



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 280 924**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/37 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04380188 .5**

(86) Fecha de presentación : **24.09.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1522312**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **13.04.2005**

(54) Título: **Composición líquida biológicamente estable de FVIII, de FvW o del complejo FVIII/FvW humanos.**

(30) Prioridad: **03.10.2003 ES 200302298**

(73) Titular/es: **Grifols, S.A.**
Marina, 16-18, Torre Mapfre - Pl. 26
08005 Barcelona, ES

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

(72) Inventor/es: **Grancha Gamón, Salvador;**
Jorquera Nieto, Juan Ignacio;
Ristol Debart, Pere y
Massot Riera, Marta

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

(74) Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 280 924 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición líquida biológicamente estable de FVIII, de FvW o del complejo FVIII/FvW humanos.

La presente invención se refiere a una composición líquida en la que se mantiene la estabilidad de la actividad biológica del Factor VIII (FVIII) o del Factor von Willebrand (FvW) o del complejo Factor VIII/Factor von Willebrand (FVIII/FvW), permitiendo su uso terapéutico.

El FVIII (factor VIII de la coagulación) es una proteína plasmática esencial para el curso de la vía intrínseca de la coagulación de la sangre. Una carencia o defecto de este FVIII conduce a la alteración del mecanismo de la coagulación conocido como Hemofilia A, enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X. El Factor von Willebrand (FvW) es una proteína plasmática responsable de la adhesión plaquetar sobre las superficies vasculares dañadas por lo que defectos cuantitativos o cualitativos del FvW (enfermedad de von Willebrand) producen alteraciones en la hemostasia primaria. Además el FvW ejerce el papel de transportador del FVIII en el plasma. (Physiological and clinical aspects of Von Willebrand factor; Haematologica Vol 86, suppl 4, November 2001).

El complejo FVIII/FvW en estado nativo presenta una relación 1:100 entre FVIII:FvW, es decir, encontramos una molécula de FVIII por aproximadamente cada 100 moléculas de FvW por lo que los resultados de estabilidad del complejo FVIII/FvW son válidos para concentrados purificados de FvW.

Los concentrados purificados de FVIII se utilizan en la práctica clínica para el tratamiento de la hemofilia A. Los concentrados de FVIII con elevado contenido en FvW presentan también utilidad terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand.

La estabilidad de las proteínas, especialmente aquellas con actividad biológica lábil, como el FVIII, es un problema importante para las preparaciones terapéuticas de las mismas. Esto ha sido hasta el momento solventado mediante la liofilización del producto, por ello las preparaciones terapéuticas de los concentrados de FVIII, FvW o FVIII/FvW se presentan en forma liofilizada, con objeto de preservar su actividad biológica. En la actualidad no existe ningún concentrado terapéutico de FVIII, FvW o FVIII/FvW en formulación final líquida comercializado en el mundo (W. Wang *et al.* / International Journal of Pharmaceutics 259/2003; 1-15).

La liofilización es un proceso costoso y que además reduce el rendimiento de producto. Además, una formulación líquida permitiría una mayor facilidad en la administración, al evitar la reconstitución del liofilizado. También la posibilidad de poner al alcance de los enfermos un producto líquido (listo para su uso), dosificado ya en el dispositivo de inyección adecuado, puede aportar un beneficio psicológico sobre la percepción que el propio enfermo tiene sobre su enfermedad y su dependencia del producto.

A pesar de las referencias aportadas a continuación, no existe en la actualidad ningún concentrado terapéutico de FVIII, del FvW o del complejo FVIII/FvW comercializado en el mundo en una formulación líquida.

Existen referencias previas sobre estabilización del FVIII:

