



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 342 404**

51 Int. Cl.:
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05102880 .1**
96 Fecha de presentación : **12.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1712223**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Preparación farmacéutica de factor VIII recombinante liofilizada sin albúmina como estabilizante.**

30 Prioridad: **25.06.2004 KR 10-2004-0047985**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.07.2010

73 Titular/es: **Green Cross Holdings**
227 Gugal-ri, Giheung-eup
Yongin-si, Gyeonggi-do 449-593, KR

72 Inventor/es: **Paik, Sang-Hoon;**
Shin, Yong-Nam;
Kim, Jean-Man;
Huh, Jae-Wook;
Lee, Jung-Sik;
Kwon, Ki-Sung y
Chun, Ji-Hyun

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 342 404 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 farmacéutica de factor VIII recombinante liofilizada sin albúmina como estabilizante.

5 Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a una composición liofilizada del factor VIII recombinante utilizada como preparación terapéutica de la hemofilia A y, más en concreto, a una composición liofilizada del factor VIII recombinante sin albúmina que emplea un aminoácido como estabilizante para estabilizar el factor recombinante que tiene una actividad inestable durante la liofilización, estando el aminoácido exento de riesgo de infección vírica.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 La hemofilia es uno de los trastornos de coagulación heredados y se sabe que está provocado por una escasez de factores de coagulación biológicamente activos, que normalmente están presentes en el plasma sanguíneo de la sangre humana.

20 Puesto que la hemofilia es una enfermedad de sangrado recesiva heredada ligada al sexo, las mujeres rara vez resultan afectadas incluso si las mujeres portan los genes de la hemofilia, que afecta principalmente a la población masculina. La hemofilia se clasifica como hemofilia A, hemofilia B, hemofilia AB y hemofilia C según el tipo de factor de coagulación sanguíneo deficiente.

25 La hemofilia A afecta a 1-2 individuos por cada 20.000 hombres debido a la deficiencia o a la ausencia del factor VIII coagulante sanguíneo *in vivo* humano (factor antihemofílico). La hemofilia B aparece en aproximadamente 1 de cada 100.000 hombres debido a una deficiencia en el factor IX de coagulación sanguínea humano (factor de Christmas). La hemofilia AB refleja una deficiencia en los factores VIII y IX coagulantes sanguíneos recombinantes humanos, y la hemofilia C refleja una deficiencia en el factor XI coagulante recombinante humano.

30 Se han producido agentes terapéuticos para el tratamiento de la hemofilia A durante las últimas tres décadas aislando el factor VIII del plasma sanguíneo humano, purificándolo y concentrándolo. Estos agentes terapéuticos han permitido que muchos hemofílicos tengan una vida normal.

35 Sin embargo, el factor VIII coagulante derivado de sangre humana, que se aísla a partir de plasma sanguíneo humano para ser utilizado como agente terapéutico convencional para el tratamiento de la hemofilia, presenta ciertas desventajas, incluyendo la susceptibilidad a la infección con virus portados por la sangre, como el virus de la hepatitis, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus TT. Para solucionar estos problemas, como se indicó en J. Gitschier *et al.*, Nature, 312, 330-337, 1984, y en el documento EP 160457, la preparación del factor VIII coagulante humano recombinante en general implica aislarlo de productos de cultivo de células animales recombinantes utilizando la tecnología del ADN recombinante, y purificar los factores coagulantes aislados.

45 La estructura y el esquema de reacción bioquímica de los productos del factor VIII recombinante se describe en Kaufman, Tibtech, vol. 9, 1991, y en Hematology, 63, 155-165, 1991.

50 Los concentrados del factor VIII humano aislados a partir de plasma sanguíneo humano contienen varias formas del factor VIII fragmentadas de actividad estable (véase Andersson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83, 2979-2983, mayo de 1986). La forma activa más pequeña del factor VIII tiene un peso molecular de aproximadamente 170 kDa y está compuesta por dos cadenas de fragmentos de 90 kDa y 80 kDa unidas entre sí mediante un enlace iónico metálico (véase el documento EP 197901). Kabi Pharmacia ha desarrollado productos del factor VIII recombinantes de 170 kDa con un dominio B delecionado a partir del factor VIII de coagulación derivado de sangre humana. El factor recombinante cortado se denomina r-VIII SQ y es producido por la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) a partir de medio exento de suero mediante el cultivo de células animales. La estructura y el esquema de reacción bioquímica de r-VIII SQ se describe en el documento WO 91/09122.

