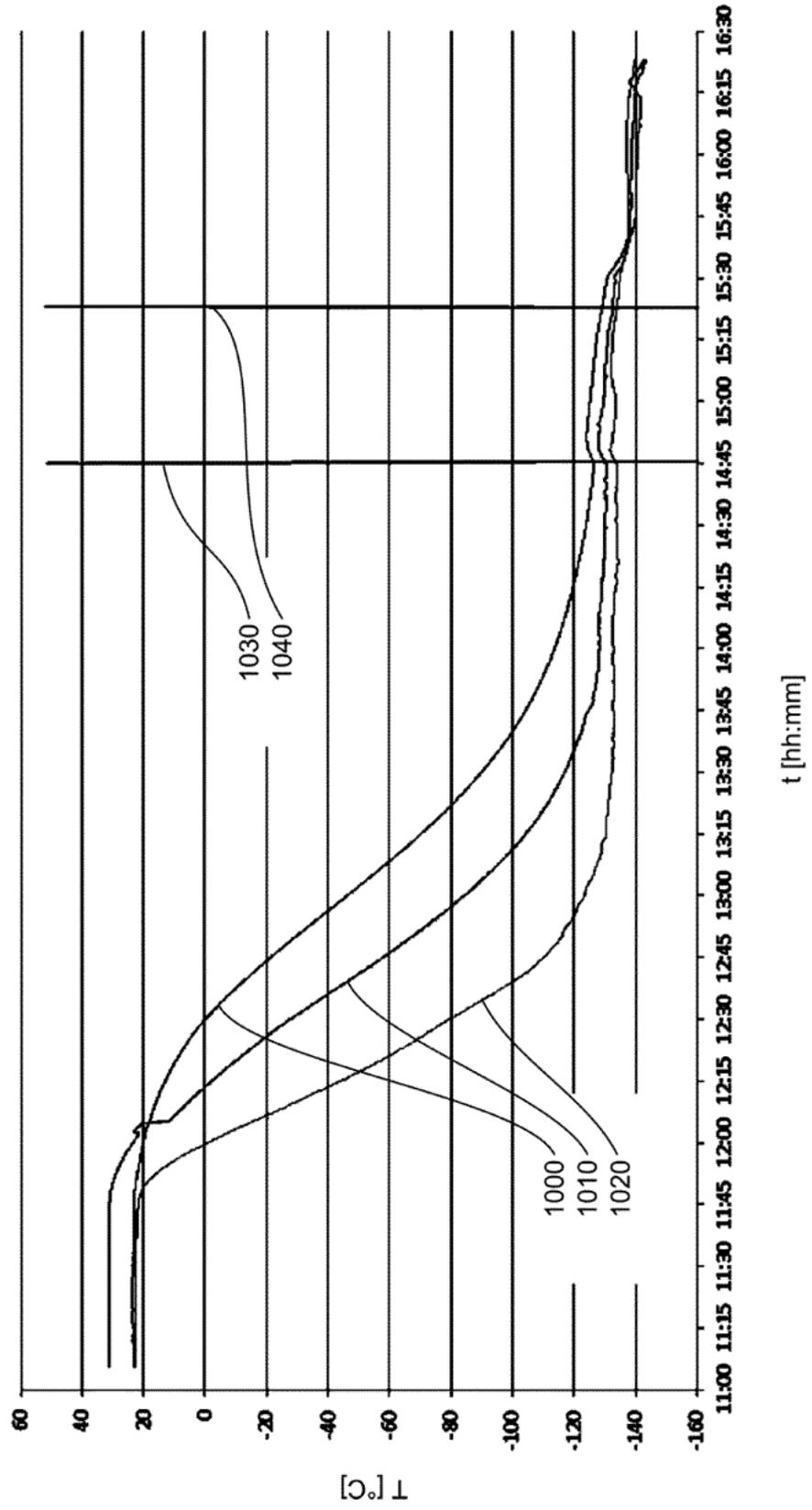
