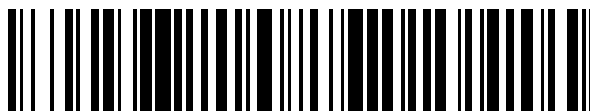


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 887 079**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2015** **PCT/JP2015/062523**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015** **WO15166885**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2015** **E 15786509 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.07.2021** **EP 3138575**

54 Título: **Preparación de HGF liofilizada**

30 Prioridad:

28.04.2014 JP 2014092888

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

21.12.2021

73 Titular/es:

EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
6-10, Koishikawa 4-chome Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP

72 Inventor/es:

OHORI, RYO y
HORIE, KANTA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 887 079 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

Preparación de HGF liofilizada

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una formulación liofilizada que comprende factor de crecimiento hepático.

Antecedentes

10 El factor de crecimiento hepático (HGF) es un péptido bioactivo que tiene actividad de proliferación de células parenquimatosas hepáticas y se ha encontrado en diversas especies de animales. En seres humanos, el factor de crecimiento hepático humano (hHGF) se ha encontrado en plasma de pacientes con hepatitis fulminante (documento de patente 1) y, en los últimos años, puede producirse en masa factor de crecimiento hepático humano recombinante (rhHGF) por biotecnología (documento que no es patente 1). Se espera que estos factores de crecimiento hepáticos
15 puedan usarse como agentes terapéuticos y profilácticos eficaces para hepatitis y cirrosis aumentando las células parenquimatosas hepáticas normales y, debido a las diversas actividades biológicas de los mismos, como agentes curativos para insuficiencia renal y lesiones en el estómago, duodeno, piel y similares resultantes de efectos secundarios de agentes antineoplásicos.

20 Se ha divulgado una formulación liofilizada que comprende factor de crecimiento hepático en el documento de patente 2, que comprende un factor de crecimiento hepático y un agente estabilizante tal como glicina, alanina, sorbitol, manitol o sulfato de dextrano.

25 El documento de patente 3 divulga una formulación liofilizada que comprende un factor de crecimiento hepático a una concentración tan baja como menos de 5 mg/ml, que es adecuada para medicamentos, comprendiendo la formulación un agente estabilizante tal como arginina, lisina, histidina, ácido glutámico o ácido aspártico.

30 El documento de patente 4 divulga una formulación liofilizada que comprende un factor de crecimiento hepático y un agente estabilizante tal como sacarosa purificada.

Lista de citas

Documentos de patente

35 [Documento de patente 1] Publicación de patente JP-A-S63-22526

[Documento de patente 2] Publicación de patente JP-A-H9-25241

40 [Documento de patente 3] Documento WO 2000/072873

[Documento de patente 4] Documento WO 2008/102849

Documentos que no son patente

45 [Documento que no es patente 1] Nature, vol. 342, pág. 440-443, 1989

Sumario de la invención

50 Problema a resolver por la invención

Sin embargo, las formulaciones liofilizadas que comprenden factor de crecimiento hepático divulgadas en la publicación de patente JP-A-H9-25241, WO 2000/072873 y WO 2008/102849 que tienen como objetivo aumentar la estabilidad del factor de crecimiento hepático, aún no logran proporcionar suficiente estabilidad en almacenamiento.

55 Además, se ha conocido la manera de suprimir la generación de impurezas junto con el factor de crecimiento hepático o la manera de mantener la relación de isoformas prealmacenamiento en formulaciones liofilizadas que comprenden factor de crecimiento hepático.

60 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación liofilizada que tenga estabilidad en almacenamiento mejorada de factor de crecimiento hepático en comparación con formulaciones liofilizadas convencionales.

65

Medio para resolver el problema

Los autores de la presente invención han realizado estudios intensivos para conseguir el objeto descrito anteriormente y, como resultado, descubrieron que es posible conseguir el objeto con una formulación liofilizada que comprende (1) un factor de crecimiento hepático, (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Por tanto, los autores de la invención han completado la presente invención.

La presente invención proporciona lo siguiente:

1. [I] Una formulación liofilizada que comprende (1) un factor de crecimiento hepático, (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;
2. [II] Un método para producir una formulación liofilizada, que comprende las etapas de:
 - (I) antes de la adición de (1) un factor de crecimiento hepático, ajustar el pH de una solución acuosa que comprende al menos (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, a pH 4,5 a 6,5, y preparar una solución acuosa que comprende (1) el factor de crecimiento hepático, (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; y
 - (II) liofilizar la solución acuosa que comprende el factor de crecimiento hepático obtenida en la etapa (I);
- [3] Un método para estabilizar un factor de crecimiento hepático incluyendo (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en una formulación liofilizada que comprende (1) un factor de crecimiento hepático;
- [4] Un método para estabilizar un factor de crecimiento hepático incluyendo (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en una formulación liofilizada que comprende (1) un factor de crecimiento hepático para suprimir la generación de agregados del factor de crecimiento hepático, suprimir la generación de impurezas junto con el factor de crecimiento hepático y/o retener una relación de isoformas prealmacenamiento;
- [5] Un método para estabilizar un factor de crecimiento hepático incluyendo (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en una formulación liofilizada que comprende (1) un factor de crecimiento hepático para suprimir la generación de agregados del factor de crecimiento hepático;
- [6] Un método para estabilizar un factor de crecimiento hepático incluyendo (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en una formulación liofilizada que comprende (1) un factor de crecimiento hepático para suprimir la generación de impurezas junto con el factor de crecimiento hepático;
- [7] Un método para estabilizar un factor de crecimiento hepático incluyendo (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en una formulación liofilizada que comprende (1) un factor de crecimiento hepático para retener una relación de isoformas prealmacenamiento del factor de crecimiento hepático; y
- [8] Los puntos [1] a [7] como se describen anteriormente, en los que el factor de crecimiento hepático tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1.

Efecto ventajoso

La presente invención puede proporcionar una formulación liofilizada que tenga estabilidad en almacenamiento mejorada de factor de crecimiento hepático en comparación con formulaciones liofilizadas convencionales.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un cromatograma representativo de impurezas junto con factor de crecimiento hepático;

La figura 2 es un cromatograma representativo de isoformas de factor de crecimiento hepático;

La figura 3 muestra la cantidad de agregados solubles en formulaciones liofilizadas ensayadas en el ejemplo de ensayo 2 inicialmente y después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes;

La figura 4 muestra la cantidad total de impurezas en formulaciones liofilizadas ensayadas en el ejemplo de ensayo 3 inicialmente y después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes;

La figura 5 muestra la relación de pico B con respecto a las isoformas en formulaciones liofilizadas ensayadas en el ejemplo de ensayo 4 inicialmente y después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes;

La figura 6 muestra la correlación entre el contenido de trehalosa y la relación de pico B con respecto a las isoformas en formulaciones liofilizadas ensayadas en el ejemplo de ensayo 4; y

La figura 7 muestra la correlación entre el contenido de arginina y la relación de pico B con respecto a las isoformas en formulaciones liofilizadas ensayadas en el ejemplo de ensayo 4.

Descripción de realizaciones

Las realizaciones de la presente invención se describen específicamente a partir de ahora en este documento. La presente invención no se limita a las realizaciones descritas a continuación y pueden modificarse de forma variada dentro del alcance de las reivindicaciones.

La formulación liofilizada de la presente invención comprende (1) un factor de crecimiento hepático, (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos (a partir de ahora en este documento también denominados "el compuesto (3)") seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Un factor de crecimiento hepático para su uso en la presente invención es una proteína que tiene la actividad de promover el crecimiento de células parenquimatosas hepáticas y no está limitada particularmente más allá de que esté purificada en la medida en que pueda usarse como medicamento. Por ejemplo, puede hacerse referencia a la publicación de patente JP-A-H11-56382.

El factor de crecimiento hepático puede ser cualquiera de los que existen de forma natural en tejido orgánico tal como hígado, bazo o riñón de mamíferos o en tejido líquido tal como plasma y suero, o los modificados que tienen secuencias de aminoácidos variantes y/o cadenas de carbohidrato variantes. Ejemplos de mamíferos incluyen seres humanos, ratas, conejos, vacas, caballos, ovejas y similares, entre los que se prefieren los seres humanos. Ejemplos de la secuencia de aminoácidos de factor de crecimiento hepático humano incluyen SEQ ID NO: 1.

El factor de crecimiento hepático puede extraerse y purificarse de tejido orgánico tal como hígado, bazo y riñón de mamíferos y de tejido líquido tal como plasma y suero, o aislarse de células que producen el factor de crecimiento hepático.

El factor de crecimiento hepático puede obtenerse introduciendo en una célula hospedadora apropiada un vector apropiado en que se ha integrado un polinucleótido que codifica el factor de crecimiento hepático mediante una técnica de genomanipulación. El vector no está limitado particularmente más allá de que permita la expresión de un polinucleótido que codifica factor de crecimiento hepático. Ejemplos del vector incluyen un vector que porta un marcador de selección que es un gen resistente a antibióticos tal como neomicina, un vector que porta un gen que codifica dihidrofolato reductasa (DHFR) o glutamina sintetasa (GS) que puede amplificarse en células animales y similares, entre los que se prefieren vectores pCI (disponibles en Promega) y vectores pcDNA (disponibles en Invitrogen). La célula hospedadora no está limitada particularmente más allá de que permita la transformación con el vector y la expresión de un factor de crecimiento hepático recombinante. Ejemplos de la célula hospedadora incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, levaduras, hongos filamentosos, células vegetales, células de insecto, células animales y similares, entre las que se prefieren células animales y las células de ovario de hámster chino (CHO) son particularmente preferidas.