55 Las proteínas del factor recombinante se producen en una forma liofilizada para ser distribuidas en el mercado para una mejor conservación, almacenaje y manipulación. Para ser administradas a un paciente, las proteínas liofilizadas se reconstituyen en un disolvente apropiado. Sin embargo, durante la liofilización las proteínas del factor recombinante pueden experimentar una considerable reducción en su actividad mientras se están sometiendo a la purificación, la esterilización, la liofilización, el envasado y la reconstitución para su inyección. Además, el aspecto de la torta seca es malo y no se desea. Por tanto, se realizó un intento convencional para lograr la estabilización del factor recombinante utilizando albúmina derivada de sangre humana como estabilizante en la liofilización. La albúmina derivada de sangre humana actúa como estabilizante general en la purificación y en la esterilización, así como en la liofilización (véase Wang *et al.*, J. of Parenteral Sci. and Tech., vol. 42, n° 2S, suplemento, 1988). Además, la albúmina derivada de sangre humana es un buen agente formador de torta en formulaciones para la liofilización. El uso de albúmina para estabilizar el factor VIII recombinante es muy conocido en la técnica, y la albúmina también se emplea en algunos productos de factor VIII recombinante muy purificado que están disponibles en el mercado en la actualidad. Sin embargo, puesto que la albúmina derivada de sangre humana se aísla a partir de plasma de sangre humana resulta vulnerable a las

ES 2 342 404 T3

infecciones por virus derivados de sangre, como el virus de la hepatitis, VIH o TT. Por tanto, la albúmina derivada de sangre humana no puede utilizarse de modo adecuado para agentes terapéuticos de la hemofilia producidos mediante la tecnología del ADN recombinante. Además, cuando se realiza un ensayo fisicoquímico en los productos finales, un exceso de albúmina con relación a una baja concentración de los principales componentes farmacéuticamente eficaces puede provocar interferencia, haciendo que sea difícil un control de la calidad preciso.

Por tanto, sería deseable proporcionar una preparación farmacéutica de factor recombinante sin albúmina, que sea estable en una disolución durante la liofilización o como la disolución resultante después de la liofilización y la reconstitución.

Para estabilizar los factores recombinantes se han propuesto varias estrategias. Por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.763.401 (documento EP 818204, Bayer) describe un procedimiento para estabilizar el factor recombinante utilizando de 15 a 60 mM de sacarosa como estabilizante.

La patente de EEUU nº 5.733.873 (documento EP 627924, Pharmacia & Upjohn) describe un procedimiento de estabilización de un factor recombinante utilizando de 0,01 a 1 mg/ml de un tensioactivo no iónico (polisorbato 20 ó 80) como estabilizante.

La patente de EEUU nº 4.877.608 (documento EP 315968, Rhone-Poulenc Rorer) describe un procedimiento de estabilización de un factor recombinante que emplea bajas concentraciones de iones, es decir, de 0,5 a 15 mM de NaCl, KCl, y de 0,01 a 10 mM de hidrócloruro de lisina, al cual también pueden añadirse azúcares, como maltosa, sacarosa o manitol.

La patente de EEUU nº 5.605.884 (documento EP 314095, Rhone-Poulenc Rorer) describe un procedimiento de estabilización de un factor recombinante que utiliza altas concentraciones de iones, es decir, NaCl de 0,35 a 1,2 M, y KCl de 1,5 a 40 mM, al cual también pueden añadirse sacáridos, como maltosa, sacarosa o manitol.

La solicitud de patente internacional WO 96/22107 (Quadrant Holings Cambrige Limited) describe el uso de trehalosa como estabilizante.

La solicitud de patente internacional WO 89/09614 (Genentech) describe una formulación que tiene una hormona del crecimiento humana estabilizada que incluye glicina, manitol y un tampón. En una realización preferida de la formulación se añade a ésta un tensioactivo no iónico, como polisorbato 80. El tensioactivo no iónico se añade para reducir la agregación y la desnaturalización. La formulación preparada muestra una mayor estabilidad durante la liofilización y después de su reconstitución.

El documento EP 268110 (Cetus) describe una disolución que comprende una proteína concreta disuelta en un medio vehículo inactivo que porta un aclarante de polímero no iónico como disolvente/estabilizante, por ejemplo la interleuquina-2. Los ejemplos preferidos del aclarante incluyen un compuesto de octolfenoxipolietoxietanol, un compuesto de monoestearato de polietilenglicol y un éster de ácido graso de polietilensorbitán.

La patente de EEUU nº 4.783.441 (Hoechst) describe una disolución acuosa que contiene proteínas, por ejemplo insulina, y un tensioactivo pulmonar.

La patente de EEUU nº 165.370 (Coval) describe una disolución de gamma-globulina y un procedimiento para su preparación. La disolución descrita contiene polietilenglicol (PEG). La disolución también puede contener un tensioactivo no iónico.