- Patente española ES 2.111.579 se refiere a la formulación de un FVIII con arginina y un detergente y/o un polímero orgánico. Esta fórmula no contempla la adición de albúmina como estabilizante, consiguiendo con ello una actividad específica superior a 1000 UI/mg. Este FVIII se presenta en forma final liofilizada.
- Patente americana US 5.399.670 que se refiere a la formulación con arginina con objeto de facilitar la reconstitución del concentrado de FVIII liofilizado.
- Patente española ES 2.097.120 que se refiere al uso de carbohidratos para estabilizar el FVIII durante las etapas de proceso. Este FVIII también se presenta en forma final liofilizada.
- La patente americana US 5.925.738 está relacionada con la formulación líquida estable de proteínas plasmáticas, particularmente factores de coagulación y específicamente FVIII y FIX aunque también se refiere al FvW. En general se pretende una estabilidad entre 4 y 37°C de hasta 3 años manteniendo el 50% de la actividad. La mayoría de los ejemplos se refieren al FIX, cuya estabilidad no es comparable a la del complejo FVIII/FvW, al tratarse de moléculas diferentes. Las pruebas realizadas con el FVIII se realizan a 37°C ya que el objetivo de las mismas no es la estabilidad de producto final sino su uso en bombas de infusión continua a corto plazo (horas o días). En dichas pruebas, la formulación acuosa del FVIII a los 5 días ha perdido más del 50% de su actividad. Así pues, dicha formulación líquida (en agua) no aporta una estabilidad adecuada para su comercialización como producto terapéutico, para el que son necesarias caducidades superiores a 6 meses o preferentemente superiores a 1 año.
- La PCT WO 96/30041 se refiere a la estabilización del r-VIII SQ y del FIX en solución. Esta estabilización se realiza mediante la adición de un carbohidrato y la reducción del contenido en oxígeno de la solución o la adición de un antioxidante y/o el almacenamiento en una atmósfera pobre en oxígeno o en un gas inerte. Esta formulación se ha desarrollado y patentado referida al r-VIII SQ, que se trata de una proteína derivada de la ingeniería genética en la que se ha eliminado una parte importante de la secuencia derivada del gen correspondiente. Los datos aportados muestran la estabilidad durante 12 meses a 25°C y durante 18 meses a 7°C. Al tratarse, el r-VIII SQ, de una molécula alterada genéticamente estos resultados no serían

equiparables a un FVIII humano nativo de origen plasmático o al complejo FVIII-FvW. El r-VIII SQ es sintetizado "*in vitro*" en células no humanas, en cambio el FVIII humano de origen plasmático se sintetiza "*in vivo*" en el hígado humano. Esto hace que entre estas moléculas existan diferencias significativas, como cambios en el contenido en azúcares de la molécula, que se reflejan en diferencias farmacocinéticas como la vida media plasmática. Además el r-FVIII SQ incluye la delección de parte (casi el 40%) de la molécula. Algunos autores han apuntado una mayor incidencia en el desarrollo de inhibidores con el uso de factores VIII de origen recombinante. Esto diferencia más, si cabe, estos factores recombinantes, como el r-VIII SQ, de los FVIII humanos nativos. Así pues debemos considerar que la molécula de FVIII humano de origen plasmático es una molécula diferente del r-VIII SQ y que al tratarse de moléculas diferentes la estabilidad de las mismas no es equiparable. Debemos tener en cuenta también la ausencia de FvW en el r-VIII SQ.

- La EP 710.114 se refiere a la formulación del r-VIII SQ, a una concentración mínima de 1000 UI/ml, para su administración subcutánea, intramuscular o intradérmica. Se trata de la misma molécula que en el caso anterior y por ello los resultados no son equiparables al FVIII, al FvW o al complejo FVIII/FvW de origen humano.
- La PCT WO 01/03726 (EP 1.194.161) relaciona la presencia de determinadas concentraciones de iones metálicos divalentes con la mejora de la estabilidad del r-VIII SQ en solución, específicamente Zn^{2+} y Cu^{2+} , contemplando además la presencia de un agente surfactante (Tween) y histidina. Esta patente representa otro intento de estabilizar el r-VIII SQ que se aparta del objeto de la presente patente.

Por tanto no existen antecedentes sobre la estabilización del FVIII, del FvW o del complejo FVIII/FvW humano nativo, de origen plasmático, que permita la preservación de la actividad biológica en una formulación líquida y durante un período de tiempo suficiente para permitir su utilización como producto terapéutico, es decir, que sea estable en solución durante más de 6 meses.

El objetivo de la presente invención es el de conseguir una formulación líquida que permita estabilizar adecuadamente la actividad del FVIII, del FvW o del complejo FVIII/FvW (recuperación de FVIII y FvW mínima aproximada del 50%) durante un período de tiempo suficiente para permitir su uso terapéutico (más de 6 meses a 5°C).

Las investigaciones realizadas por los inventores han permitido conocer el efecto negativo de un potente antioxidante como la NAC (n-acetil cisteína) sobre la actividad del FvW y el hecho de que la sustitución del mismo por un quelante de metales conserva la actividad del FvW y mantiene también el efecto protector sobre el FVIII.