El factor de crecimiento hepático obtenido mediante una técnica de genomanipulación puede ser, por ejemplo, un factor de crecimiento hepático recombinante sin limitación particular. Por ejemplo, puede hacerse referencia a la publicación de patente JP-A-H3-285693. El factor de crecimiento hepático usado puede ser, por ejemplo, un factor de crecimiento hepático humano recombinante (rhHGF) obtenido de una célula hospedadora que es una célula CHO.

El factor de crecimiento hepático puede ser un factor de crecimiento hepático modificado que se modifica por sustitución, eliminación, adición o inserción o una combinación de las mismas de uno o más, preferiblemente de 1 a 10 residuos aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un factor de crecimiento hepático de origen natural dentro del intervalo en que la secuencia de aminoácidos modificada retiene la actividad del factor de crecimiento hepático. El factor de crecimiento hepático modificado puede ser uno que tenga, por ejemplo, un 80 %, preferiblemente un 85 %, más preferiblemente un 90 % y aún más preferiblemente un 95 % de homología con la secuencia de aminoácidos de un factor de crecimiento hepático de origen natural. Por ejemplo, puede hacerse referencia al documento WO 90/010651, publicación de patente JP-A-H4-030000 y publicación de patente JP-A-H5-111383.

La concentración del factor de crecimiento hepático antes de liofilización no está particularmente limitada y puede ser, por ejemplo, 5 mg/ml o menos, preferiblemente 3 mg/ml o menos y más preferiblemente 1 mg/ml o menos.

La formulación liofilizada de la presente invención se administra por vía parenteral a los pacientes.

Cuando la formulación liofilizada se usa para administración pulmonar, la formulación liofilizada de la presente invención se disuelve antes de su uso y se administra a un paciente mediante nebulizador.

Cuando la formulación liofilizada se usa para inyección, la formulación liofilizada de la presente invención se disuelve antes de su uso y se administra por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular a un paciente.

La concentración del factor de crecimiento hepático en una solución acuosa obtenida disolviendo la formulación liofilizada no está particularmente limitada y puede ser, por ejemplo, 5 mg/ml o menos. El agua para disolver la formulación liofilizada de la presente invención no está particularmente limitada más allá de que sea agua usada en la práctica médica y ejemplos de la misma incluyen agua para inyección, agua purificada esterilizada, solución salina y similares.

La trehalosa para su uso en la presente invención no está particularmente limitada más allá de que esté purificada hasta un grado farmacéuticamente aceptable y ejemplos de la misma incluyen anhídrido de trehalosa, hidrato de trehalosa y similares. Ejemplos de hidrato de trehalosa incluyen, sin limitación particular, hidrato de trehalosa (dihidrato de trehalosa) enumerado en la Farmacopea Japonesa 16.^a edición y similares.

La cantidad de trehalosa añadida a la formulación liofilizada es tal que la relación en masa entre el factor de crecimiento hepático y trehalosa (a partir de ahora en este documento en este párrafo, expresada como la cantidad equivalente a anhídrido de trehalosa) es, por ejemplo, de 1:4 a 1:460, preferiblemente de 1:4 a 1:370 y más preferiblemente de 1:8 a 1:280. Como alternativa, siendo la masa total de la formulación liofilizada en términos de materia sólida 100,0 partes en masa, la trehalosa es, por ejemplo, de 20,0 a 95,0 partes en masa y preferiblemente de 30,0 a 94,0 partes en masa. Además, en una solución acuosa que comprende 1,0 mg/ml de factor de crecimiento hepático obtenido disolviendo la formulación liofilizada, la concentración de trehalosa es, por ejemplo, de 4,0 mg/ml a 460,0 mg/ml y preferiblemente de 8,0 mg/ml a 280,0 mg/ml.

El compuesto (3) para su uso en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El compuesto (3) no está particularmente limitado más allá de que esté purificado a un grado farmacéuticamente aceptable. Puede usarse uno o dos o más tipos del compuesto (3).

El compuesto (3) es preferiblemente, en vista de la supresión de la generación de agregaciones o impurezas uno o más seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El compuesto (3) incluye, como sustancia básica, arginina, histidina, lisina y meglumina y es preferiblemente uno o más seleccionados de arginina, histidina y lisina. La cantidad del compuesto (3) añadida a la formulación liofilizada puede estar dentro del intervalo de concentración que permita la disolución del factor de crecimiento hepático sin agregación en una solución acuosa que comprenda el factor de crecimiento hepático usado para la producción de la formulación liofilizada o en una solución acuosa que comprenda el factor de crecimiento hepático obtenida disolviendo la formulación liofilizada.

La cantidad del compuesto (3) añadida a la formulación liofilizada es tal que la relación en masa entre el factor de crecimiento hepático y el compuesto (3) (a partir de ahora en este documento en este párrafo, expresada como la cantidad equivalente a una forma libre) es, por ejemplo, de 1:1 a 1:50, preferiblemente de 1:1 a 1:40 y más preferiblemente de 1:2 a 1:35. Como alternativa, siendo la masa total de la formulación liofilizada en términos de materia sólida 100,0 partes en masa, la cantidad de compuesto (3) es, por ejemplo, de 1,5 a 60,0 partes en masa y preferiblemente de 3,0 a 59,0 partes en masa. Además, en una solución acuosa que comprende 1,0 mg/ml de factor de crecimiento hepático obtenido disolviendo la formulación liofilizada, la cantidad del compuesto (3) es, por ejemplo,

de 1,0 mg/ml a 50,0 mg/ml, preferiblemente de 1,0 mg/ml a 40,0 mg/ml y más preferiblemente de 2,0 mg/ml a 35,0 mg/ml.

5 El compuesto (3) en la presente invención puede ser una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable incluyen un clorhidrato, una sal acetato, una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de magnesio y similares.

10 En la presente invención, en una formulación liofilizada que comprende (1) un factor de crecimiento hepático, comprendiendo además (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, puede mejorarse la estabilidad en almacenamiento del factor de crecimiento hepático en comparación con formulaciones liofilizadas convencionales. La estabilidad en almacenamiento, como se usa en este documento, se refiere a la supresión de la generación de agregados del factor de crecimiento hepático, la supresión de la generación de impurezas junto con el factor de crecimiento hepático y/o la retención de la relación de isoformas prealmacenamiento.

20 La presente invención proporciona un método para estabilizar un factor de crecimiento hepático incluyendo (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en una formulación liofilizada que comprende (1) factor de crecimiento hepático.

25 Concretamente, la presente invención proporciona un método para estabilizar un factor de crecimiento hepático incluyendo (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en una formulación liofilizada que comprende (1) factor de crecimiento hepático para suprimir la generación de agregados del factor de crecimiento hepático.

30 La presente invención también proporciona un método para estabilizar un factor de crecimiento hepático incluyendo (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para suprimir la generación de impurezas en una formulación liofilizada que comprende (1) factor de crecimiento hepático junto con el factor de crecimiento hepático.

35 La presente invención proporciona además un método para estabilizar un factor de crecimiento hepático incluyendo (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en una formulación liofilizada que comprende (1) factor de crecimiento hepático para retener una relación de isoformas prealmacenamiento del factor de crecimiento hepático.

40 El término "agregados", como se usa en este documento, se refiere a agregados de factor de crecimiento hepático y ejemplos de los mismos incluyen agregados solubles tales como dímeros y trímeros y agregados insolubles generados mediante interacciones.

45 En la presente invención, la cantidad de agregados puede evaluarse, por ejemplo, midiendo la cantidad de agregados solubles por cromatografía de exclusión por tamaño.

50 En la presente invención, la cantidad de los agregados solubles es, cuando, por ejemplo, la cantidad de agregados se evalúa para una formulación liofilizada después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes por cromatografía de exclusión por tamaño, por ejemplo, menos de un 1,4 % y preferiblemente un 1,0 % o menos. Como alternativa, la cantidad de agregados medida para una formulación liofilizada después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes por cromatografía de exclusión por tamaño es, por ejemplo, 4,6 veces o menos, preferiblemente 4 veces o menos, más preferiblemente 3,5 veces o menos y aún más preferiblemente 3 veces o menos de la cantidad de agregados antes de almacenamiento.

55 La cantidad de agregados insolubles puede evaluarse por, para agregados insolubles relativamente grandes con el tamaño de 1 µm o más, el método de oscurecimiento de la luz en el ensayo de materia en partículas insolubles descrito en la Farmacopea Japonesa 16.^a edición o el método de imágenes de microflujo, y para agregados insolubles con el tamaño de 1 µm o menos, por el método de dispersión de luz o el método de ultracentrifugación.

60 El término "impureza" o "impurezas", como se usa en este documento, se refiere a una o más sustancias correspondientes al uno o más picos observados en cromatografía de fase inversa distintos del pico del factor de crecimiento hepático.

65 La cantidad de impurezas se evalúa por cromatografía de fase inversa. Por ejemplo, para las formulaciones liofilizadas usadas en los ejemplos en la presente memoria descriptiva, se observaron dos picos (a partir de ahora en este documento denominados respectivamente "ImpA" e "ImpB") en el tiempo de retención de aproximadamente 10

minutos y otras impurezas distintas de ImpA e ImpB (a partir de ahora en este documento denominadas "otras imp.") en el tiempo de retención de aproximadamente 6 a 7 minutos como se muestra en la figura 1.