El documento EP 77870 (Japan Green Cross) describe la adición de aminoácidos, monosacáridos, oligosacáridos, alcoholes de azúcares o ácidos carboxílicos de hidrocarburos a una disolución que contiene un factor recombinante para mejorar la estabilidad de la disolución. El documento EP 117064 describe la adición de alcoholes de azúcares o disacáridos a una disolución acuosa de un factor recombinante para aumentar la estabilidad durante la reasociación.

La solicitud de patente internacional WO 91/10439 (Octopharma) describe una disolución inyectable estable del factor VIII o del factor IX que contiene un disacárido, preferiblemente sacarosa, y uno o más tipos de aminoácidos.

El documento WO 99/10011 describe la adición de sacarosa, trehalosa, lisina y sintamina 17 para estabilizar una preparación del factor VIII.

60 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona una nueva preparación farmacéutica del factor VIII recombinante liofilizada sin albúmina, que muestra sustancialmente la misma eficacia farmacéutica que un producto que contiene albúmina, al mismo tiempo que es capaz de prevenir una infección vírica provocada por el uso de albúmina derivada de sangre humana como estabilizante del factor recombinante convencional.

La preparación farmacéutica del factor VIII recombinante liofilizada sin albúmina según la presente invención puede conseguirse utilizando una mezcla de arginina, isoleucina y ácido glutámico como estabilizante.

La preparación farmacéutica del factor VIII recombinante sin albúmina según la presente invención es sustancialmente la misma que la preparación farmacéutica convencional del factor VIII recombinante con albúmina con respecto al aspecto de la torta, a la actividad tras la reconstitución y a la transparencia tras la reconstitución.

5 Breve descripción de los dibujos

La Fig.1 muestra un proceso de liofilización de una preparación farmacéutica del factor VIII recombinante según la presente invención.

10 La Fig.2 es una fotografía que muestra el resultado de la comparación de una preparación farmacéutica del factor VIII recombinante sin albúmina según la presente invención con una preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con albúmina y una preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con un tensioactivo no iónico.

15 La Fig.3 es una representación gráfica para comparar la actividad de una preparación farmacéutica del factor VIII recombinante sin albúmina según la presente invención con los niveles de actividad de una preparación farmacéutica de factor VIII recombinante con albúmina y de una preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con un tensioactivo no iónico.

20 La Fig.4 es una representación gráfica para comparar el aspecto de la torta de una preparación farmacéutica del factor VIII recombinante sin albúmina según la presente invención con el aspecto de la torta de una preparación farmacéutica de factor VIII recombinante con albúmina y de una preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con un tensioactivo no iónico.

25 La Fig. 5 es una representación gráfica para comparar la transparencia de una preparación farmacéutica del factor VIII recombinante sin albúmina según la presente invención con la transparencia de una preparación farmacéutica de factor VIII recombinante con albúmina y de una preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con un tensioactivo no iónico.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención proporciona la preparación farmacéutica de la reivindicación 1 del factor VIII recombinante liofilizada sin albúmina al mismo tiempo que muestra una alta estabilidad.

35 Para descubrir nuevos estabilizantes para la liofilización como sustitutos de la albúmina que porta la sangre humana existente, los presentes inventores realizaron experimentos de liofilización añadiendo una mezcla de aminoácidos concretos en una proporción de mezclado predeterminada al factor VIII recombinante, y descubrieron que el factor VIII recombinante resultante tenía una alta actividad, un buen aspecto de la torta y transparencia incluso después de liofilizarse.

La presente invención se describirá a continuación con detalle.

40 La expresión “concentrado de factor VIII recombinante” empleada en la presente invención se refiere a una disolución preparada purificando una disolución de nutrientes que contiene el factor VIII recombinante obtenido cultivando células animales producidas mediante la tecnología del ADN recombinante, realizándose la purificación mediante cromatografía de afinidad y cromatografía iónica.

45 Además, la expresión “concentrado final de factor VIII recombinante” se refiere a una disolución no liofilizada obtenida diluyendo un concentrado de factor VIII recombinante con un tampón básico y un estabilizante que se añaden a éste.

50 La preparación farmacéutica de la reivindicación 1 del factor VIII recombinante liofilizado sin albúmina según la presente invención comprende arginina (L-arginina), isoleucina (L-isoleucina) y ácido glutámico (ácido L-glutámico) como estabilizantes para estabilizar el factor VIII recombinante para su uso en el tratamiento de la hemofilia.

55 La arginina tiene preferiblemente una concentración de 6 a 100 mM, más preferiblemente de 6 a 42 mM, antes de la liofilización.

La isoleucina tiene preferiblemente una concentración de 3,5 a 50 mM, más preferiblemente de 7 a 35 mM, antes de la liofilización.