También las investigaciones realizadas han permitido constatar que, con la adición de un inhibidor de proteasas (como la Antitrombina) y de un ligando específico (heparina) se consigue una mejor estabilidad del complejo FVIII/FvW.

Se aprecia, por lo tanto, que sobre una formulación base que puede contener, entre otros: albúmina, aminoácidos, agentes surfactantes, antioxidantes como la vitamina C y/o almacenarse en una atmósfera pobre en oxígeno; mediante la adición de un quelante de metales, como el EDTA (2-100 mmol/l), de un inhibidor de proteasas, tal como un inhibidor de serin proteasas (serpina) y en particular Antitrombina (0,01-1 UI/UI FVIII), y de un ligando específico como la heparina (0,1-10 U/ml), se consigue una estabilidad suficiente del complejo FVIII/FvW en una formulación líquida que permite su uso como producto terapéutico.

Ejemplos

El FVIII coagulante (FVIII:C) se expresa en Unidades Internacionales y su concentración en Unidades Internacionales/mililitro (UI FVIII/ml). La actividad del FvW se expresa como Cofactor de Ristocetina (RCo), UI/ml.

Ejemplo 1

Resultados de estabilidad (% de recuperación de actividad), a 5 y 25°C, de un complejo FVIII/FvW (25 y 100 UI FVIII/ml) formulado con: Albúmina 5%, Arginina 200 mmol/l, Histidina 25 mmol/l, Cl_2Ca 5 mmol/l, a dos concentraciones diferentes (25 UI/ml y 100 UI/ml)

25 UI FVIII/ml						
5 °C						
Tiempo (meses)	1	3	4	6	8	Pendiente promedio
Recuperación de actividad de FVIII	94%	83%	--	60%	--	-6,64 %/mes
25°C						
Tiempo (semanas)	1	3	4	6	8	Pendiente promedio
Recuperación de actividad de FVIII	97%	79%	74%	--	46%	-6,94 %/sem

ES 2 280 924 T3

100 UI FVIII/ml						
5 °C						
Tiempo (meses)	1	3	4	6	8	Pendiente promedio
Recuperación de actividad de FVIII	98%	80%	--	64%	--	-6,33 %/mes
25°C						
Tiempo (semanas)	1	3	4	6	8	Pendiente promedio
Recuperación de actividad de FVIII	92%	83%	71%	--	28%	-8,93 %/sem

Los resultados muestran una buena correlación entre las recuperaciones de FVIII obtenidas a 5°C y 25°C, observando en la tabla que un periodo de conservación de una semana a 25°C (condición de estudio de estabilidad acelerado) equivale a un periodo de conservación de un mes a 5°C (temperatura objetivo).

Ejemplo 2

Un complejo FVIII/FvW (25 UI FVIII/ml) formulado con:

A1	Xilitol 4%	NAC 3mmol/l	Glicina 250mmol/l		Cl ₂ Ca 25mmol/l	Heparina sódica 0,5 U/ml	Albúmina 5%
B1	Xilitol 4%		Glicina 250mmol/l	EDTACaNa ₂ 25mmol/l	Cl ₂ Ca 25mmol/l	Heparina sódica 0,5 U/ml	Albúmina 5%
C1	Xilitol 4%	NAC 3mmol/l	Glicina 250mmol/l	EDTACaNa ₂ 25mmol/l	Cl ₂ Ca 25mmol/l		Albúmina 5%

muestra los siguientes resultados de estabilidad:

8 semanas a 25°C	Recuperación de actividad de FVIII (%)	Recuperación de actividad de FvW:RCO (%)
A1	61,8	41,1
B1	62,5	66,2
C1	74,2	19,8

Estos resultados indican que el efecto protector de la actividad de FVIII:C de un potente reductor como la NAC se puede suplir mediante la adición de un quelante de metales. La presencia de NAC induce una mayor pérdida de actividad de FvW. Se observa un papel protector de la heparina sobre la actividad del FvW.

Con la formulación B1, a una concentración de FVIII de 25 UI/ml y que incluye EDTA y heparina sódica, estable 8 semanas a 25°C, se puede extrapolar un período de caducidad de al menos 8 meses a 5°C, gracias a los resultados del ejemplo 1.

