



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 243 994**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2006.01) **C07K 1/00** (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01) **C07K 16/00** (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01) **A61K 47/40** (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **97921280 .0**

96 Fecha de presentación : **17.04.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0954326**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.1999**

54 Título: **Procedimiento para la inactivación vírica de proteínas de la sangre liofilizadas.**

30 Prioridad: **19.04.1996 US 634921**

73 Titular/es: **Grifols Inc.**
2410 Lillyvale Avenue
Los Angeles, California 90032, US

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.12.2005**

72 Inventor/es: **Bhattacharya, Prabir y**
Motokubota, Toshiharu

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **29.10.2009**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **29.10.2009**

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

ES 2 243 994 T5

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la inactivación vírica de proteínas de la sangre liofilizadas.

5 Sector técnico al que pertenece la invención

La presente invención se refiere a la inactivación de contaminantes víricos de preparados farmacéuticos. De manera más específica, la presente invención está dirigida a un proceso para la inactivación de contaminantes víricos de factor VIII liofilizado, por la acción del calor.

10 Antecedentes de la invención

La utilización terapéutica primaria del factor VIII ha sido su administración intravenosa a pacientes de hemofilia A. En casos graves, se requieren concentraciones relativamente elevadas de factor VIII. Estas elevadas concentraciones se obtienen por purificación y concentración de factor VIII. El factor VIII se encuentra a disposición comercialmente en forma de polvo seco, estéril, liofilizado, que es reconstituido con agua destilada estéril o con una solución salina fisiológica estéril para infusión en un paciente de hemofilia A.

En la técnica conocida se describen varios métodos referentes al factor VIII. El documento WO-A-9 526 750 da a conocer formulaciones que comprenden el factor de coagulación VIII o IX para administración subcutánea, intramuscular o intradérmica, de forma que aditivos de ciclodextrinas incrementan la biodisponibilidad del factor VIII (ver página 8, líneas 19-28). Además, dichas formulaciones se encuentran en forma liofilizada y son reconstituidas con una solución acuosa (ver página 11, segundo párrafo). No obstante, no se hace mención en el documento WO-A-9 526 750 de un complejo liofilizado de proteína/ciclodextrina que es calentado, como mínimo, a 60°C.

El documento WO-A 9 003 784 da a conocer complejos de ciclodextrina-péptido, incluyendo factores VIII y IX (ver resumen página 21, líneas 15-25, página 27, líneas 4-7). No obstante, el documento WO-A-9 003 784 no indica nada sobre una etapa de calentamiento de dicho complejo de ciclodextrina-péptido a un mínimo de 60°C.

La Patente US-A-5 334 382 da a conocer compuestos de proteínas liofilizados, incluyendo sustancias de proteínas biológicamente activas combinadas con ciclodextrina (ver abstracto, columna 3, líneas 26-37, columna 4, línea 51 pasando a columna 5, líneas 1-37).

La Patente US-A-5 304 546 se refiere a complejos de ciclodextrina con compuestos lipofílicos, en los que la presencia de compuestos biológicos, tales como sangre, huevo y leche son también contemplados (ver abstracto, columna 1, líneas 8-18).

El documento WO-A-9 309 790 da a conocer la combinación de derivados poliiónicos de ciclodextrina con un factor de crecimiento (ver abstracto, página 12, líneas 10-27, página 22, línea 30 con página 31, líneas 1-8). Ninguna referencia se hace en el documento WO-A-9 309 790 al calentamiento de un complejo liofilizado de una proteína y ciclodextrina.

El documento EP-A-614 666 da a conocer complejos de polipéptidos liofilizados con ciclodextrina a utilizar en soluciones parenterales (ver abstracto, página 3, líneas 9-12, reivindicaciones 1-13).

El documento WO-A-820 387 da a conocer un método de inactivación de virus en compuestos que contienen factores coagulantes de la sangre VII, IX y X por calentamiento de los compuestos en estado seco (ver abstracto, página 15, líneas 9-24, página 17, líneas 6-14). Además, en la página 6, líneas 11-15 se menciona la presencia de estabilizantes, tales como monosacáridos reductores, oligosacáridos y alcoholes de azúcar.