60 El ácido glutámico tiene preferiblemente una concentración de 10 a 100 mM, más preferiblemente de 10 a 70 mM, antes de la liofilización.

Los ejemplos de tampón básico del concentrado final del factor VIII recombinante de la presente invención incluyen una cantidad apropiada de histidina, y una mezcla de NaCl y CaCl₂.

65 En la técnica se sabe que la histidina, NaCl y CaCl₂ se emplean habitualmente como tampón de proteínas humanas.

La presente invención se explicará con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, éstos se proporcionan sólo como ilustración de la presente invención, y la presente invención no se limita a éstos.

ES 2 342 404 T3

Ejemplo 1

Para descubrir un material que estabilice el factor VIII recombinante en lugar de la albúmina derivada de sangre humana, se prepararon composiciones de concentrado final para la liofilización del factor VIII recombinante utilizando lecitina (fosfatidilcolina), sacarosa, glicina, polivinilpirrolidona (PVP), y aminoácidos que incluyen arginina, isoleucina y ácido glutámico como estabilizantes, respectivamente, y después se liofilizaron. Para evaluar la eficacia de las composiciones de factor VIII recombinante liofilizadas se midieron los niveles de actuación de las respectivas composiciones con respecto a la actividad, el aspecto de la torta y la transparencia.

Los materiales y los dispositivos de ensayo empleados son los siguientes:

- L-arginina-HCl (PM 210,7, Sigma)
- L-isoleucina (PM 131,2, Sigma)
- ácido L-glutámico (PM 169,1, Sigma)
- L-histidina monohidrato (PM 209,63, Fluka)
- sacarosa (PM 342,3, Sigma)
- Tween 80 (Sigma)
- PEG 3350 (PM 3350, Carbowax)
- albúmina de suero humana (al 20%, KGC)
- glicina (PM 75,07, Sigma)
- PVP (K30) (PM 40000, Fluka)
- fosfatidilcolina (lecitina, Doosan)
- kit de ensayo cromogénico de FVIII (Coamatic kit, Chromogenix)
- incubador de 96 pocillos (Sanofi-BMS)
- lector de ELISA (Magellan)
- coagulómetro
- plasma deficiente en FVIII (DADE BEHRING)
- actina (DADE BEHRING)
- CaCl₂ (DADE BEHRING)
- tampón CA (barbital sodio, DADE BEHRING)
- liofilizante VIRTIS-GENESIS 25XL
- medidor de la turbidez 2400 (HACH)

Purificación del factor recombinante

Una disolución de nutrientes que contiene el factor VIII recombinante obtenido mediante un cultivo de células animales preparadas utilizando la tecnología del ADN recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad y cromatografía iónica primaria y secundaria para producir un producto purificado, que se denomina concentrado de factor VIII recombinante.

Producción de una preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con estabilizantes que comprende diversos ingredientes

Se preparó un tampón básico y un estabilizante para cada composición que aparece en la tabla 1 y se mezcló con ellos un concentrado de factor VIII recombinante purificado para ser diluido, produciendo de 50 a 125 IU/ml de un concentrado final de factor VIII recombinante. Se distribuyeron 4 ml del concentrado final en cada vial de 10 ml de forma que cada vial contiene una composición de 200 a 500 IU del concentrado final, para ser después liofilizado.

ES 2 342 404 T3

TABLA 1

	Composición	Tampón básico	Estabilizante
5	Experimento 1 (preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con albúmina)	Histidina 50 mM NaCl 150 mM CaCl ₂ 4 mM	Albúmina al 1% (HSA) PEG 3350 0,3 mM (al 0,1%)
10	Experimento 2 (preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con tensioactivo no iónico)	Histidina 8,9 mM NaCl 192,5 mM CaCl ₂ 2,82 mM	Sacarosa 115,4 mM Tween 80 0,125 mg/ml
15	Experimento 3	Histidina 50 mM NaCl 150 mM CaCl ₂ 4 mM	PEG 3350 0,3 mM (al 0,1%)
20	Experimento 4	“	Sacarosa 100 mM (ensayo 100-400 mM)
25	Experimento 5	“	Sacarosa 100 mM PEG 3350 0,3 mM (al 1%)
30	Experimento 6	“	Glicina 400 mM (ensayo 50-400 mM)
35	Experimento 7	“	Glicina 400 mM Sacarosa 100 mM
40	Experimento 8	“	Lecitina (1-6) (ensayo 0,004-0,16 mg) Sacarosa 100 mM
45	Experimento 9	“	PVP al 0,5% (ensayo al 0,1-1,4%)
50	Experimento 10	“	PVP al 0,5% Sacarosa 100 mM
55	Experimento 11	“	OPVP al 0,5% Glicina 50-400 mM
60	Experimento 12	“	PVP al 0,5% Sacarosa 100 mM Glicina 50 mM
65	Experimento 13	“	PVP al 0,5% Lecitina (1-6)
	Experimento 14	“	PVP al 0,5% Lecitina (1-6) Sacarosa 100 mM
	Experimento 15	“	L-arginina 6-42 mM Isoleucina 7-35 mM Ácido glutámico 10-70 mM
	Experimento 16	“	L-arginina 35 mM Isoleucina 7 mM Ácido glutámico 57 mM