En la presente invención, la cantidad de impurezas es, cuando, por ejemplo, la cantidad de impurezas se valúa para una formulación liofilizada después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes por cromatografía de fase inversa, por ejemplo, un 1,7 % o menos, preferiblemente un 1,5 % o menos, más preferiblemente un 1,3 % o menos y aún más preferiblemente un 1,0 % o menos. Como alternativa, la cantidad de impurezas medida para una formulación liofilizada después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes por cromatografía de fase inversa es, por ejemplo, menos de 9 veces, más preferiblemente 7 veces o menos, más preferiblemente 5 veces o menos y aún más preferiblemente 3 veces o menos de la cantidad de impurezas antes de almacenamiento.

El término "isoforma", como se usa en este documento, se refiere a una variante de carga de factor de crecimiento hepático y se refiere a una pluralidad de proteínas que tienen diferente estado de carga.

La relación de isoformas puede evaluarse, por ejemplo, por cromatografía de intercambio iónico. Por ejemplo, para las formulaciones liofilizadas usadas en los ejemplos en la presente memoria descriptiva, se observaron dos picos (a partir de ahora en este documento mencionados respectivamente "pico A" y "pico B") en 35 a 45 minutos de tiempo de retención como se muestra en la figura 2. La expresión "relación de isoformas", como se usa en este documento, se refiere a la proporción de cada isoforma con respecto a la cantidad total de isoformas.

La actividad biológica del factor de crecimiento hepático en la presente invención puede evaluarse de acuerdo con un ensayo celular que evalúa la proliferación de células epiteliales pulmonares de visón (células Mv.1.Lu) o células 4BMr5 en presencia de factor de crecimiento transformante β -1 (TGF β -1) (véase Journal of Immunological Methods. vol. 258, pág. 1-11, 2001 y similares) y puede expresarse como la concentración eficaz al 50 % (CE50). El cambio en la actividad biológica de la formulación liofilizada durante almacenamiento puede expresarse como el valor cuantitativo relativo (%) obtenido dividiendo la CE50 antes de almacenamiento por la CE50 después de almacenamiento.

Para mantener el pH constante de una solución acuosa que comprende factor de crecimiento hepático usado para la producción de la formulación liofilizada o de una solución acuosa que comprende factor de crecimiento hepático obtenida disolviendo la formulación liofilizada, la formulación liofilizada puede comprender un agente tamponante.

El agente tamponante para su uso en la presente invención no está particularmente limitado más allá de que sea farmacéuticamente aceptable y ejemplos del mismo incluyen ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio monohidrato, hidratos de ácido cítrico, hidratos de citrato de sodio, citrato de disodio, ácido acético, ácido acético glacial, hidratos de acetato de sodio, hidratos de carbonato de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, glicina, glicilglicina y similares.

El agente tamponante puede usarse en forma de una solución de tampón que se usa en general tal como solución de tampón fosfato, solución de tampón de ácido cítrico y solución de tampón de ácido cítrico.

La cantidad del agente tamponante en la formulación liofilizada es, en términos de la concentración en una solución acuosa que comprende factor de crecimiento hepático antes de la liofilización, por ejemplo, de 1 a 100 mM. Ajustando la concentración a este intervalo, puede conseguirse pH constante de la solución acuosa que comprende factor de crecimiento hepático obtenida disolviendo la formulación liofilizada.

El factor de crecimiento hepático tiene solubilidad variada dependiendo del pH, estando la solubilidad en un mínimo en aproximadamente el punto isoeléctrico. Por lo tanto, puede seleccionarse el pH, teniendo en cuenta el punto isoeléctrico, de modo que el factor de crecimiento hepático pueda disolverse sin agregación en una solución acuosa que comprenda el factor de crecimiento hepático usado para la producción de la formulación liofilizada o en una solución acuosa que comprenda el factor de crecimiento hepático obtenida disolviendo la formulación liofilizada.

En la presente invención, el factor de crecimiento hepático usado en los ejemplos en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, tiene la solubilidad mínima de 0,1 a 0,2 mg/ml a aproximadamente pH neutro que es el punto isoeléctrico y tiene la solubilidad de 1,6 mg/ml o mayor a aproximadamente pH 5. Por lo tanto, una solución acuosa antes de la liofilización y una solución acuosa obtenida disolviendo la formulación liofilizada tiene un pH de, por ejemplo, de 4,5 a 6,5 y preferiblemente de 5,0 a 6,0.

En el método para producir una formulación liofilizada de factor de crecimiento hepático de la presente invención, puede usarse un agente de ajuste del pH distinto del agente tamponante para ajustar el pH de una solución acuosa antes de la liofilización.

El agente de ajuste de pH para su uso en la presente invención no está particularmente limitado más allá de que sea farmacéuticamente aceptable y ejemplos del mismo incluyen ácido clorhídrico, ácido cítrico anhidro, hidratos de ácido cítrico, hidratos de citrato de sodio, glicina, ácido succínico, ácido acético, ácido acético glacial, hidratos de acetato de sodio, ácido tartárico, hidróxido de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, hidratos de carbonato de sodio, carbonato de sodio seco, monoetanolamina, trietanolamina, ácido láctico, lactato de sodio, ácido fosfórico, hidratos de

hidrogenofosfato de sodio, monohidrogenofosfato de sodio anhidro, dihidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio anhidro, dihidrogenofosfato de sodio cristalino, fosfato de trisodio, fosfato de dipotasio, dihidrogenofosfato de potasio y similares.

- 5 Para evitar la reducción del contenido de factor de crecimiento hepático en una solución farmacéutica a administrar, debida a la adsorción del factor de crecimiento hepático en el vidrio o resina que constituye un recipiente, después de reconstitución de la formulación liofilizada, la formulación liofilizada puede comprender un tensioactivo.

10 El tensioactivo para su uso en la presente invención no está particularmente limitado más allá de que sea farmacéuticamente aceptable y ejemplos del mismo incluyen tensioactivos no iónicos que incluyen específicamente polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámeros, polietilenglicoles, HCO-40, HCO-60 y similares.

15 La cantidad del tensioactivo en la formulación liofilizada es, en una solución acuosa que comprende 1,0 mg/ml de factor de crecimiento hepático obtenida disolviendo la formulación liofilizada, por ejemplo, de 0,020 a 1,0 mg/ml, preferiblemente de 0,050 a 1,0 mg/ml, más preferiblemente de 0,075 a 0,5 mg/ml y aún más preferiblemente de 0,075 a 0,2 mg/ml.

20 La formulación liofilizada de la presente invención comprende, siendo la masa total de la formulación liofilizada en términos de materia sólida 100,0 partes en masa, de 0,1 a 4,5 partes en masa del factor de crecimiento hepático, de 20,0 a 95,0 partes en masa de trehalosa (a partir de ahora en este documento en este párrafo, expresada como la cantidad equivalente a anhídrido de trehalosa) y de 1,5 a 60,0 partes en masa del compuesto (3) (a partir de ahora en este documento en este párrafo, expresada como la cantidad equivalente a una forma libre). En una realización, siendo la masa total de la formulación liofilizada en términos de materia sólida 100,0 partes en masa, el factor de crecimiento hepático representa de 0,3 a 4,4 partes en masa, la trehalosa representa de 30,0 a 94,0 partes en masa y el compuesto (3) representa de 3,0 a 59,0 partes en masa. En otra realización, el factor de crecimiento hepático representa de 0,3 a 4,4 partes en masa, la trehalosa representa de 30,0 a 94,0 partes en masa, el compuesto (3) representa de 3,0 a 59,0 partes en masa y el polisorbato 80 representa de 0,026 a 0,7 partes en masa.

30 En la presente invención, la formulación liofilizada puede comprender, además, si es necesario, un aditivo tal como un vehículo, un agente de tonicidad y un antioxidante.

Un método para producir una formulación liofilizada de la presente invención comprende las etapas de:

35 (I) antes de la adición de (1) un factor de crecimiento hepático, ajustar el pH de una solución acuosa que comprende al menos (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, a pH 4,5 a 6,5, y preparar una solución acuosa que comprende (1) el factor de crecimiento hepático, (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; y

(II) liofilizar la solución acuosa que comprende el factor de crecimiento hepático obtenida en la etapa (I).

45 La formulación liofilizada de la presente invención puede producirse mediante el método de producción.

50 En la etapa (I), el pH de una solución acuosa que comprende al menos (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se ajusta a pH 4,5 a 6,5 y preferiblemente a pH 5,0 a 6,0.

55 Antes de ajustar el pH, la solución acuosa puede comprender (2) trehalosa, pero no comprende (1) factor de crecimiento hepático. Concretamente, después de ajustar el pH de la solución acuosa que comprende al menos el compuesto (3) a pH 4,5 a 6,5, se añade (1) factor de crecimiento hepático a la misma o se añaden simultánea o secuencialmente (1) factor de crecimiento hepático y (2) trehalosa a la misma.

Para ajustar el pH, puede usarse un agente tamponante y/o un agente de ajuste del pH. La temperatura de reacción durante el ajuste el pH no está particularmente limitada.

60 La solución acuosa que comprende al menos el compuesto (3) puede prepararse disolviendo el compuesto (3) en un disolvente.

65 El disolvente para la preparación de la solución acuosa que comprende al menos el compuesto (3) no está particularmente limitado más allá de que sea, por ejemplo, agua farmacéuticamente aceptable. Ejemplos del mismo incluyen agua para inyección, agua purificada esterilizada y similares.

(1) El factor de crecimiento hepático y (2) la trehalosa pueden añadirse tal cual o en forma de solución acuosa. Un disolvente para preparar una solución acuosa puede ser el mismo que o diferente del disolvente para la preparación de la solución acuosa que comprende al menos el compuesto (3). La temperatura durante la adición de (1) factor de crecimiento hepático y (2) trehalosa no está particularmente limitada.