La publicación Pharmaceutical Research, 9(2), 1992, pp. 266-270, M.E. Rensing y otros, llega al resultado que la hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPbetaCD) es el estabilizante más efectivo del anticuerpo monoclonal liofilizado (MN12). Rensing y otros hacen referencia a la estabilidad de tortas de MN12 liofilizadas que contienen HPbetaCD, con respecto a alteraciones de carga inducidas por calor y pérdida de capacidad de unión a antígenos, con lo que los correspondientes preparados de MN12 son tratados a una temperatura de 56°C. Rensing y otros no mencionan otras gamas de temperatura.

El problema que subyace en estos compuestos es que cualesquiera contaminantes víricos del factor VIII deben ser inactivados antes de que el preparado del factor VIII pueda ser utilizado clínicamente, evitando, de esta manera, la propagación de HIV, hepatitis, etc. Existen una serie de enfoques diferentes para inactivar virus en el factor VIII. Un enfoque consiste en calentar el producto liofilizado a un mínimo de 60°C durante un mínimo de 10 horas. Habitualmente, los productos liofilizados son calentados a 60°C o, incluso, a 80°C durante 72 horas.

Se ha descubierto que un producto de factor VIII tratado térmicamente, liofilizado, requiere más tiempo de lo deseado en ser reconstituido, y, adicionalmente, el producto de factor VIII puede perder una parte sustancial de su actividad durante el proceso de liofilización y calentamiento. De acuerdo con ello, el calentamiento del factor VIII liofilizado durante períodos de tiempo prolongados, por ejemplo, 80°C durante 72 horas, para conseguir la inactivación vírica, no es un enfoque preferente.

Características de la invención

La presente invención da a conocer un procedimiento para la estabilización de factor VIII liofilizado, tal como se describe en las reivindicaciones. El proceso comprende el disponer una solución acuosa de la proteína Factor VIII. Se añade ciclodextrina a una solución en una cantidad suficiente para formar un complejo, como mínimo, con una parte, y preferentemente con la totalidad de la proteína Factor VIII. La solución es liofilizada a continuación para conseguir un complejo seco de proteína Factor VIII/ciclodextrina.

El complejo liofilizado de proteína Factor VIII/ciclodextrina es calentado a continuación a una temperatura de, como mínimo, 60°C y durante un tiempo suficiente para inactivar cualquier contaminante vírico y, preferentemente, a, como mínimo, aproximadamente 80°C durante un tiempo mínimo de unas 10 horas y, preferentemente, un mínimo de 72 horas. El complejo víricamente inactivado de proteína Factor VIII/ciclodextrina puede ser reconstituido posteriormente para conseguir una solución de la proteína Factor VIII administrable a un paciente.

Se ha descubierto que la estabilización de la proteína Factor VIII con ciclodextrina antes de liofilización resulta en una notable reducción de la desnaturalización de la proteína durante la inactivación vírica por acción de calor, en seco. De forma adicional, el tiempo de reconstitución para la proteína Factor VIII liofilizada, estabilizada de acuerdo con la práctica de la presente invención, se reduce sustancialmente, con una reducción correspondiente de precipitados insolubles.

Los objetivos de la presente invención se consiguen mediante las reivindicaciones que se adjuntan.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se comprenderán mejor haciendo referencia a la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y dibujos, en los que:

las figuras 1A-1C muestran, respectivamente, α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, y γ -ciclodextrina;

la figura 2 es un gráfico de barras, que indica la actividad residual del factor VIII como función de la concentración de hidroxipropil β -ciclodextrina; y

la figura 3 es un gráfico de barras que indica la actividad residual del factor VIII como función de la concentración de ciclodextrina.

Descripción detallada

Las ciclodextrinas son un grupo de oligosacáridos homólogos, que son obtenidos a partir del almidón por la acción de enzimas procedentes de *Bacillus macerans*. Son moléculas cíclicas que contienen seis o más unidades α -D-glucopiranosas ligadas entre sí en las posiciones 1, 4, tal como en la amilosa. Esta estructura cíclica puede ser indicada también como toro.

Las ciclodextrinas útiles en la práctica de la presente invención son las α -, β - y γ -ciclodextrinas, que están compuestas, respectivamente, de seis, siete y ocho unidades de α -D-glucopiranosas, así como derivados, tales como hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Las figuras 1a, 1b y 1c muestran la estructura de tres de las ciclodextrinas más habituales. La α -ciclodextrina tiene seis unidades de glucopiranosas, la β -ciclodextrina tiene siete unidades de glucopiranosas, y la γ -ciclodextrina tiene ocho unidades de glucopiranosas. Se incluyen mezclas de estos materiales en el término "ciclodextrina" que se utiliza en esta descripción.