ES 2 342 404 T3

Liofilización

La composición para el concentrado final preparado mezclando el concentrado de factor VIII recombinante purificado con cada tampón básico y estabilizante, e introducida en cada vial, se trasladó a un liofilizador (VIRTIS-GENESIS 25XL), seguido de una congelación por chorro de aire hasta -45°C , como se muestran en Fig. 1, y después se mantuvo en este estado de congelación por chorro de aire durante 6 horas, para después ser puesta al vacío y mantenida de esa forma durante 6 horas. Después, la temperatura aumentó lentamente hasta -20°C a una velocidad de $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a lo largo de 2 horas (reasociado primario), y después se mantuvo en un estado en equilibrio a -20°C durante 80 horas. Después, la temperatura aumentó lentamente hasta 25°C a una velocidad de $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a lo largo de 7 horas (reasociado secundario) y después se mantuvo a esta temperatura durante 3 horas. Después, la temperatura volvió a aumentar hasta 33°C a una velocidad de $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durante 7 horas y después se mantuvo a esta temperatura durante 20 horas, consiguiendo con ello la liofilización.

Después de la liofilización, los productos respectivos se conservaron en cámaras de enfriamiento de 2°C a 8°C hasta que se emplearon. Cuando resultó necesario se midió simultáneamente la actividad, el aspecto de la torta y la transparencia de cada producto.

Evaluación de la actuación experimental

El aspecto de la torta, la transparencia tras la reconstitución y la actividad tras la reconstitución de cada preparación farmacéutica del factor VIII recombinante se midió y los resultados se listan en la tabla 2.

El aspecto de la torta se observó de manera visual, la transparencia se midió en unidades de turbidez nefelométricas (NTU) utilizando un medidor de turbidez HACH 2400 fabricado por Hack Company, EEUU, y la actividad se evaluó mediante un ensayo cromogénico y un ensayo de coagulación (APTT). Las medidas reales de los respectivos parámetros de medición se compararon con los correspondientes datos de una composición control con albúmina derivada de sangre humana como estabilizante. Es decir, el aspecto de la torta, la transparencia y la actividad de la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con albúmina (experimento 1) se consideraron como 100%, respectivamente. La actividad inicial antes de la liofilización era de 107 IU/ml.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 342 404 T3

TABLA 2

Composición	Estabilizante	Aspecto de la torta	Transparencia		Actividad	
			Medida real (NTU)	Valor relativo (%)	Medida real (IU/ml)	Valor relativo (%)
Experimento 1 (preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con albúmina)	Albúmina (HSA) al 1% PEG 3350 0,3 mM (al 0,1%)	100%	3,0	100%	102	100%
Experimento 2 (preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con tensioactivo no iónico)	Sacarosa 115,4mM Tween 80 0,125 mg/ml	80%	3,0	100%	86	84,3%
Experimento 3	PEG 3350 0,3 mM (al 0,1%)	30%	3,6	89%	77	75,5%
Experimento 4	Sacarosa 100 mM (100-400 mM de ensayo)	80%	3,0	100%	81	79,4%
Experimento 5	Sacarosa 100 mM PEG 3350 0,3 mM (al 1%)	30%	3,0	100%	82	80,4%
Experimento 6	Glicina 400 mM (50-400 mM de ensayo)	50%	3,0	100%	89	87,3%
Experimento 7	Glicina 400 mM Sacarosa 100 mM	40%	3,0	100%	90	88,2%
Experimento 8	Lecitina (1-6) (0,004-0,16 mg de ensayo) Sacarosa 100 mM	80%	3,6	80%	90	88,2%
Experimento 9	PVP al 0,5% (al 0,1-1,4% de ensayo)	100%	3,0	100%	76	74,5%