ES 2 280 924 T3

Ejemplo 3

Un complejo FVIII/FvW (25 UI FVIII/ml) formulado con:

A2	NAC 5mmol/l	Glicina 250mmol/ l	Arginina 150mmol/ l	EDTACaNa ₂ 25mmol/l	Cl ₂ Ca 25mmol/ l	Heparin a sódica 0,5 U/ml	Albúm i-na 5%
B2	Vitamin a C	Glicina 250mmol/ l	Arginina 150mmol/ l	EDTACaNa ₂ 25mmol/l	Cl ₂ Ca 25mmol/ l	Heparin a sódica 0,5 U/ml	Albúm i-na 5%
C2	Vitamin a E	Glicina 250mmol/ l	Arginina 150mmol/ l	EDTACaNa ₂ 25mmol/l	Cl ₂ Ca 25mmol/ l	Heparin a sódica 0,5 U/ml	Albúm i-na 5%
D2	Vitamin a C+E	Glicina 250mmol/ l	Arginina 150mmol/ l	EDTACaNa ₂ 25mmol/l	Cl ₂ Ca 25mmol/ l	Heparin a sódica 0,5 U/ml	Albúm i-na 5%

muestra los siguientes resultados de estabilidad:

8 semanas a 25°C	Recuperación de actividad de FVIII (%)	Recuperación de actividad de FvW:RCO (%)
A2	70,4	18,3
B2	69,6	62,7
C2	69,6	75,2
D2	73,2	65,9

En una solución conteniendo un quelante de metales y heparina, la presencia de un potente reductor (NAC) provoca pérdida de actividad de FvW:RCO, sin grandes beneficios para el FVIII:C, en cambio, con las formulaciones B2, C2 y D2, a una concentración de FVIII de 25 UI/ml incluyendo EDTA y heparina sódica, se puede extrapolar un período de caducidad de al menos 8 meses a 5°C.

ES 2 280 924 T3

Ejemplo 4

Un complejo FVIII/vWF (25 UI FVIII/ml) formulado con: Glicina 280 mmol/l, Arginina 350 mmol/l, Histidina 25 mmol/l, Cl_2Ca 50 mmol/l, Albúmina 5%, Vitamina C 100 mmol/l, tween 80 50 ppm, pH 5,10 y una concentración variable de EDTA CaNa_2 y de heparina sódica:

	concentración EDTA	concentración heparina
A3	Alta (50mmol/l)	Alta (1 U/ml)
B3	Alta (50mmol/l)	Baja (0,2 U/ml)
C3	Baja (10mmol/l)	Alta (1 U/ml)
D3	Baja (10mmol/l)	Baja (0,2 U/ml)

muestra los siguientes resultados de estabilidad:

8 semanas a 25°C	Recuperación de actividad de FVIII (%)	Recuperación de actividad de FvW:RCo (%)
A3	85,0	71,7
B3	63,5	65,9
C3	70,4	95,0
D3	63,5	89,5

A una concentración de FVIII de 25 UI/ml, la adición combinada de heparina y un quelante de metales (EDTA) proporciona a las formulaciones previamente descritas una elevada estabilidad, respetando la actividad del FvW. Podemos extrapolar un período de caducidad de al menos 8 meses a 5°C.

Ejemplo 5

Estudio de la fórmula propuesta (Glicina 280 mmol/l, Arginina 350 mmol/l, Histidina 25 mmol/l, Cl_2Ca 50 mmol/l, heparina 1 U/ml, EDTA CaNa_2 50 mmol/l, Albúmina 5%, Vitamina C 100 mmol/l, tween 80 50 ppm, pH de formulación 6,3) a 200 UI FVIII/ml en seis lotes de producto independientes muestra los siguientes resultados de estabilidad (8 semanas a 25°C):

Semanas a 25°C	0	2	4	6	8
FVIII:C (%)					
Media±DT (n=6)	100	91,0±6,3	65,5±8,0	48,2±8,1	35,4±9,1
FvW:Rco (%)					
Media±DT (n=6)	100	105,4±8,5	87,7±19,7	94,7±17,5	85,8±13,8

Al aumentar la concentración de producto (de 25 a 200 UI FVIII/ml) se observa una menor estabilidad. El seguimiento de la evolución de actividad a lo largo del estudio incluye, además del tiempo inicial y final, muestreos a las 2, 4 y 6 semanas de estabilidad. Con el conjunto de los datos, procedente de los seis lotes estudiados, se puede realizar una estimación del comportamiento global de las actividades de FVIII:C y FvW:RCo, asimilándolo a una cinética de primer orden. De este análisis se puede estimar que se obtendrían recuperaciones del orden del 50% de actividad (FVIII y FvW) a las 6 semanas a 25°C, equivalentes a 6 meses a 5°C.