La ciclodextrina puede ser añadida a una solución acuosa, que contiene la proteína Factor VIII antes de liofilización en cualquier punto adecuado del proceso de purificación. Preferentemente, la ciclodextrina es añadida a una solución acuosa de la proteína Factor VIII después de que se han completado todas las etapas de purificación. Esto se lleva a cabo para impedir que la ciclodextrina forme un complejo con impurezas, haciendo más difícil la eliminación de las impurezas.

La ciclodextrina se añade en una cantidad suficiente para asegurar la formación de un complejo con la proteína Factor VIII, es decir, una cantidad de ciclodextrina que proporcione una solución acuosa con una concentración de ciclodextrina desde aproximadamente 0,8% a aproximadamente 5% en peso/volumen (peso/volumen), y, preferentemente, aproximadamente 3% peso/volumen.

Se ha descubierto que la presencia de ciclodextrina durante inactivación vírica por acción del calor de la proteína Factor VIII liofilizada reduce sustancialmente la desnaturalización de la proteína Factor VIII. La actividad residual de la proteína Factor VIII, después de la inactivación vírica por calor, en seco, a 80°C durante 72 horas y reconstitución es, como mínimo, de 90% y, preferentemente, como mínimo de 95%, e incluso de modo más preferente, como mínimo, de 98% aproximadamente de la actividad de la proteína Factor VIII antes de la inactivación vírica.

También se ha descubierto que el tiempo de reconstitución se reduce sustancialmente por la presencia de ciclodextrina durante la liofilización y la activación por calor, en seco.

ES 2 243 994 T5

Ejemplo 1

Proceso general para la preparación de Factor VIII

5 En una realización a título de ejemplo, el material inicial para el liofilizado de factor VIII es plasma, congelado a una temperatura aproximada de -20°C . El plasma es descongelado a una temperatura de 0° a 5°C , durante cuyo tiempo se forma un precipitado (crioprecipitado) que se retira por centrifugación y se recupera para purificación y concentración adicionales.

10 El crioprecipitado es suspendido en agua destilada heparinizada (250 unidades de heparina o menos por mL) y es mezclada a $25 \pm 10^{\circ}\text{C}$ hasta que queda bien suspendida y el pH de la solución se ajusta a $7,0 \pm 1,0$ con HCl diluido. El volumen de agua destilada de heparinizada utilizada es de 6 ± 4 litros por kilo de crioprecipitado.

15 A continuación, se añadió PEG a la solución hasta una concentración final de $3 \pm 2\%$ y se mezcló a $25 \pm 10^{\circ}\text{C}$. El pH de la suspensión se ajustó a continuación de $6,5 \pm 1,0$ con ácido acético diluido. La suspensión se mezcló a una temperatura de $25 \pm 10^{\circ}\text{C}$ durante un tiempo no inferior a 15 minutos. El precipitado formado se retiró por centrifugación.

20 El sobrenadante recuperado de la centrifugación fue filtrado para eliminar cualesquiera partículas sólidas, formando, de esta manera, una solución filtrada de factor VIII. Se añadieron Tri(n-butyl) fosfato (TNBP) y Polisorbato 80 a la solución de factor VIII filtrada hasta una concentración final de $0,30 \pm 0,02\%$ TNBP volumen/peso y $1,00 \pm 0,05\%$ de polisorbato 80 peso/peso. El pH de la mezcla fue ajustado a $6,5 \pm 1,0$ con ácido acético diluido e hidróxido sódico. El producto fue transferido, a continuación, a un área de control vírico siguiendo 1 hora de incubación a $27^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. La suspensión fue mezclada a $27^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante un tiempo no inferior a 6 horas y no superior a 12 horas para formar una solución de disolvente detergente (SD) de factor VIII.