65

ES 2 342 404 T3

5	Experimento 10	PVP al 0,5% Sacarosa 100 mM	50%	3,0	100%	67	65,7%
10	Experimento 11	PVP al 0,5% Glicina 50-400 mM	40%	3,0	100%	90	88,2%
15	Experimento 12	PVP al 0,5% Sacarosa 100 mM Glicina 50 mM	40%	3,0	100%	75	73,5%
20	Experimento 13	PVP al 0,5% Lecitina (1-6)	100%	3,6	80%	91	89,2%
25	Experimento 14	PVP al 0,5% Lecitina (1-6) Sacarosa 100 mM	40%	3,3	90%	86	84,3%
30	Experimento 15	L-arginina 6- 100 mM Isoleucina 3,5- 50 mM Ácido glutámico 10- 100 mM	100%	3,0	100%	87-92%	85,3-90,2%
40	Experimento 16	L-arginina 35 mM Isoleucina 7 mM Ácido glutámico 57 mM	100%	3,0	100%	92	90,2%
45							
50							

55 Tal como se muestra en la tabla 2, considerando que el aspecto de la torta, la transparencia y la actividad de la
preparación farmacéutica del factor VIII recombinante liofilizada con albúmina derivada de sangre humana como es-
tabilizante constituye 100%, la composición del factor VIII recombinante con un tensioactivo no iónico (experimento
2) era relativamente mala con respecto al aspecto de la torta y a la actividad, aunque mostraba una buena transparencia.
60 Por otra parte, cuando se emplea arginina (L-arginina), isoleucina (L-isoleucina) o ácido glutámico (ácido L-glutámi-
co) como estabilizante en la presente invención, las composiciones fueron satisfactorias con respecto al aspecto de la
torta, la transparencia y la actividad (experimentos 15 y 16).

Como resulta evidente a partir de los resultados, el uso de lecitina como estabilizante produjo una alta actividad
pero una mala transparencia tras la reconstitución. Además, la sacarosa y la glicina utilizadas como estabilizantes
65 lograron una actividad relativamene alta pero un aspecto de la torta malo. Además, la polivinilpirrolidona (PVP) como
estabilizante mostró una actuación relativamente buena en el aspecto de la torta pero produjo una mala actividad.

La Fig.2 es una fotografía que muestra el resultado de la comparación de la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante sin albúmina según la presente invención (experimento 16) con la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con albúmina (experimento 1) y con la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con un tensioactivo no iónico (experimento 2).

5

La Fig. 3 es una representación gráfica que compara la actividad de la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante sin albúmina según la presente invención con los niveles de actividad de la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con albúmina (experimento 1) y con la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con un tensioactivo no iónico (experimento 2). Teniendo en cuenta que la actividad media de la composición de factor VIII recombinante con albúmina se consideró como 100%, la actividad media de la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con un tensioactivo no iónico (experimento 2) es de $80 \pm 5\%$, y de la composición del factor VIII recombinante sin albúmina según la presente invención es de $90 \pm 5\%$, es decir, el nivel medio de actividad de la composición según la presente invención es relativamente alto.

10

15

La Fig. 4 es una representación gráfica que compara el aspecto de la torta de la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante sin albúmina según la presente invención con el aspecto de la torta de la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con albúmina y con la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con un tensioactivo no iónico. Con más detalle, teniendo en cuenta que el aspecto de la torta medio de la composición de factor VIII recombinante con albúmina se consideró como 100%, mientras que el aspecto de la torta medio de la composición del factor VIII recombinante con un tensioactivo no iónico es 80%, el aspecto de la torta medio de la composición del factor VIII recombinante sin albúmina según la presente invención fue muy bueno, es decir, sustancialmente 100%.

20

25

La Fig. 5 es una representación gráfica que compara la transparencia de la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante sin albúmina según la presente invención con los niveles de transparencia de la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con albúmina y con la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con un tensioactivo no iónico. Con más detalle, teniendo en cuenta que la transparencia media de la composición de factor VIII recombinante con albúmina se consideró como 100%, la transparencia media de la composición del factor VIII recombinante con un tensioactivo no iónico y de la composición del factor VIII recombinante sin albúmina según la presente invención fue sustancialmente 100%, es decir, no existía diferencia en la transparencia entre ambas preparaciones farmacéuticas.

30

Ejemplo 2

Como se muestra en el ejemplo 1, como óptimos estabilizantes sustitutos de la albúmina, se liofilizaron composiciones de factor VIII recombinante con aminoácidos que incluyen arginina, isoleucina y ácido glutámico, y se ensayaron las condiciones óptimas del aspecto de la torta, y los resultados se resumen en la tabla 3.

35

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

Tabla 3

Aspecto de la torta	Experimento 17	Experimento 18	Experimento 19	Experimento 20	Experimento 21	Experimento 22	Experimento 23
Arginina (mM)	6	12	18	24	30	36	42
Isoleucina (mM)	0	4	7	11	14	18	21
Ácido glutámico (mM)	10	19	29	38	48	57	67
Con relación a la composición con albúmina del experimento 1 (%)	60%	100%	100%	100%	100%	100%	60%

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 342 404 T3

Como se muestra en la tabla 3, cuando una composición comprende arginina de 12 a 36 mM, isoleucina de 4 a 18 mM, y ácido glutámico de 19 a 57 mM, muestra un aspecto de la torta óptimo con relación a la composición control con albúmina.