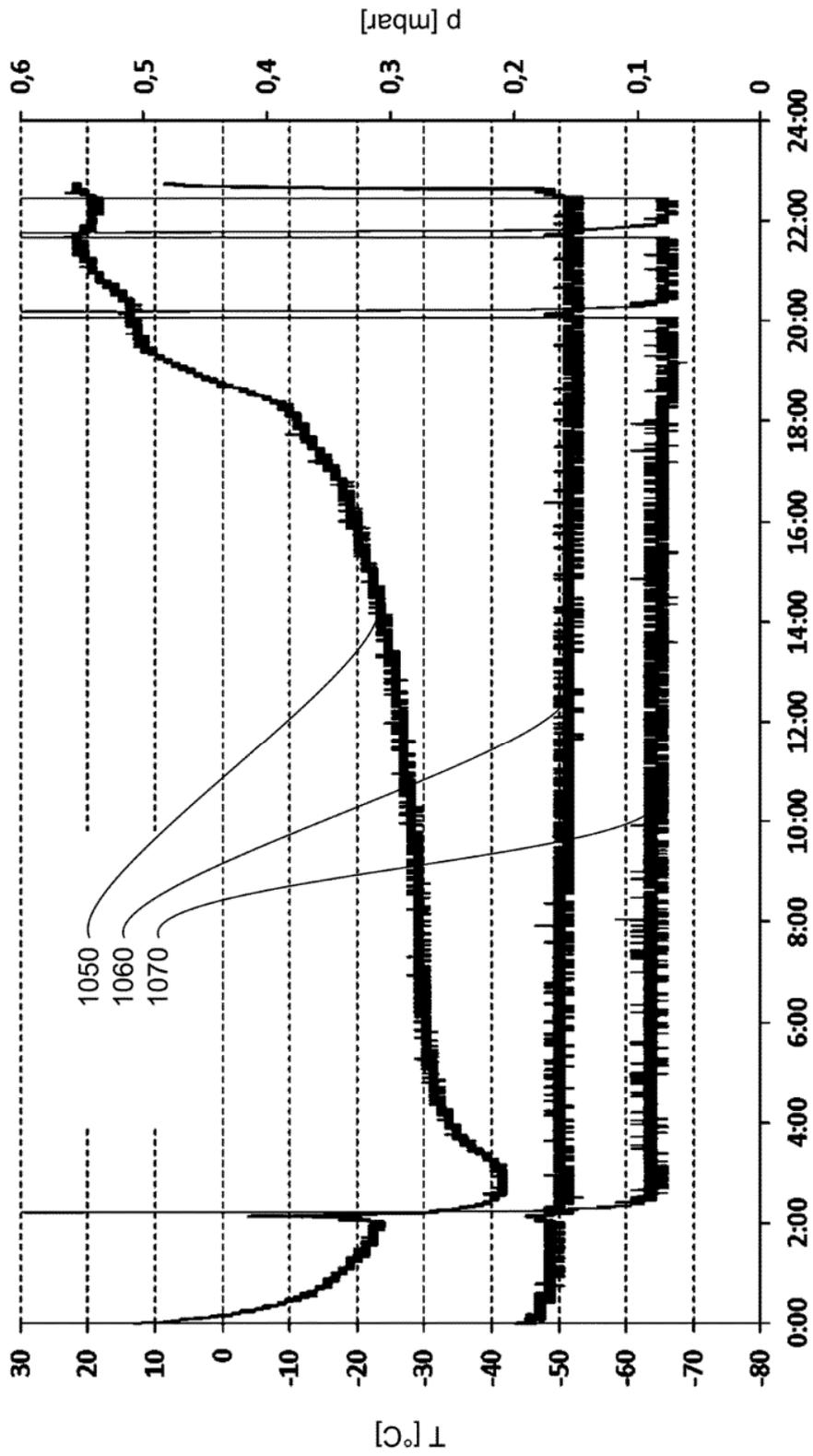