25 La solución SD de factor VIII fue cargada en una columna cromatográfica de intercambio aniónico QAE-550C con un tampón de unión que comprendía NaCl 0,35 M e histidina 0,025 M con un pH de 6,8. La columna fue lavada con un tampón de lavado que comprendía NaCl 0,35 M e histidina 0,025 M, con un pH de 6,8 y, a continuación, se lavó nuevamente con un tampón de lavado, comprendiendo CaCl_2 a 0,1 M e histidina 0,025 M a un pH de 6,8. El factor VIII fue eluido con un tampón de elución, comprendiendo CaCl_2 0,2 M e histidina 0,025 M, con un pH de 6,8. El factor VIII fue entonces purificado adicionalmente, utilizando glicina y NaCl para precipitar el factor VIII. Se añadió la glicina al eluido hasta una concentración final de 2 M y, a continuación, se añadió NaCl hasta una concentración final de 1,6 M. La mezcla fue incubada a continuación durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla fue centrifugada y el factor VIII precipitado fue recuperado. El precipitado de complejo de factor VIII fue reconstituido en una solución de arginina 0,1 M e histidina 0,025 M, con un pH de 7,3. Esta solución se indica también como "masa purificada". La actividad del factor VIII en la solución fue medida, y esta solución fue utilizada, a continuación, para otros procesos.

Ejemplo 2

40 En este ejemplo, una solución estéril de masa de factor VIII, según el Ejemplo 1, con la actividad específica de 370 unidades por miligramo, fue llenada en viales con diferentes aditivos y, a continuación, fue liofilizada. El producto liofilizado de factor VIII fue sometido, a continuación, a secado-calentamiento (DH) (80°C durante 72 horas). Los preparados finales fueron reconstituidos con agua para inyección. El tiempo de reconstitución y la actividad residual del factor VIII se midieron durante un ensayo de coagulación de una etapa. Los resultados de las pruebas, que se indican en la siguiente tabla 1, muestran que el factor VIII que fue liofilizado a partir de la solución que comprendía 3% de ciclodextrina (hidroxipropil- β -ciclodextrina) era más estable que el factor VIII preparado utilizando diferentes cantidades de otros materiales, tales como albúmina, Tween 80®, PEG, glicina, citrato sódico, dextrina e histidina.

TABLA I

50

Rastreo de aditivo para Factor VIII altamente purificado			
Aditivo	F.VIII: U/ml		Tiempo de reconstitución (seg.) después de DH
	antes de DH	después de DH	
Sin aditivo	77,5 (100%)	45,1 (58%)	20
0,1 % Tween 80®	71,8 (")	18,4 (26%)	12
0,1% PEG	83,2 (")	13,8 (17%)	>10 min
0,2M glicina	78,8 (")	42,1 (53%)	15
0,2M Na citrato	92,8 (")	26,1 (28%)	60
3% ciclodextrina	75,8 (")	74,5 (98%)	<10
3% dextrina	79,2 (")	43,1 (54%)	22
0,1M histidina	70,9 (")	51,0 (72%)	10

65

Ejemplo 3

En un experimento similar, se prepararon soluciones de control y de prueba utilizando 0,5% de albúmina y 3% de ciclodextrina como aditivos. Las soluciones fueron liofilizadas, y las muestras liofilizadas fueron sometidas a continuación a secado térmico a 80°C durante 72 horas. Los resultados de la prueba se muestran en la siguiente tabla II. Se muestra que el factor VIII asociado con ciclodextrina al 3% era sustancialmente más estable cuando se calentaba en seco que con el factor VIII estabilizado con 0,5% de albúmina solamente.

TABLA II

Actividad del producto en la etapa de calentamiento en seco		
Aditivo	Calentamiento en seco (80°C, 72 horas)	F.VIII:C. U/ml (.)
Sin aditivo	antes DH	132 (100)
	después DH	86 (65)
0,5%-albúmina	antes DH	128 (100)
	después DH	98 (77)
3%-ciclodextrina (HPB)	antes DH	127 (100)
	después DH	114 (90)

Ejemplo 4

En otra prueba, la concentración óptima de ciclodextrina utilizada para estabilizar el factor VIII fue estudiada midiendo la actividad residual del factor VIII como función de la concentración de la ciclodextrina utilizada en la solución antes de liofilización y calentamiento en seco. Los resultados, que se indican en la figura 2, muestran que, para la concentración de 0,2% de ciclodextrina, la actividad residual del factor VIII era aproximadamente del 62%; para una concentración de 3% de ciclodextrina, la actividad de factor VIII era aproximadamente de 98-99%, mientras que para una concentración de 5% de ciclodextrina, la actividad residual descendió aproximadamente a 88%-90%.