En la etapa (I), puede añadirse un tensioactivo, otros aditivos (un vehículo, un agente de tonicidad, un antioxidante y similares) y similares, si fuera necesario.

En la etapa (II), se liofiliza la solución acuosa que comprende el factor de crecimiento hepático obtenida en la etapa (I).

La solución acuosa que comprende el factor de crecimiento hepático puede liofilizarse de acuerdo con un método común después de verter la solución acuosa que comprende el factor de crecimiento hepático en un vial o una ampolla.

Se prefiere que la solución acuosa que comprende el factor de crecimiento hepático se esterilice por filtración a través de un filtro o similar y se liofilice.

Ejemplos del método de liofilización incluyen un método que comprende tres operaciones unitarias de una etapa de congelación para enfriamiento y congelación a presión normal, una etapa de secado principal para sublimación y secado del agua libre que no está vinculada con solutos a presión reducida y una etapa de secado secundaria para eliminar el agua adsorbida y cristalización del agua inherente a los solutos (para referencias, Pharm. Tech. Japan, vol.8, n.º 1, págs.75-87, 1992 y similares pueden mencionarse).

La temperatura durante la etapa de congelación es, por ejemplo, -40 °C o menos. La temperatura durante la etapa de secado principal es, por ejemplo, de -20 °C a 10 °C. La temperatura durante la etapa de secado secundaria es, por ejemplo, de 20 °C a 30 °C. La presión reducida es, por ejemplo, 10 Pa o menos.

El término "torta", como se usa en este documento, se refiere a una materia sólida porosa en la formulación liofilizada. Las características de la formulación liofilizada pueden evaluarse por observación visual de la estructura porosa o color de una torta o solubilidad de la formulación liofilizada en agua u observación visual de la solución acuosa así obtenida.

La formulación liofilizada de la presente invención en general es una torta aceptablemente blanca y se disuelve rápidamente en agua para dar una solución acuosa transparente e incolora.

Por otro lado, una solución acuosa obtenida disolviendo una formulación liofilizada convencional puede ser turbia posiblemente debido a la generación de agregados insolubles que pueden derivar del factor de crecimiento hepático y similares. Por tanto, las características de la solución acuosa obtenida disolviendo la formulación liofilizada pueden ser indicativas de la generación de agregados insolubles. El hecho de que la solución acuosa sea transparente después de almacenamiento de la formulación liofilizada significa que se suprime la generación de agregados insolubles.

Ejemplos

La presente invención se describe más específicamente a partir de ahora en este documento mediante ejemplos que no limitan la presente invención.

El factor de crecimiento hepático usado en los presente ejemplos se preparó sintetizando completamente un gen basado en la información de secuencia de aminoácidos divulgada en la publicación de patente JP-A-H11-056382, incorporando el gen en un vector, expresando la proteína en células CHO y aislando y purificando la proteína.

(Ejemplo 1 a 25 y ejemplos comparativos 1 a 7)

Se prepararon formulaciones liofilizadas de los ejemplos y ejemplos comparativos por el método descrito a continuación en este documento. Las tablas 1 a 4 indican las cantidades (mg) de componentes por ml de cada solución acuosa que comprende factor de crecimiento hepático. Los valores en las tablas están redondeados a una cifra decimal. Las soluciones acuosas que comprenden factor de crecimiento hepático se prepararon en el valor que varía de 100 ml a 250 ml.

Tabla 1.

	Ejemplos				Ejemplos comparativos					
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6
Factor de crecimiento hepático	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1
Dihidrato de trehalosa	100,0	100,0	100,0	100,0	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	100,0	-	-	-	10,0
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	100,0	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	100,0	-	-
L-arginina	17,4	-	-	-	17,4	17,4	17,4	17,4	17,4	-
L-histidina	-	15,5	-	-	-	-	-	-	-	-
L-lisina	-	-	14,6	-	-	-	-	-	-	-
Meglumina	-	-	-	19,5	-	-	-	-	-	-
L-alanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0
Cloruro de sodio	-	-	-	-	-	-	-	-	9,0	18,0
Ácido cítrico monohidrato	2,1									
Polisorbato 80	0,1									0,3

Tabla 2.

	Ejemplos						
	5	6	7	8	9	10	11
Factor de crecimiento hepático	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
Dihidrato de trehalosa	100,0						
L-arginina	4,2	-	-	-	-	-	-
Clorhidrato de L-arginina	16,0	-	-	-	-	-	-
Glutamato de sodio	-	18,7	-	-	-	-	-
Aspartato de sodio	-	-	17,7	-	-	-	-
Prolina	-	-	-	11,5	-	-	-
Creatina	-	-	-	-	14,9	-	-
Creatinina	-	-	-	-	-	11,3	-
Tris(hidroximetil)aminometano	-	-	-	-	-	-	12,1
Ácido cítrico monohidrato	2,1						
Polisorbato 80	0,1						

Tabla 3.

	Ejemplos						
	12	13	14	15	16	17	18
Factor de crecimiento hepático	0,5	1,0	3,1	5,1	1,1	1,0	1,0
Dihidrato de trehalosa	100,0	100,0	100,0	100,0	10,0	25,0	50,0
L-arginina	5,5	6,8	12,1	17,4	4,2	4,2	4,2
Clorhidrato de L-arginina	14,4	12,8	6,4	-	16,0	16,0	16,0
Ácido cítrico monohidrato	2,1						
Polisorbato 80	0,1						

Tabla 4.

	Ejemplos							Ejemplo comparativo 7
	19	20	21	22	23	24	25	
Factor de crecimiento hepático	1,0	1,0	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
Dihidrato de trehalosa	150,0	200,0	250,0	300,0	100,0	100,0	100,0	-
L-arginina	4,2	4,2	4,2	4,2	3,5	8,7	26,1	4,2
Clorhidrato de L-arginina	16,0	16,0	16,0	16,0	-	-	-	16,0
Ácido cítrico monohidrato	2,1							
Polisorbato 80	0,1							

<Preparación de tampón de mezcla>

De acuerdo con el volumen de cada solución acuosa que comprende factor de crecimiento hepático y la concentración indicada en las tablas 1 a 4, se mezclaron componentes distintos del factor de crecimiento hepático o polisorbato 80 y se agitaron con una cantidad apropiada de agua para inyección (aproximadamente un 80 % del volumen de la solución acuosa que comprende factor de crecimiento hepático). Después de confirmar visualmente la disolución, se ajustó el pH a 5,5 con ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio y el volumen se ajustó con agua para inyección para dar un tampón de mezcla.

<Preparación de solución acuosa que comprende factor de crecimiento hepático>

Se preparó una solución acuosa que comprende factor de crecimiento hepático mediante el siguiente procedimiento.

- (a) Una solución acuosa que comprende factor de crecimiento hepático se ajustó para que tuviera la concentración del factor de crecimiento hepático como se indica en la tabla 1 por ultrafiltración usando el tampón de mezcla anterior. La concentración de factor de crecimiento hepático se calculó a partir de la siguiente fórmula (A) después de determinar la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro de ultravioleta-visible (usando una cubeta con una trayectoria de luz de 1 cm):

$$\text{Concentración de proteína (mg/ml)} = (A_{280}/1,73) \times D \quad (A)$$

en la que:

A₂₈₀: absorbancia a 280 nm;

1,73: absorbancia teórica de una solución de muestra con un 0,1 % de concentración con la trayectoria de luz de 1 cm y a 280 nm; y

D: factor de dilución después de medición.

- (b) Después de ello se añadió polisorbato 80 para obtener la concentración deseada como se indica en la tabla 1, seguido de filtración a través de un filtro estéril (nombre del producto: filtro MILLEX GV 0,22 µm, disponible en Millipore) para dar la solución acuosa que comprende factor de crecimiento hepático.

<Etapa de liofilización>

La solución acuosa que comprende factor de crecimiento hepático se dividió a 1 ml en viales de vidrio de 5 ml que después se cerraron parcialmente con tapones de caucho. Después de liofilización de acuerdo con el programa indicado en la tabla 5, cada vial se cerró completamente con el tampón de caucho. Después se fijó un tapón de aluminio al vial de vidrio para dar una formulación liofilizada.

El ejemplo comparativo 5 es una formulación liofilizada producida de acuerdo con la formulación divulgada en el documento WO 2000/072873. El ejemplo comparativo 6 es una formulación liofilizada producida de acuerdo con la formulación divulgada en el documento WO 2008/102849.

Tabla 5.

	Congelación	Mantenimiento de congelación	Reducción de presión	Calentamiento	Secado principal	Calentamiento	Secado secundario
Temperatura (°C)	Temp. amb. → -40	-40	-40	-40 → -20	-20	-20 → 20	20
Presión (Pa)	Presión normal	Presión normal	Presión normal → 10	10	10	10	10
Tiempo (h)	1,5	4	1	2	48	8	48

(Ejemplo de ensayo 1)

- 5 Las formulaciones liofilizadas obtenidas de los ejemplos 1 a 11 y ejemplos comparativos 1 a 6 se examinaron para las características de las formulaciones liofilizadas, la solubilidad de las formulaciones liofilizadas en agua para inyección y las características de las soluciones acuosas obtenidas después de disolución de acuerdo con los siguientes procedimientos.