FIG. 2



$t$  [hh:mm]

FIG. 3

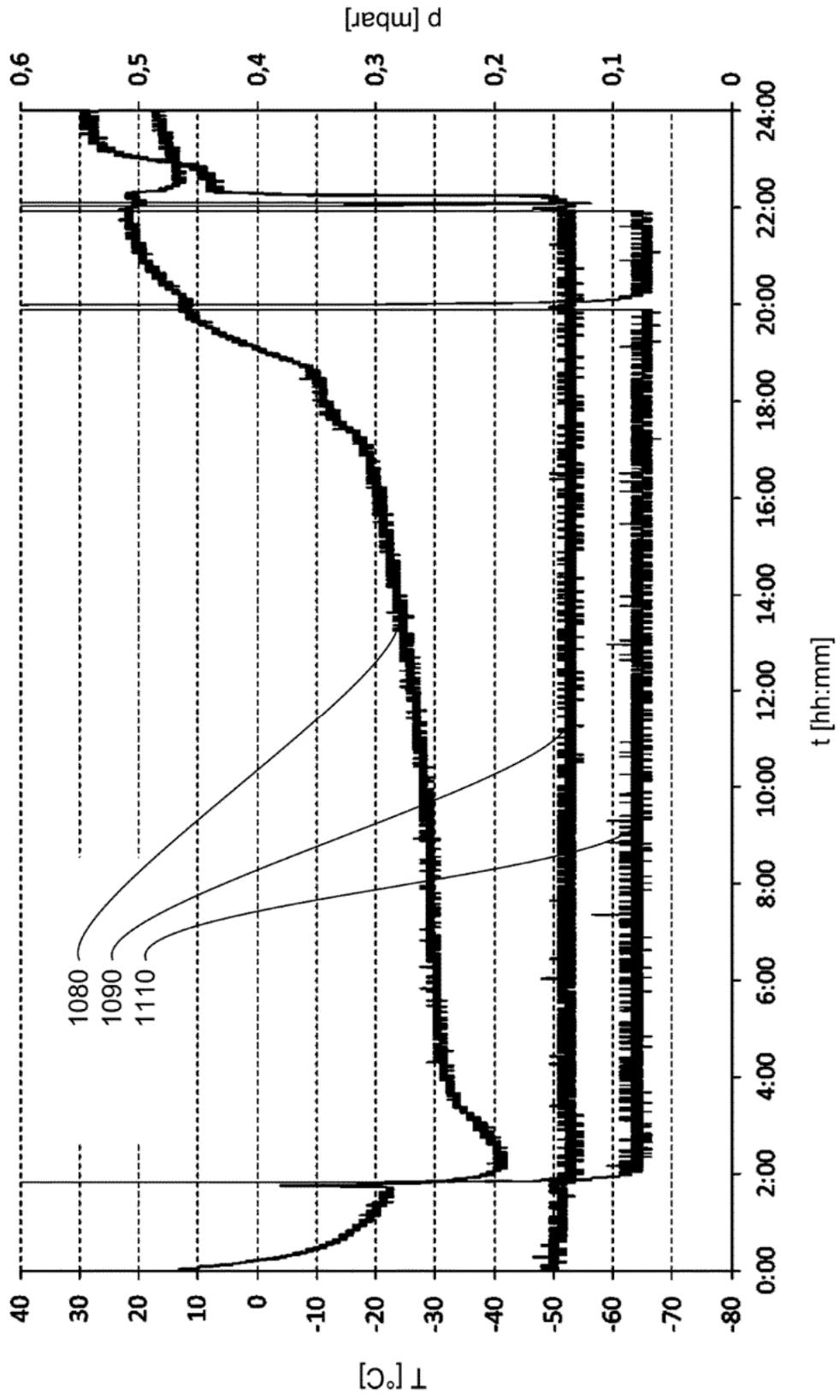


FIG. 4

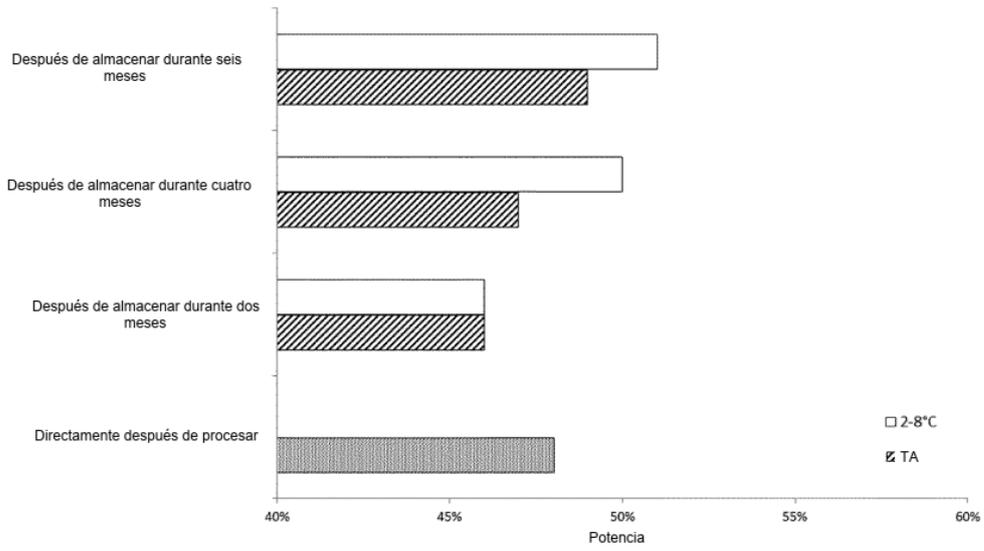