Ejemplo 5

En otra prueba el factor VIII fue estabilizado con tres ciclodextrinas distintas, a saber, hidroxipropil- β -ciclodextrina al 3%, metiléter- β -ciclodextrina al 3%, y γ -ciclodextrina al 3%. Los resultados de esta prueba se indican en la siguiente tabla III, mostrando que cada una de las tres diferentes ciclodextrinas utilizadas era eficaz en la estabilización del factor VIII.

TABLA III

Aditivo	Calentamiento en seco (80°C, 72 horas)	F.VIII:C U/ml (%)
3% hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPB)	antes DH	58 (100)
	después DH	52 (90)
3% metil éteres- β -ciclodextrina	antes DH	68 (100)
	después DH	69 (101)
3% γ -ciclodextrina	antes DH	54 (100)
	después DH	61 (113)

Las descripciones anteriores de realizaciones de procesos a título de ejemplo para la preparación de productos de Factor VIII estabilizados tienen objetivo ilustrativo. El ámbito de la invención es el que se define en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la inactivación de contaminantes víricos de proteínas, que comprende las siguientes etapas:

(a) disponer una solución acuosa de proteína;

(b) añadir a la solución una ciclodextrina en una cantidad suficiente para formar un complejo estable con la proteína;

(c) liofilizar la solución de la etapa (b) y recuperar el complejo de proteína liofilizada/ciclodextrina; y

(d) calentar el complejo de proteína liofilizada/ciclodextrina a, como mínimo, 60°C durante un tiempo suficiente para inactivar cualesquiera virus presentes en el complejo de proteína/ciclodextrina.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la ciclodextrina es seleccionada del grupo que consiste en α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, y mezclas de las mismas.

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el complejo liofilizado de proteína/ciclodextrina recuperado en la etapa (c) es calentado a una temperatura de, como mínimo, aproximadamente 60°C, durante, como mínimo, 10 horas.

4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el complejo liofilizado de proteína/ciclodextrina recuperado en la etapa (c) es calentado a una temperatura de, como mínimo, aproximadamente 80°C durante, como mínimo, 72 horas.

5. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende, además, la etapa que reconstituye el complejo liofilizado de proteína/ciclodextrina.

6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la ciclodextrina es añadida a la solución de la etapa (a) a una concentración aproximada de 3% (peso/volumen).

7. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que la actividad residual de la proteína después de liofilización, calentamiento y reconstrucción es, como mínimo, de 90% de la actividad de la proteína antes de liofilización.

8. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que la actividad residual de la proteína después de liofilización, calentamiento y reconstitución es, como mínimo, aproximadamente 95% de la actividad de la proteína antes de liofilización.

9. Procedimiento para la inactivación vírica de contaminantes del factor VIII, que comprende las siguientes etapas:

(a) disponer una solución acuosa de Factor VIII;

(b) añadir a la solución una ciclodextrina seleccionada del grupo que consiste en α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, de manera que la solución tiene una concentración de ciclodextrina comprendida aproximadamente de 0,1% a 3% (peso/volumen) para formar de esta manera un complejo Factor VIII/ciclodextrina;

(c) liofilizar la solución de la etapa (b) y recuperar el complejo liofilizado de Factor VIII/ciclodextrina; y

(d) calentar el complejo liofilizado de Factor VIII/ciclodextrina a un mínimo de 60°C durante un tiempo suficiente para inactivar cualesquiera virus presentes en el complejo de Factor VIII/ciclodextrina.

10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que el complejo de Factor VIII/ciclodextrina liofilizado recuperado de la etapa (c) es calentado a una temperatura de, como mínimo, aproximadamente 60°C durante, como mínimo, 10 horas.

11. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que el complejo de Factor VIII/ciclodextrina liofilizado recuperado en la etapa (c) es calentado a una temperatura de, como mínimo, aproximadamente 80°C durante, como mínimo, 72 horas.

12. Procedimiento, según la reivindicación 9, que comprende además la etapa de reconstituir el complejo liofilizado de Factor VIII/ciclodextrina.

13. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la ciclodextrina se añade a la solución de la etapa (a) en una concentración aproximada de 3% (peso/volumen).

ES 2 243 994 T5

14. Procedimiento, según la reivindicación 16, en el que la actividad residual del factor VIII después de liofilización, calentamiento y reconstitución es, como mínimo, 90% aproximadamente de la actividad de Factor VIII antes de la liofilización.

- 5 15. Procedimiento, según la reivindicación 16, en el que la actividad residual del Factor VIII después de liofilización, calentamiento y reconstitución es, como mínimo, 95% de la actividad del Factor VIII antes de la liofilización.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1a

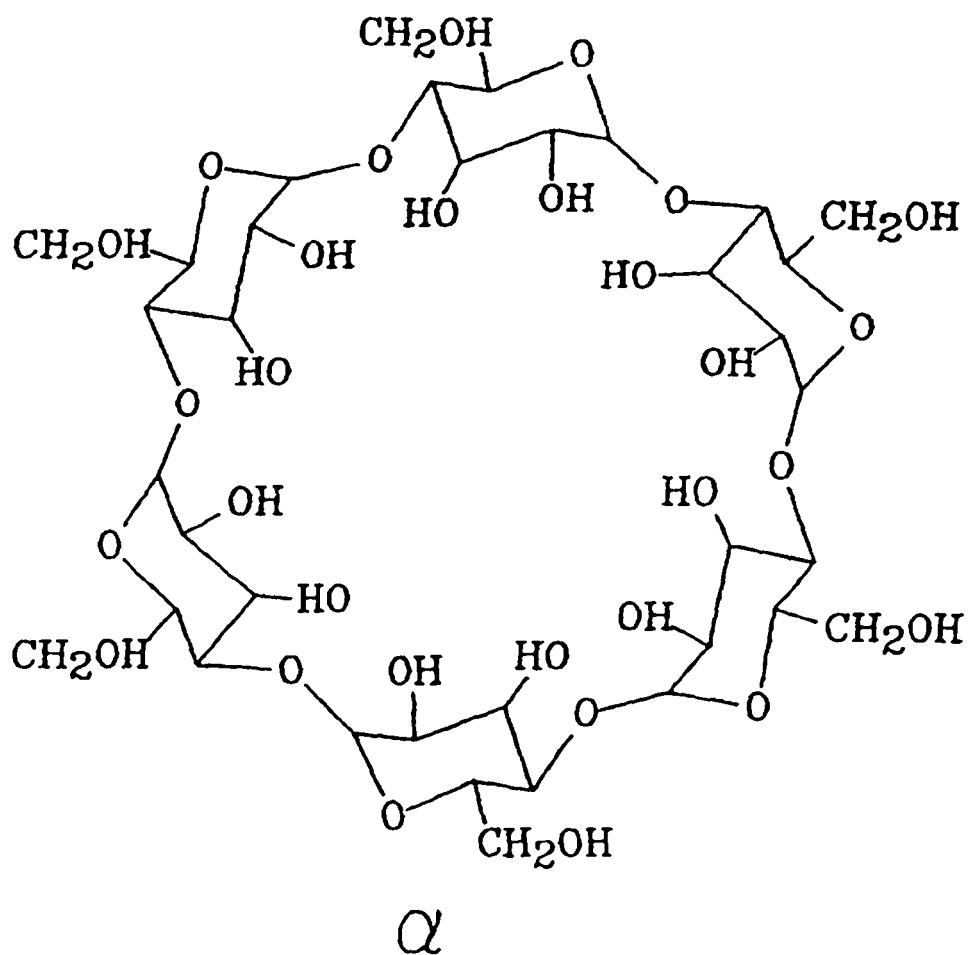
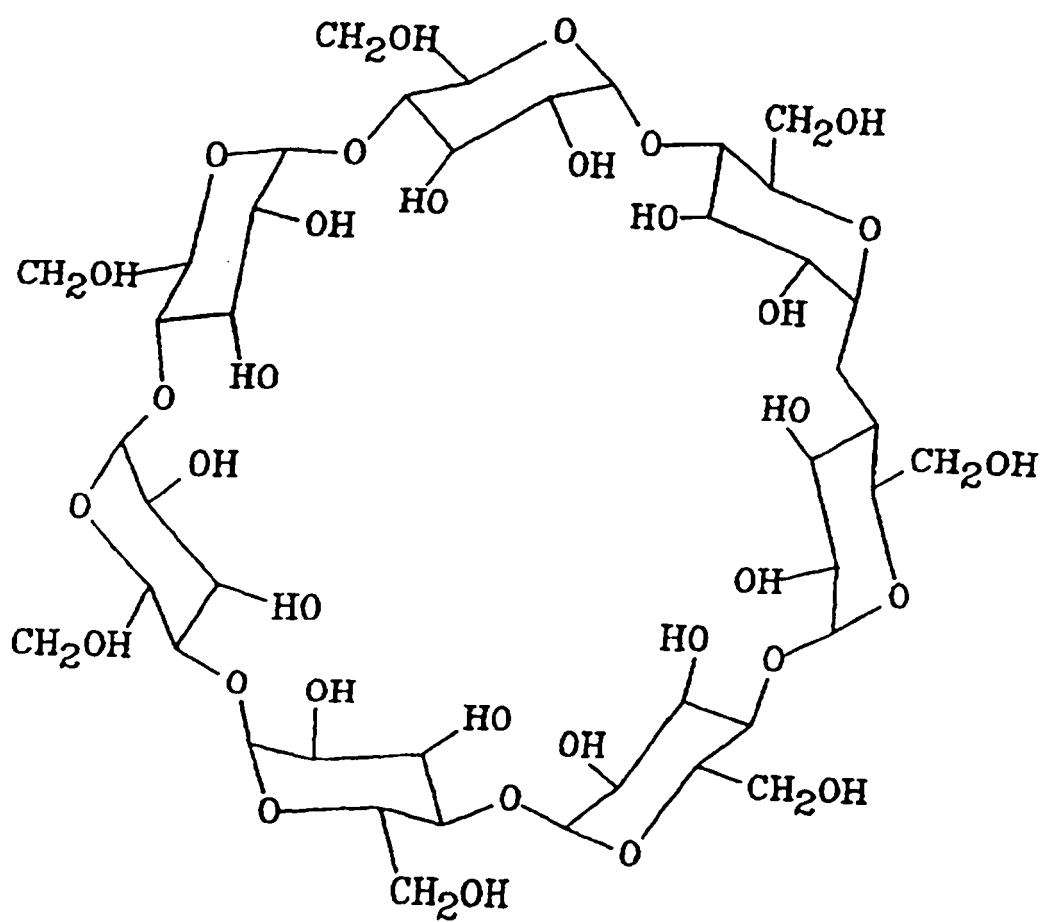