5

Ejemplo 3

Basándose en los resultados que aparecen en la tabla 3, las concentraciones iniciales de tres aminoácidos, es decir, arginina, isoleucina y ácido glutámico, se ajustaron a las respectivas concentraciones mínimas que permiten la formación del aspecto de torta, es decir, 12 mM, 3,5 mM y 19 mM, respectivamente. Para estudiar el cambio en la actividad que depende de la concentración de cada uno de arginina, isoleucina y ácido glutámico, se realizó una liofilización para preparar la composición del factor VIII recombinante de la misma manera que en el ejemplo 1, pero variando sólo la concentración de un aminoácido y fijando las concentraciones de los otros aminoácidos a las concentraciones iniciales, y se realizó un ensayo cromogénico y un ensayo de coagulación para evaluar la actuación de actividad de la composición. La actividad de la composición del factor VIII recombinante se indica como el percentil (%) con relación al de la composición del factor VIII recombinante con albúmina.

10

15

La tabla 4 muestra los resultados de la evaluación de los niveles de actividad medidos cuando sólo se varía la concentración de arginina en un intervalo de 6 a 100 mM, estando fijadas las concentraciones de isoleucina y de ácido glutámico a 3,5 mM y 19 mM, respectivamente, que son las concentraciones mínimas que permiten la perfecta formación de la torta liofilizada. Antes de la liofilización, la actividad era de 107 IU/ml.

20

(Tabla pasa a página siguiente)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 4

Arginina (mM)	6	12	18	24	30	36	42	48	75	90	100
Actividad (IU/ml)	77	82	83	86	88	92	88	86	81	76	72
Con relación a la composición con albúmina (experimento 1) (%)	75,5%	80,4%	8,14%	84,3%	86,2%	90%	86,2%	84,3%	79,4%	74,5%	70,6%
Las concentraciones de isoleucina y de ácido glutámico se fijaron a 3,5 mM y a 19 mM, respectivamente.											

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 342 404 T3

Como se muestra en la tabla 4, las composiciones mostraron una actividad relativamente alta a diversas concentraciones de arginina a lo largo del intervalo global de 6 a 100 mM. En particular, cuando la concentración de arginina era de 12 a 48 mM, la composición de la presente invención mostró una alta actividad mayor que 80% que la del factor VIII recombinante con albúmina. A medida que aumenta la concentración de arginina, su actividad también aumenta hasta alcanzar la actividad óptima, es decir, 90%, cuando la concentración de arginina era de 36 mM.

La tabla 5 muestra los resultados de la evaluación de los niveles de actividad medidos mientras se variaba sólo la concentración del ácido glutámico en un intervalo de 10 a 100 mM, estando fijadas las concentraciones de arginina y de isoleucina que muestran la actividad óptima en 36 mM y 3,5 mM, respectivamente. Antes de la liofilización, la actividad era de 107 IU/ml.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 5

Ácido glutámico (mM)	10	19	29	38	48	57	67	76	86	95	100
Actividad (IU/ml)	79	79	82	84	88	92	88	82	78	76	67
Con relación a la composición con albúmina (experimento 1) (%)	77,5%	77,5%	80,4%	82,4%	86,3%	90,2%	86,3%	87,1%	76,5%	74,5%	65,7%
Las concentraciones de arginina e isoleucina se fijaron a 36 mM y a 3,5 mM, respectivamente.											

ES 2 342 404 T3

Como se muestra en la tabla 5, las composiciones mostraron una actividad relativamente alta a diversas concentraciones de ácido glutámico a lo largo del intervalo global de 10 a 100 mM. En particular, cuando la concentración de ácido glutámico era de 29 a 76 mM, la composición de la presente invención mostró una actividad relativamente alta mayor que 80% de la del factor VIII recombinante con albúmina. A medida que aumenta la concentración de ácido glutámico, la actividad de la composición también aumenta hasta alcanzar la actividad óptima, es decir, 90%, cuando la concentración de ácido glutámico era de 57 mM.

La tabla 6 muestra los resultados de la evaluación de los niveles de actividad medidos mientras se variaba sólo la concentración de isoleucina en un intervalo de 0 a 50 mM, estando fijadas las concentraciones de arginina y de ácido glutámico que muestran la actividad óptima en 36 mM y 57 mM, respectivamente. Antes de la liofilización, la actividad era de 107 IU/ml.