ES 2 280 924 T3

Ejemplo 6

Estudio del efecto protector de un inhibidor de proteasas. La fórmula propuesta fue ensayada a 200 UI FVIII/ml en seis lotes de producto independientes.

Glicina 280 mmol/l, Arginina 350 mmol/l, Histidina 25 mmol/l, Cl₂Ca 50 mmol/l, Albúmina 5%, Vitamina C 100 mmol/l, tween 80 50 ppm, pH de formulación 6.3; heparina 1 UI/ml, EDTACaNa₂ 50 mmol/l, y Antitrombina (0,05 UI/UI FVIII), mostrando los siguientes resultados de estabilidad (8 semanas a 25°C):

Semanas a 25°C	0	2	4	6	8
FVIII:C (%)	100	94,5±4,5	86,9±5,2	71,5±3,2	67,6±5,0
Media±DT (n=6)					
FvW:Rco (%)	100	101,5±16,7	117,4±28,5	108,1±22,3	91,1±24,0
Media±DT (n=6)					

La adición de un inhibidor de proteasas (Antitrombina) mejora la estabilidad del producto tanto en relación al Factor VIII como para la actividad de cofactor de ristocetina (FvW). Un análisis paralelo al realizado en el ejemplo 5, permite estimar recuperaciones del 50% de actividad (FVIII y FvW:RCo) a las 12 semanas a 25°C, equivalentes a 12 meses a 5°C.

De los ejemplos anteriores se aprecia que a baja concentración de producto (25 UI FVIII/ml) la adición de un quelante de metales (EDTA) y Heparina proporcionan una mayor estabilidad al complejo FVIII/FvW. Esta estabilización mejora con la adición de un inhibidor de proteasas (Antitrombina) incluso a elevadas concentraciones de actividad de FVIII y FvW.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición líquida biológicamente estable de FVIII o de FvW o del complejo FVIII/FvW humanos, **carac-**
terizada por comprender un concentrado de FVIII o de FvW o del complejo FVIII/FvW humanos con un ligando
específico seleccionado entre heparina y heparina sódica, quelante de metales, y preferentemente un inhibidor de
proteasa.
- 10 2. Composición líquida biológicamente estable de FVIII o de FvW o del complejo FVIII/FvW humanos, según
la reivindicación 1, **caracterizada** porque el quelante de metales se utiliza con una concentración comprendida entre
2-100 mmol/l del concentrado.
- 15 3. Composición líquida biológicamente estable de FVIII o de FvW o del complejo FVIII/FvW humanos, según la
reivindicación 1, **caracterizada** porque el quelante de metales es EDTA.
- 20 4. Composición líquida biológicamente estable de FVIII o de FvW o del complejo FVIII/FvW humanos, según la
reivindicación 1, **caracterizada** porque el quelante de metales es EDTACaNa₂ (sal sódica y cálcica de EDTA).
- 5 5. Composición líquida biológicamente estable de FVIII o de FvW o del complejo FVIII/FvW humanos, según la
reivindicación 1, **caracterizada** porque el ligando está comprendido con una concentración 0,1-10 U/ml del concen-
trado.
- 25 6. Composición líquida biológicamente estable de FVIII o de FvW o del complejo FVIII/FvW humanos, según la
reivindicación 1, **caracterizada** porque el ligando es heparina sódica.
- 30 7. Composición líquida biológicamente estable de FVIII o de FvW o del complejo FVIII/FvW humanos, según
la reivindicación 1, **caracterizada** porque el inhibidor de proteasa se encuentra a una concentración superior a 0,01
UI/UI FVIII.
- 35 8. Composición líquida biológicamente estable de FVIII o de FvW o del complejo FVIII/FvW humanos, según la
reivindicación 7, **caracterizada** porque el inhibidor de proteasa se encuentra a una concentración comprendida entre
0,01-1 UI/UI FVIII.
9. Composición líquida biológicamente estable de FVIII o de FvW o del complejo FVIII/FvW humanos, según la
reivindicación 1, **caracterizada** porque el inhibidor de proteasa es un inhibidor de serina proteasa (serpina).
10. Composición líquida biológicamente estable de FVIII o de FvW o del complejo FVIII/FvW humanos, según
la reivindicación 9, **caracterizada** porque el inhibidor de serina proteasa es antitrombina.