<Método>

10 Cada formulación liofilizada obtenida se observó visualmente (formación de torta y tonalidad de color) en fondos blanco y negro en un entorno con 1000 a 3000 lux. Después se añadió agua para inyección (1 ml) a cada formulación liofilizada que se dejó reposar antes de observación visual de la solubilidad de la formulación liofilizada y el color de la solución obtenida.

15 El término "instantánea" indicado en la tabla 6 se refiere a que la formulación se disolvió completamente en 1 minuto y la expresión "ligeramente soluble" se refiere a que la formulación no se disolvió completamente incluso después de 1 minuto.

20

<Resultados>

25 Los resultados para las muestras de los ejemplos 1 a 4 y ejemplos comparativos 1 a 6 se muestran en la tabla 6. Los ejemplos 1 a 4 formaron tortas blancas y mostraron solubilidad preferible. El ejemplo comparativo 1 que comprende xilitol y el ejemplo comparativo 3 que comprende sorbitol no formaron tortas y eran sólidos fundidos blancos o incoloros. El ejemplo comparativo 5 que no comprendía un sacárido era un sólido blanco sin formación de una torta que se observa en general para formulaciones liofilizadas. Los ejemplos 5 a 11 también formaron tortas blancas de forma similar a los ejemplos 1 a 4 y mostraron solubilidad preferible.

30

Tabla 6.

	Formación de torta	Color de torta	Solubilidad	Color de solución
Ejemplo 1	Buena	Blanca	Instantánea	Transparente
Ejemplo 2	Buena	Blanca	Instantánea	Transparente
Ejemplo 3	Buena	Blanca	Instantánea	Transparente
Ejemplo 4	Buena	Blanca	Instantánea	Transparente
Ejemplo comparativo 1	No	Incolora	Ligeramente soluble	Transparente
Ejemplo comparativo 2	Buena	Blanca	Instantánea	Transparente
Ejemplo comparativo 3	No	Blanca	Ligeramente soluble	Transparente
Ejemplo comparativo 4	Buena	Blanca	Instantánea	Transparente
Ejemplo comparativo 5	No	Blanca	Instantánea	Transparente
Ejemplo comparativo 6	Buena	Blanca	Instantánea	Transparente

Las formulaciones liofilizadas obtenidas se almacenaron en una cámara termostática a 25 °C, 40 °C o 60 °C durante 2 semanas o 1 mes seguido de los siguientes ensayos.

(Ejemplo de ensayo 2)

5 La cantidad de agregados solubles en los ejemplos 1 a 25 y los ejemplos comparativos 1 a 7 se evalúo como sigue.

<Método>

10 Se añadió agua para inyección (1 ml) a cada formulación liofilizada de ejemplo y ejemplo comparativo para disolución en enfriamiento con hielo. La solución se agitó moderadamente para obtener una solución uniforme que después se dejó reposar durante 5 minutos. La solución obtenida se distribuyó en piezas de vial de 250 µl que se colocaron en viales de HPLC para obtener muestras.

15 Cada muestra se midió por cromatografía de exclusión por tamaño en las siguientes condiciones analíticas para la cantidad de agregados solubles antes y después de almacenamiento y se calculó la cantidad de agregados solubles por el método de porcentaje de área.

Detector: UV 280 nm;

20 Columna: columna de protección (nombre comercial: TSKgel G3000SWXL, disponible en Tosoh Corporation);

Temperatura de columna: 30 °C;

25 Fase móvil: obtenida disolviendo 39 g de dihidrogenofosfato de sodio dihidrato, 87,5 g de cloruro de sodio y 5,0 g de lauril sulfato de sodio en 5000 ml de agua y ajustando el pH de la solución a 7,5 con una solución de hidróxido de sodio de 2 mol/l;

Inyección de la muestra: 50 µl; y

30 Caudal: 1 ml/min.

<Resultados>

35 Los resultados de medición de la cantidad de agregados solubles en las muestras inicialmente (antes de almacenamiento) y después de almacenamiento a 25 °C, 40 °C o 60 °C durante 2 semanas o 1 mes se muestran en las tablas 7 a 9. Los resultados de medición de la cantidad de agregados solubles en las muestras de los ejemplos 1 a 4 y los ejemplos comparativos 1 a 6 inicialmente y después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes se muestran en la figura 3. Además, la correlación entre el contenido de trehalosa en las formulaciones liofilizadas y la cantidad de agregados solubles se muestra en la tabla 10.

De acuerdo con la tabla 7, la cantidad de agregados solubles en los ejemplos comparativos 1 a 6 se aumentó con un aumento en el periodo de almacenamiento y la temperatura de almacenamiento. La cantidad de agregados solubles se aumentó significativamente después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes.

45 De acuerdo con las tablas 7 y 8 paralelamente, dicho cambio significativo en la cantidad de agregados solubles como en los ejemplos comparativos no se observó para los ejemplos 1 a 11 en las condiciones de almacenamiento ensayadas. Por tanto, se suprimió la generación de agregados solubles en los ejemplos 1 a 11 incluso en la condición de almacenamiento de 60 °C.

50 De acuerdo con las tablas 9 y 10, la cantidad de agregados solubles se aumentó significativamente en el ejemplo comparativo 7 que no comprendía trehalosa.

55 Paralelamente no se observó cambio significativo en la cantidad de agregados solubles para los ejemplos 12 a 15 que comprenden diversas cantidades de factor de crecimiento hepático y los ejemplos 23 a 25 que comprenden diversas cantidades de arginina.

Tabla 7.

	Cantidad de agregados (%)						
	Inicial	2 semanas de almacenamiento			1 mes de almacenamiento		
		25 °C de almacenamiento	40 °C de almacenamiento	60 °C de almacenamiento	25 °C de almacenamiento	40 °C de almacenamiento	60 °C de almacenamiento
Ejemplo 1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
Ejemplo 2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Ejemplo 3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4
Ejemplo 4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,8
Ejemplo comparativo 1	0,3	0,6	1,1	26,4	0,8	1,6	44,1
Ejemplo comparativo 2	0,3	0,3	0,3	0,6	0,3	0,3	1,4
Ejemplo comparativo 3	0,3	0,3	0,7	11,5	0,4	0,9	21,5
Ejemplo comparativo 4	0,3	0,3	0,3	1,9	0,3	0,4	5,6
Ejemplo comparativo 5	0,3	0,3	0,4	1,9	0,4	0,4	3,1
Ejemplo comparativo 6	0,4	0,8	1,1	6,8	1,0	1,4	18,4

Tabla 8.

	Cantidad de agregados (%)	
	Inicial	60 °C/2 semanas de almacenamiento
Ejemplo 5	0,2	0,2
Ejemplo 6	0,2	0,3
Ejemplo 7	0,3	0,3
Ejemplo 8	0,2	0,2
Ejemplo 9	0,2	0,3
Ejemplo 10	0,2	0,2
Ejemplo 11	0,2	0,3

Tabla 9.

	Cantidad de agregados (%)			
	Inicial	1 mes de almacenamiento		
		25 °C almacenamiento	40 °C almacenamiento	60 °C almacenamiento
Ejemplo 12	0,3	0,2	0,2	0,2
Ejemplo 13	0,2	0,2	0,2	0,2
Ejemplo 14	0,2	0,3	0,2	0,2
Ejemplo 15	0,2	0,2	0,3	0,3
Ejemplo 16	0,2	0,2	0,2	0,6
Ejemplo 17	0,2	0,2	0,2	0,4

	Cantidad de agregados (%)				
	Inicial	1 mes de almacenamiento			
		25 °C almacenamiento	de 40 °C almacenamiento	de 60 °C almacenamiento	de
Ejemplo 18	0,2	0,2	0,3	0,2	
Ejemplo 19	0,2	0,3	0,2	0,3	
Ejemplo 20	0,2	0,2	0,2	0,2	
Ejemplo 21	0,2	0,2	0,2	0,2	
Ejemplo 22	0,2	0,2	0,2	0,2	
Ejemplo 23	0,2	0,2	0,3	0,3	
Ejemplo 24	0,2	0,3	0,2	0,3	
Ejemplo 25	0,3	0,2	0,2	0,2	
Ejemplo comparativo 7	0,2	0,2	0,2	1,5	

Tabla 10.

	Conc. trehalosa (mg/ml)	Cantidad de agregados (%)			
		Inicial	1 mes de almacenamiento		
			25 °C almacenamiento	de 40 °C almacenamiento	de 60 °C almacenamiento
Ejemplo comparativo 7	0	0,2	0,2	0,2	1,5
Ejemplo 16	10	0,2	0,2	0,2	0,6
Ejemplo 17	25	0,2	0,2	0,2	0,4
Ejemplo 18	50	0,2	0,2	0,3	0,2
Ejemplo 13	100	0,2	0,2	0,2	0,2
Ejemplo 19	150	0,2	0,3	0,2	0,3
Ejemplo 20	200	0,2	0,2	0,2	0,2
Ejemplo 21	250	0,2	0,2	0,2	0,2
Ejemplo 22	300	0,2	0,2	0,2	0,2

(Ejemplo de ensayo 3)

5

La cantidad de impurezas en los ejemplos 1 a 25 y los ejemplos comparativos 1 a 7 se evaluó como sigue.

<Método>

10 Las muestras usadas fueron las de viales de HPLC preparadas para evaluación de la cantidad de agregados solubles.

Cada muestra se midió por cromatografía de fase inversa en las siguientes condiciones analíticas para la cantidad de impurezas antes y después de almacenamiento y se calculó la cantidad de impurezas por el método de porcentaje de área.