FIG. 5

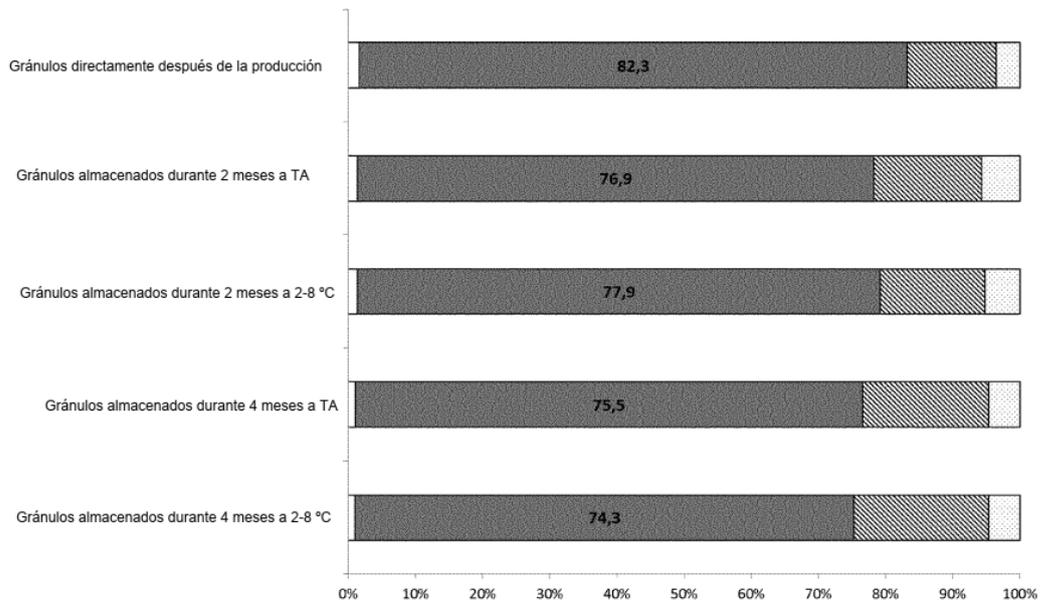
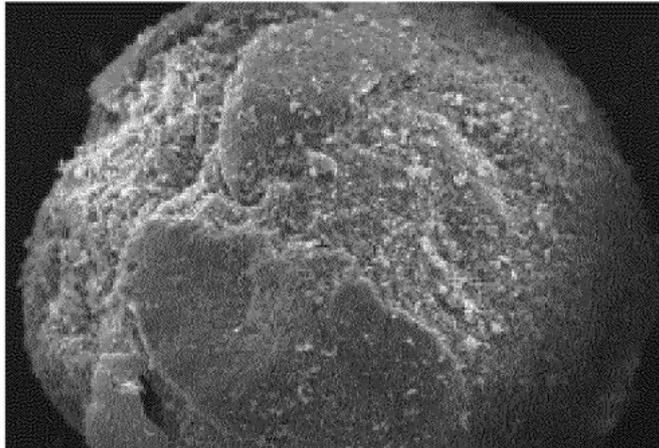
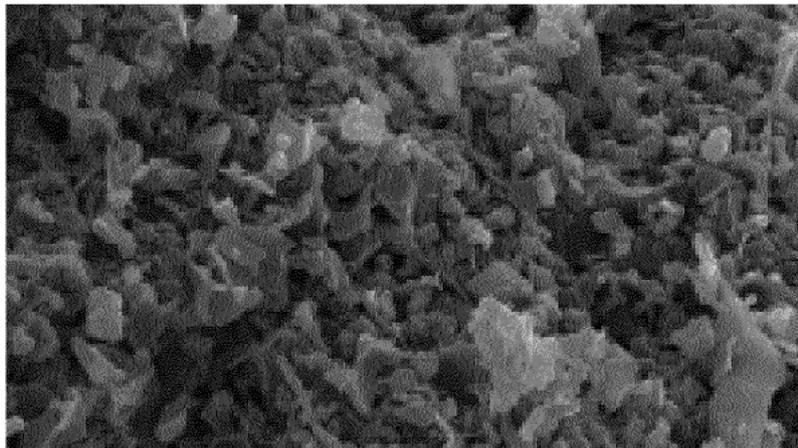