Fig. 1b



β

Fig. 1c

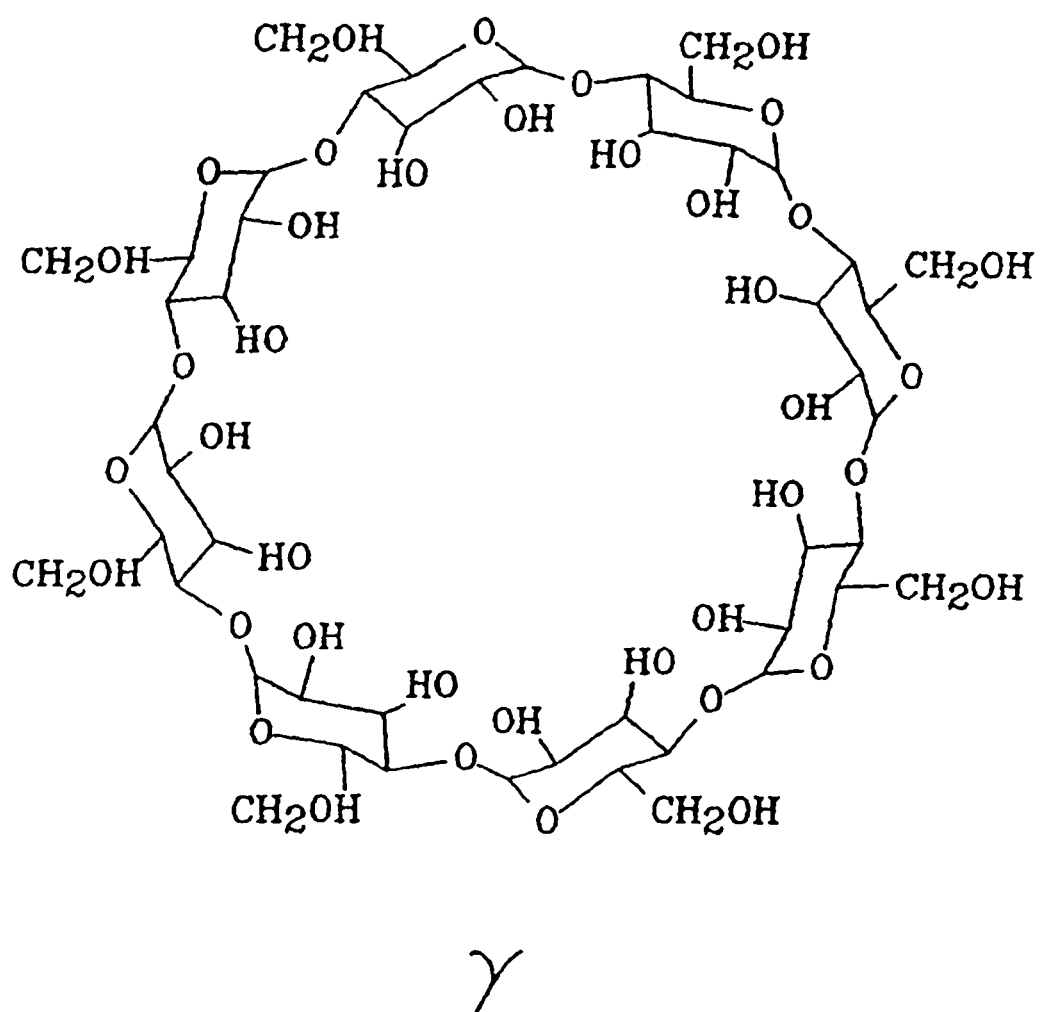


Fig. 2

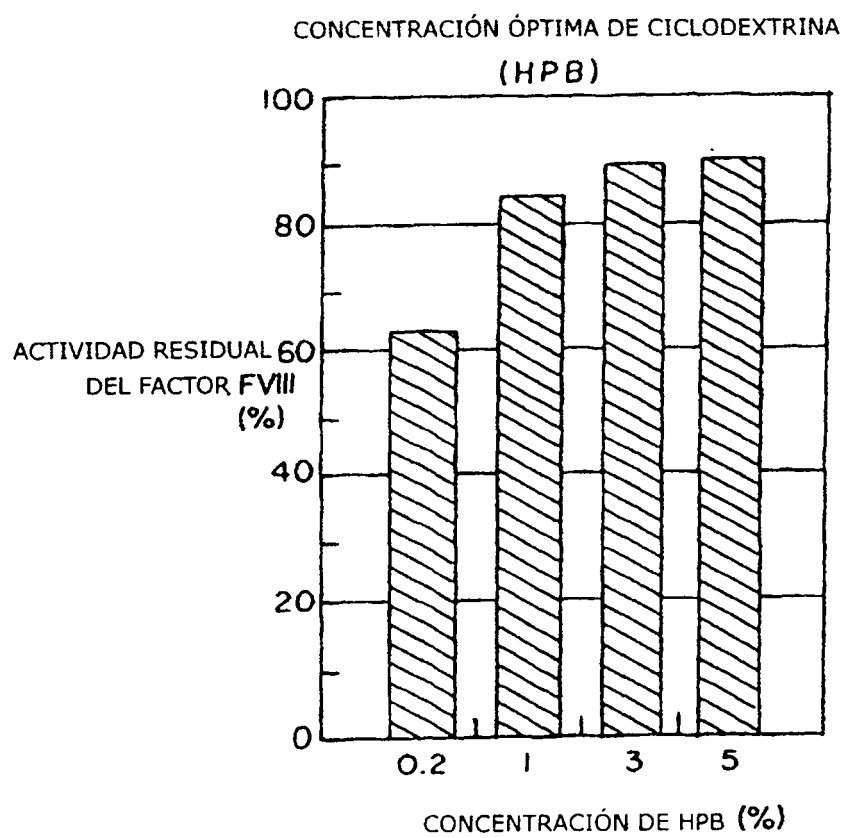


Fig. 3

CICLODEXTRINA COMO ESTABILIZANTE