15

Detector: UV 215 nm;

Columna: columna de fase inversa (nombre comercial: Inertsil WP300-C8, disponible en GL Sciences Inc.) fijada con la columna de protección GL Cart;

20

Temperatura de columna: 40 °C;

Fase móvil A: agua/ácido trifluoroacético (1000:1);

25 Fase móvil B: acetonitrilo/ácido trifluoroacético (1000:0,85);

Inyección de la muestra: 25 µl;

Caudal: 1 ml/min; y

Gradiente: la relación de volumen de la fase móvil B con respecto a la cantidad total de la fase móvil A y la fase móvil B: 15 % (inicial) - 70 % (27,5 min) - 70 % (30 min) - 15 % (30,01 min) - 15 % (35 min).

<Resultados>

Los resultados de medición de la cantidad de impurezas en las muestras de los ejemplos 1 a 11 y los ejemplos comparativos 1 a 6 inicialmente (antes de almacenamiento) y después de almacenamiento a 25 °C, 40 °C o 60 °C durante 2 semanas o 1 mes se muestran en las tablas 11 y 12. Los resultados de medición de la cantidad total de impurezas en las muestras de los ejemplos 1 a 4 y los ejemplos comparativos 1 a 6 inicialmente y después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes se muestran en la figura 4.

De acuerdo con la tabla 11, la cantidad total de impurezas en los ejemplos 1 a 4 no se cambió sustancialmente en las condiciones de almacenamiento de 25 °C y 40 °C. De acuerdo con las tablas 11 y 12, un aumento en la cantidad total de impurezas en los ejemplos 1 a 11 fue como mucho 2 veces con respecto al valor inicial incluso en la condición de almacenamiento de 60 °C, mientras que un aumento en la cantidad en formulaciones de todos los ejemplos comparativos fue casi 10 veces o más. En la condición de almacenamiento de 60 °C, se descubrió que cualquiera de ImpA, ImpB y otras imp. Se aumentó en formulaciones de todos los ejemplos comparativos. Por tanto, se suprimió la generación de impurezas en los ejemplos 1 a 11 incluso en la condición de almacenamiento de 60 °C.

En los ejemplos 12 a 25, no se observó cambio significativo en la cantidad total de impurezas en cualquier condición de almacenamiento.

Tabla 11.

	Cantidad total de impurezas (%)						
	Inicia l	2 semanas de almacenamiento			1 mes de almacenamiento		
		25 °C de almacenamiento	40 °C de almacenamiento	60 °C de almacenamiento	25 °C de almacenamiento	40 °C de almacenamiento	60 °C de almacenamiento
Ejemplo 1	0,18	0,19	0,19	0,36	0,20	0,20	0,32
Ejemplo 2	0,31	0,33	0,34	0,55	0,33	0,35	0,55
Ejemplo 3	0,20	0,28	0,21	0,41	0,61	0,23	0,32
Ejemplo 4	0,19	0,20	0,21	0,42	0,20	0,20	0,47
Ejemplo comparativo 1	0,23	0,51	0,74	2,34	0,38	0,50	4,31
Ejemplo comparativo 2	0,20	0,19	0,68	0,95	0,19	0,21	2,25
Ejemplo comparativo 3	0,19	0,21	0,31	1,42	0,28	0,48	2,40
Ejemplo comparativo 4	0,19	0,20	0,48	0,89	0,29	0,31	1,71
Ejemplo comparativo 5	0,22	0,35	0,43	1,02	0,23	0,49	2,69
Ejemplo comparativo 6	0,91	1,58	1,75	2,86	1,84	2,11	3,56

Tabla 12.

	Cantidad total de impurezas (%)	
	Inicial	60 °C/2 semanas de almacenamiento
Ejemplo 5	0,21	0,38
Ejemplo 6	0,20	0,41
Ejemplo 7	0,21	0,34
Ejemplo 8	0,21	0,36
Ejemplo 9	0,20	0,38
Ejemplo 10	0,21	0,39
Ejemplo 11	0,20	0,39

(Ejemplo de ensayo 4)

5 La relación de isoformas en los ejemplos 1 a 25 y los ejemplos comparativos 1 a 7 se evalúo como sigue.

<Método>

10 Las muestras usadas fueron las de viales de HPLC preparadas para evaluación de la cantidad de agregados.

Cada muestra se midió por cromatografía de intercambio iónico en las siguientes condiciones analíticas para la cantidad de isoformas antes y después de almacenamiento y se calculó la relación de isoformas por el método de porcentaje de área.

15 Detector: UV 215 nm;

Columna: nombre comercial: Agilent Bio SCX NP5 PK, disponible en Agilent Technologies;

20 Temperatura de columna: 30 °C;

Fase móvil A: 50 mmol/l de tampón Tris-HCl (pH 9,0);

Fase móvil B: 50 mmol/l de tampón Tris-HCl (pH 9,0), 1 mol/l de NaCl

25 Inyección de la muestra: 50 µl;

Caudal: 0,5 ml/min; y

30 Gradiente: la relación de volumen de la fase móvil B con respecto a la cantidad total de la fase móvil A y la fase móvil B: 20 % (inicial) - 60 % (50 min) - 80 % (51 min) - 80 % (60 min) - 20 % (60,01 min) - 20 % (80 min).

<Resultados>

35 Los resultados de medición del cambio en la cantidad de isoformas expresada como la relación de pico B con respecto a la suma de pico A y pico B en las muestras inicialmente (antes de almacenamiento) y después de almacenamiento a 25 °C, 40 °C o 60 °C durante 2 semanas o 1 mes se muestran en las tablas 13 a 15. Los resultados de medición del cambio de relación de isoformas expresada como la relación de pico B en las muestras de los ejemplos 1 a 4 y los ejemplos comparativos 1 a 6 inicialmente y después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes se muestran en la figura 5. Además, la correlación entre el contenido de trehalosa en las formulaciones liofilizadas y la relación de pico B se muestra en la figura 6 y la correlación entre el contenido de arginina y la relación de pico B se muestra en la figura 7.

45 De acuerdo con las tablas 13 y 14, se observó poco cambio en la relación de isoformas de pico B en los ejemplos 1 a 11 y el ejemplo comparativo 5 en las condiciones de almacenamiento ensayadas, mientras que la relación de isoformas de pico B se cambió significativamente en otros ejemplos comparativos en la condición de almacenamiento de 60 °C. Por tanto, se suprimió el cambio en la relación de isoformas en los ejemplos 1 a 11 incluso en la condición de almacenamiento de 60 °C. En el ejemplo comparativo 1, se observó un cambio significativo después de almacenamiento, concretamente la isoforma de pico A se eliminó, de modo que se observó solamente la isoforma detectada que era pico B y un pico que no era una isoforma.

50 De acuerdo con la figura 6, se descubrió que la relación de isoformas de pico B se disminuía con un aumento en el contenido de trehalosa en las formulaciones. Asimismo, también se observó una disminución en la relación de isoformas de pico B para la formulación del ejemplo comparativo 7 que no comprendía trehalosa.

De acuerdo con la figura 7, se descubrió que la relación de isoformas de pico B se disminuía con una disminución en el contenido de arginina en las formulaciones en la condición de almacenamiento de 60 °C durante 1 mes.

- 5 Paralelamente no se observó cambio en la relación de isoformas de acuerdo con el cambio en el contenido de factor de crecimiento hepático en las formulaciones.

Tabla 13.

	Relación de pico B (%)						
	Inicial	2 semanas de almacenamiento			1 mes de almacenamiento		
		25 °C de almacenamiento	40 °C de almacenamiento	60 °C de almacenamiento	25 °C de almacenamiento	40 °C de almacenamiento	60 °C de almacenamiento
Ejemplo 1	90,59	90,10	90,89	89,81	90,87	90,87	90,68
Ejemplo 2	90,62	90,60	90,89	90,24	90,96	90,96	90,51
Ejemplo 3	91,51	90,22	90,79	91,09	91,04	91,21	90,70
Ejemplo 4	90,69	90,84	90,58	90,59	91,08	91,05	90,70
Ejemplo comparativo 1	90,28	90,74	89,79	85,37	89,94	90,06	100,00
Ejemplo comparativo 2	90,82	90,89	90,62	90,07	90,71	90,78	88,93
Ejemplo comparativo 3	90,53	90,99	90,84	88,44	90,75	90,52	84,56
Ejemplo comparativo 4	90,75	91,43	90,57	89,80	90,38	90,89	86,08
Ejemplo comparativo 5	91,22	90,72	90,40	90,37	90,27	90,86	90,35
Ejemplo comparativo 6	91,17	90,40	90,54	90,24	90,66	91,45	83,05

Tabla 14.

	Relación de pico B (%)	
	Inicial	60 °C/2 semanas de almacenamiento
Ejemplo 5	89,95	89,76
Ejemplo 6	89,89	89,89
Ejemplo 7	89,57	89,82
Ejemplo 8	90,00	89,35
Ejemplo 9	90,23	89,73
Ejemplo 10	89,70	89,96
Ejemplo 11	90,04	90,12

Tabla 15.