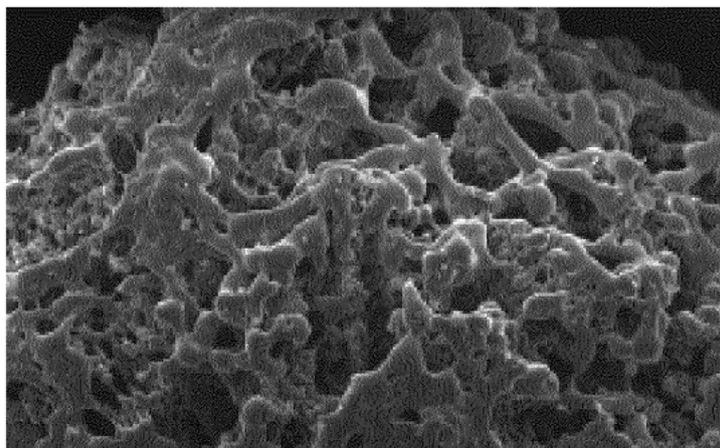
FIG. 6



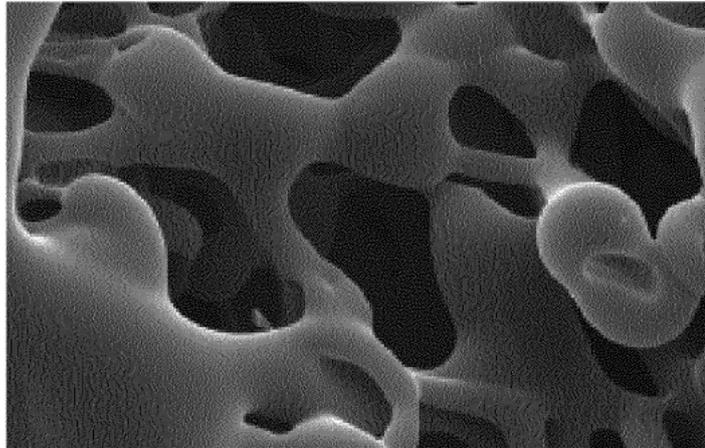
**FIG. 7**



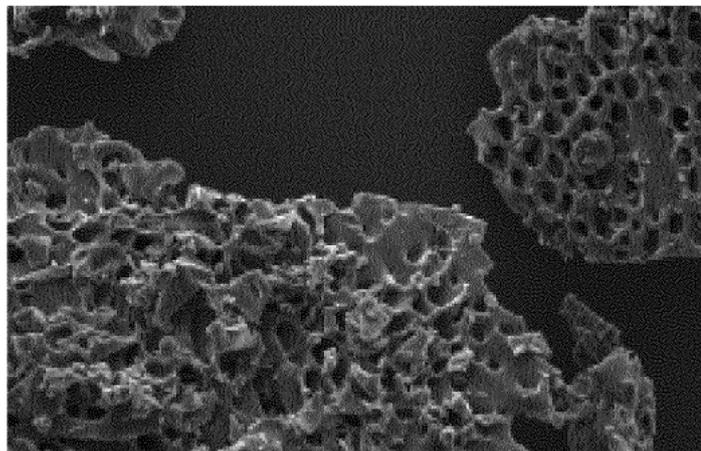
**FIG. 8**



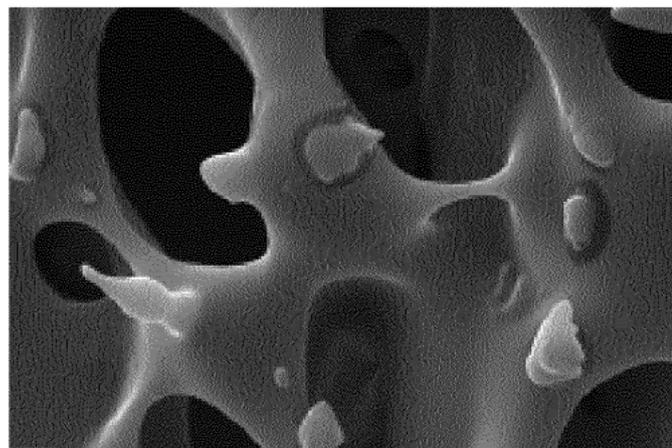
**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**



**FIG. 12**