	Relación de pico B (%)			
	1 mes de almacenamiento			
	Inicial	25 °C almacenamiento	de 40 °C almacenamiento	de 60 °C almacenamiento
Ejemplo 12	90,09	89,94	90,38	89,66
Ejemplo 13	90,18	89,97	90,35	89,88
Ejemplo 14	89,71	90,20	90,26	89,76
Ejemplo 15	89,71	90,00	90,20	89,86
Ejemplo 16	90,59	90,44	90,79	90,55
Ejemplo 17	90,28	90,38	90,54	90,45
Ejemplo 18	90,15	90,19	90,15	90,49
Ejemplo 19	89,87	89,97	90,09	90,07
Ejemplo 20	89,76	90,02	89,90	89,54
Ejemplo 21	89,68	89,63	89,76	89,83
Ejemplo 22	89,51	89,72	89,61	89,29
Ejemplo 23	90,02	90,26	89,98	88,68
Ejemplo 24	90,35	89,95	90,17	89,34
Ejemplo 25	90,12	90,30	90,34	89,93
Ejemplo comparativo 7	90,05	90,37	90,65	89,77

(Ejemplo de ensayo 5)

- 5 La cantidad de agregados insolubles en los ejemplos 1 a 25 y los ejemplos comparativos 1 a 7 se evaluó como sigue.

<Método>

- 10 Se añadió agua para inyección (1 ml) a cada formulación liofilizada que se dejó reposar y después se diluyó en agua para inyección o cada solución acuosa de placebo para dar una muestra. Cada muestra se midió en un analizador de imágenes de partículas en flujo para el número de micropartículas insolubles antes y después de almacenamiento y se calculó el número de micropartículas insolubles de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Number of microparticles (number/vial)} = P \times 1000 \times V / (n \times v)$$

- 15 en la que:

P: número de partículas detectadas;

- 20 V: volumen de la solución de muestra (ml);

n: número de mediciones; y

v: volumen de la muestra por medición.

- 25 **<Resultados>**

- 30 Los resultados de medición de la cantidad de agregados insolubles en las muestras de los ejemplos 1 a 11 y los ejemplos comparativos 1 a 6 inicialmente (antes de almacenamiento) y después de almacenamiento a 60 °C durante 2 semanas o 1 mes se muestran en las tablas 16 y 17.

- 35 De acuerdo con la tabla 16, la cantidad de agregados insolubles en los ejemplos comparativos 1 a 6 se aumentó después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes. De acuerdo con las tablas 16 y 17 paralelamente, dicho cambio significativo en la cantidad de agregados insolubles como en los ejemplos comparativos no se observó para los ejemplos 1 a 11. Por tanto, se suprimió la generación de agregados insolubles en los ejemplos 1 a 11 incluso en la condición de almacenamiento de 60 °C durante 1 mes. No se observó cambio significativo en la cantidad de agregados insolubles para los ejemplos 12 a 25.

Tabla 16.

	Número de micropartículas insolubles (número/vial)					
	< 10 µm		≥ 10 µm		≥ 25 µm	
	Inicial	60 °C/1 mes de almacenamiento	Inicial	60 °C/1 mes de almacenamiento	Inicial	60 °C/1 mes de almacenamiento
Control negativo	6786	-	143	-	0	-
Ejemplo 1	13929	9286	333	190	0	0
Ejemplo 2	7857	3929	143	95	0	48
Ejemplo 3	7143	12143	286	333	95	48
Ejemplo 4	19643	6429	381	0	95	0
Ejemplo comparativo 1	18571	390000	333	87524	190	49857
Ejemplo comparativo 2	15357	7857	286	1095	48	333
Ejemplo comparativo 3	30000	7392857	381	1476	0	48
Ejemplo comparativo 4	28929	334643	238	70286	0	24476
Ejemplo comparativo 5	11071	66786	143	143	48	0
Ejemplo comparativo 6	3214	5153214	238	197238	48	18524

Tabla 17.

	Número de micropartículas insolubles (número/vial)					
	< 10 µm		≥ 10 µm		≥ 25 µm	
	Inicial	60 °C/2 semanas de almacenamiento	Inicial	60 °C/2 semanas de almacenamiento	Inicial	60 °C/2 semanas de almacenamiento
Ejemplo 5	714	357	0	0	0	0
Ejemplo 6	714	357	48	48	0	0
Ejemplo 7	2143	0	95	0	48	0
Ejemplo 8	1071	357	0	0	0	0
Ejemplo 9	714	1786	95	48	95	0
Ejemplo 10	1429	357	0	190	0	48
Ejemplo 11	357	357	48	0	0	0

5 (Ejemplo de ensayo 6)

La actividad biológica del ejemplo 1, el ejemplo comparativo 5 y el ejemplo comparativo 6 se evaluó como sigue.

<Método>

10 Se cultivaron células epiteliales pulmonares de visón (células Mv.1.Lu), se confirmó la viabilidad de las células y después se preparó una solución celular a 1×10^5 /ml. Se añadió una solución de factor de crecimiento transformante β -1 (TGFp-1) a cada pocillo de una placa de ensayo de 96 pocillos y se añadió una solución de muestra a cada pocillo de una concentración de factor de crecimiento hepático de 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 o 128 ng/ml. La
 15 solución celular de 1×10^5 /ml se añadió entonces y la placa se incubó en una estufa de incubación de dióxido de

carbono al 5 % a 37 °C durante 69 horas. Se añadió el kit de recuento celular (10 µl) disponible en Dojindo Molecular Technologies, Inc. a la placa que entonces se incubó durante 3 horas y se midió para la absorbancia a 450 nm.

La absorbancia obtenida se representó en el eje vertical con respecto a la concentración de HGF en las muestras (eje horizontal) y la CE50 de las muestras se calculó usando un programa informático analítico (SoftMax Pro disponible en Molecular Devices) empleando análisis de línea paralela y análisis lógico de 4 parámetros. El valor cuantitativo relativo (%) se calculó dividiendo la CE50 antes de almacenamiento por la CE50 después de almacenamiento.

<Resultados>

El valor cuantitativo relativo de CE50 de las muestras del ejemplo 1 y los ejemplos comparativos 5 y 6 después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes se muestra en la tabla 18.

De acuerdo con la tabla 18, se observó una disminución en el valor cuantitativo relativo para los ejemplos comparativos 5 y 6 después de almacenamiento a 60 °C durante 1 mes.

Paralelamente, no se observó disminución en el valor cuantitativo relativo para el ejemplo 1, lo que indica que la actividad biológica se retenía incluso en la condición de almacenamiento de 60 °C durante 1 mes.

Tabla 18.

	Ejemplo 1	Comp. Ejemplo 5	Comp. Ejemplo 6
Valor cuantitativo relativo (%)	101	80	45

Aplicabilidad industrial

La formulación liofilizada de la presente invención tiene una aplicabilidad industrial, ya que puede proporcionar a la práctica médica formulaciones de factor de crecimiento hepático que tienen alta calidad.

Texto libre de lista de secuencias

SEQ ID NO: 1 representa una secuencia de aminoácidos de factor de crecimiento hepático humano.

LISTA DE SECUENCIAS

[0127]

<110> Eisai R&D Management Co., Ltd.

<120> Preparación de HGF liofilizada

<130> E0405AGP0001

<150> 2014-092888

<151> 2014-04-28

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 728

<212> PRT

<213> Humano

<400> 1

ES 2 887 079 T3

Met	Trp	Val	Thr	Lys	Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Gln	His	Val	Leu
1				5					10					15	
Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ile	Ala	Ile	Pro	Tyr	Ala	Glu	Gly	Gln
			20					25					30		
Arg	Lys	Arg	Arg	Asn	Thr	Ile	His	Glu	Phe	Lys	Lys	Ser	Ala	Lys	Thr
		35					40					45			
Thr	Leu	Ile	Lys	Ile	Asp	Pro	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys	Thr	Lys	Lys	Val
	50					55					60				
Asn	Thr	Ala	Asp	Gln	Cys	Ala	Asn	Arg	Cys	Thr	Arg	Asn	Lys	Gly	Leu
65					70					75					80
Pro	Phe	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Val	Phe	Asp	Lys	Ala	Arg	Lys	Gln	Cys
				85					90					95	
Leu	Trp	Phe	Pro	Phe	Asn	Ser	Met	Ser	Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Glu	Phe
			100					105					110		
Gly	His	Glu	Phe	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Asn	Cys
		115					120					125			
Ile	Ile	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	Lys
	130					135					140				
Ser	Gly	Ile	Lys	Cys	Gln	Pro	Trp	Ser	Ser	Met	Ile	Pro	His	Glu	His
145					150					155					160
Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Lys	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn	Tyr

ES 2 887 079 T3

165								170					175				
Cys	Arg	Asn	Pro	Arg	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Ser		
			180				185						190				
Asn	Pro	Glu	Val	Arg	Tyr	Glu	Val	Cys	Asp	Ile	Pro	Gln	Cys	Ser	Glu		
		195				200					205						
Val	Glu	Cys	Met	Thr	Cys	Asn	Gly	Glu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Leu	Met	Asp		
210					215				220								
His	Thr	Glu	Ser	Gly	Lys	Ile	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	His	Gln	Thr	Pro		
225					230				235			240					
His	Arg	His	Lys	Phe	Leu	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Asp	Lys	Gly	Phe	Asp		
			245				250						255				
Asp	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	Tyr		
			260				265				270						
Thr	Leu	Asp	Pro	His	Thr	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Ala	Ile	Lys	Thr	Cys		
275					280				285								
Ala	Asp	Asn	Thr	Met	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Thr	Glu		
290					295				300								
Cys	Ile	Gln	Gly	Gln	Gly	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Asn	Thr	Ile		
305					310				315			320					
Trp	Asn	Gly	Ile	Pro	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Ser	Gln	Tyr	Pro	His	Glu		
			325				330						335				
His	Asp	Met	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Cys	Lys	Asp	Leu	Arg	Glu	Asn		
			340				345						350				
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr		
		355				360				365							
Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Val	Gly	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ile	Pro	Asn	Cys	Asp		
370					375				380								
Met	Ser	His	Gly	Gln	Asp	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Met		
385					390				395			400					
Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	Thr	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr	Cys	Ser	Met	Trp	Asp		
				405				410						415			

ES 2 887 079 T3

Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala
 420 425 430
 Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala His
 435 440 445
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys
 450 455 460
 Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu
 465 470 475 480
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val
 485 490 495
 Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg
 500 505 510
 Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp
 515 520 525
 Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr
 530 535 540
 Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys
 545 550 555 560
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly
 565 570 575
 Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp
 580 585 590
 Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu
 595 600 605
 Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn
 610 615 620
 Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu
 625 630 635 640
 Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu
 645 650 655
 Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp
 660 665 670

ES 2 887 079 T3

Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu
675 680 685

Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly
690 695 700

Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
705 710 715 720

Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
725

REIVINDICACIONES

1. Una formulación liofilizada que comprende:

- 5 (1) un factor de crecimiento hepático;
- (2) trehalosa; y
- 10 (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

2. Un método para producir una formulación liofilizada, que comprende las etapas de:

- 15 (I) antes de la adición de (1) un factor de crecimiento hepático, ajustar el pH de una solución acuosa que comprende al menos (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, a pH 4,5 a 6,5, y preparar una solución acuosa que comprende (1) el factor de crecimiento hepático, (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; y
- 20 (II) liofilizar la solución acuosa que comprende el factor de crecimiento hepático obtenida en la etapa (I).
- 25 3. Un método para estabilizar un factor de crecimiento hepático incluyendo (2) trehalosa y (3) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, meglumina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, creatina, creatinina, tris(hidroximetil)aminometano y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en una formulación liofilizada que comprende (1) un factor de crecimiento hepático.
- 30

Fig.1

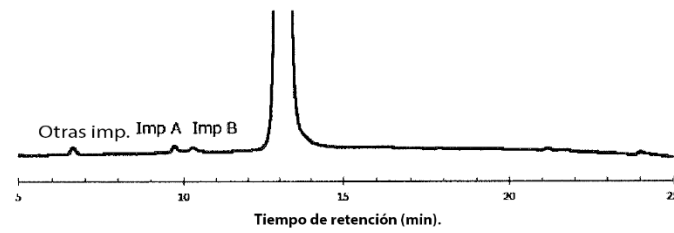


Fig.2

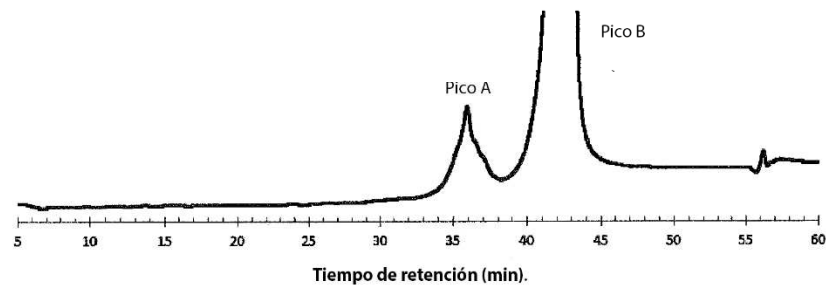


Fig.3

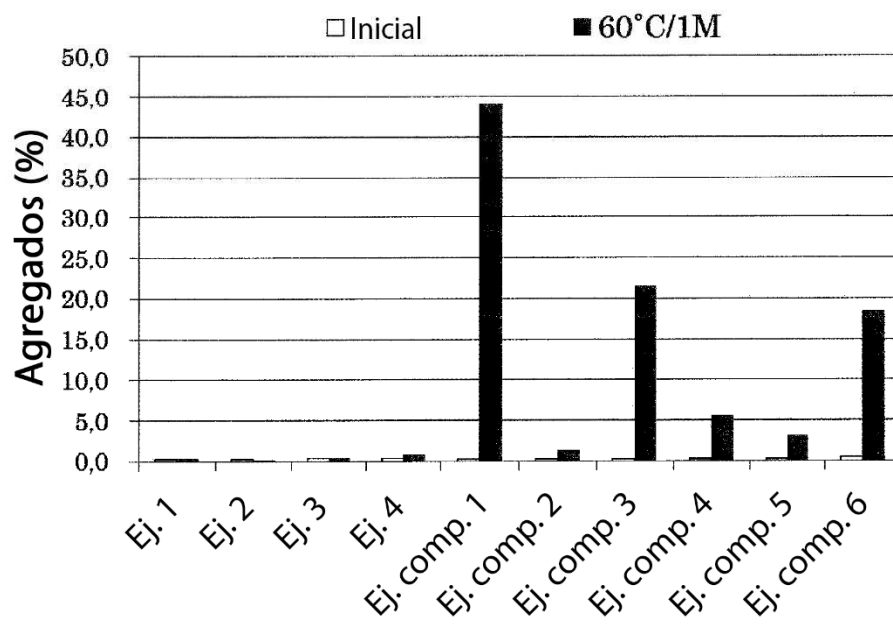


Fig.4

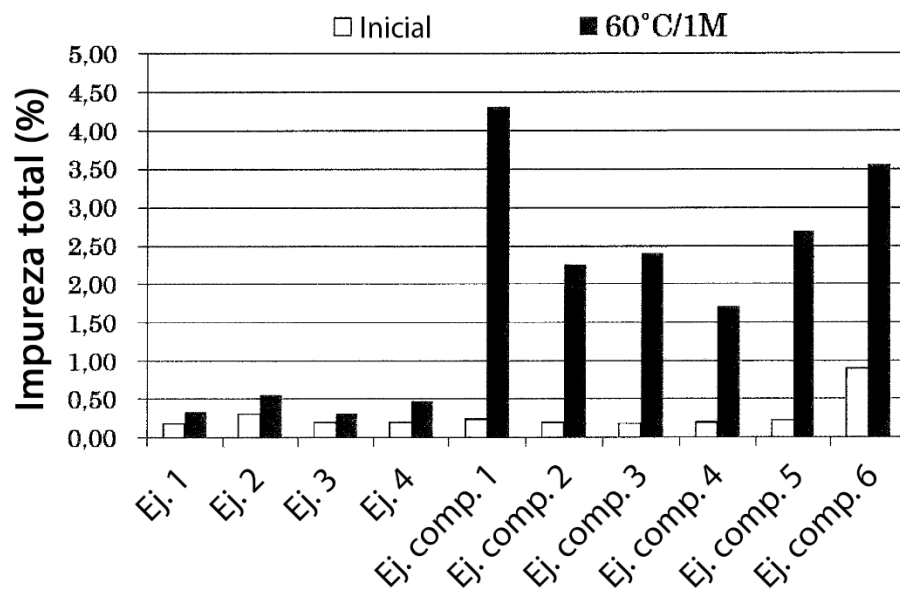


Fig.5

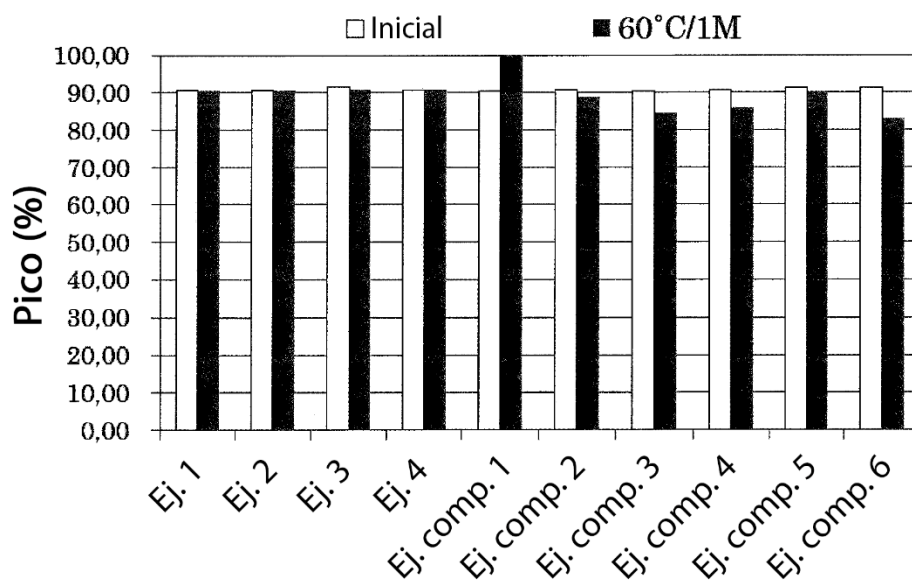


Fig.6

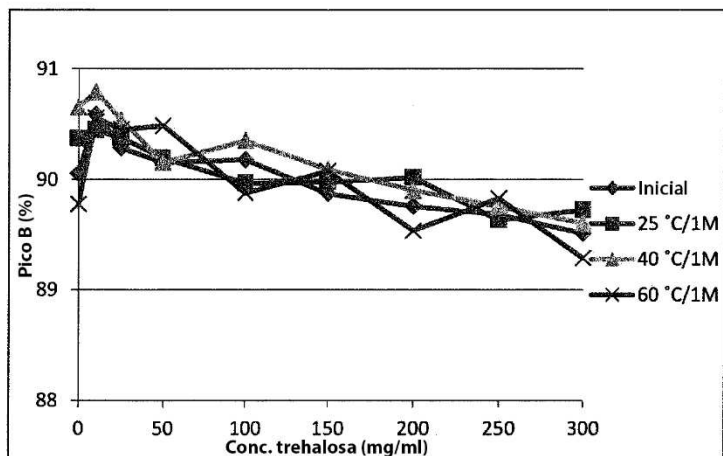


Fig.7