TABLA 6

Isoleucina (mM)	0	4	7	11	14	18	21	25	50
Actividad (IU/ml)	81	82	92	86	86	82	73	67	62
Con albúmina (experimento 1)	79,4%	80,4%	90,2%	84,3%	84,3%	80,4%	71,6%	65,7%	60,8%

Las concentraciones de arginina y de ácido glutámico se fijaron a 36 mM y a 57 mM, respectivamente.

Como se muestra en la tabla 6, las composiciones mostraron una actividad relativamente alta a diversas concentraciones de isoleucina a lo largo del intervalo global de 0 a 50 mM. En particular, cuando la concentración de isoleucina era de 0 a 18 mM, la composición de la presente invención mostró una actividad relativamente alta. Cuando la concentración de isoleucina era de 7 mM, la composición mostró la actividad óptima.

Se realizaron experimentos para estudiar las condiciones óptimas requeridas para mantener la actividad para un estabilizante de aminoácido, en lugar de albúmina. Los resultados experimentales demuestran que, comparado con la composición control con albúmina, las condiciones óptimas aparecieron cuando las concentraciones de arginina, isoleucina y ácido glutámico fueron de 36 mM, 7 mM y 57 mM, respectivamente. Para evaluar la eficacia de las composiciones de factor VIII recombinante liofilizadas se midieron los niveles de actuación de las respectivas composiciones con respecto a la actividad, el aspecto de la torta y la transparencia.

Según la presente invención, la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante liofilizada con un aminoácido concreto, en lugar de la albúmina, como estabilizante, mostró sustancialmente la misma eficacia que en el caso en que se emplea la albúmina como estabilizante, como respecto a la actividad, el aspecto de la torta y la transparencia, mientras que provoca pocos efectos secundarios en seres humanos. Con respecto a la actividad y al aspecto de la torta, la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante liofilizada con un aminoácido concreto según la presente invención también es relativamente buena, y es mejor que la preparación farmacéutica del factor VIII recombinante con un tensioactivo no iónico.

ES 2 342 404 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Una preparación farmacéutica del factor VIII recombinante liofilizada con un estabilizante que comprende arginina, isoleucina y ácido glutámico, estabilizando el estabilizante el factor VIII recombinante, para su uso para tratar la hemofilia.

10 2. La preparación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que antes de la liofilización, la arginina tiene una concentración de 6 a 100 mM, la isoleucina tiene una concentración de 3,5 a 50 mM, y el ácido glutámico tiene una concentración de 10 a 100 mM.

3. La preparación farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2, en la que antes de la liofilización, la arginina tiene una concentración de 6 a 42 mM.

15 4. La preparación farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2, en la que antes de la liofilización, la isoleucina tiene una concentración de 7 a 35 mM.

20 5. La preparación farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2, en la que antes de la liofilización, el ácido glutámico tiene una concentración de 10 a 70 mM.

25 6. La preparación farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2, en la que antes de la liofilización, la arginina tiene una concentración de 6 a 42 mM, la isoleucina tiene una concentración de 7 a 35 mM, y el ácido glutámico tiene una concentración de 10 a 70 mM.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

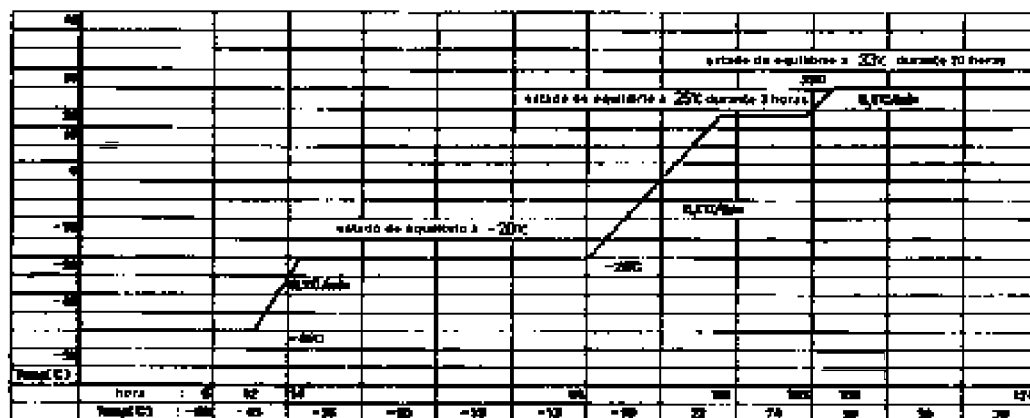


FIG. 2



Experimento 1
Factor VIII con
albúmina

Experimento 2
Factor VIII con un
tensioactivo no iónico

Experimento 16
Factor VIII sin
albúmina

FIG. 3

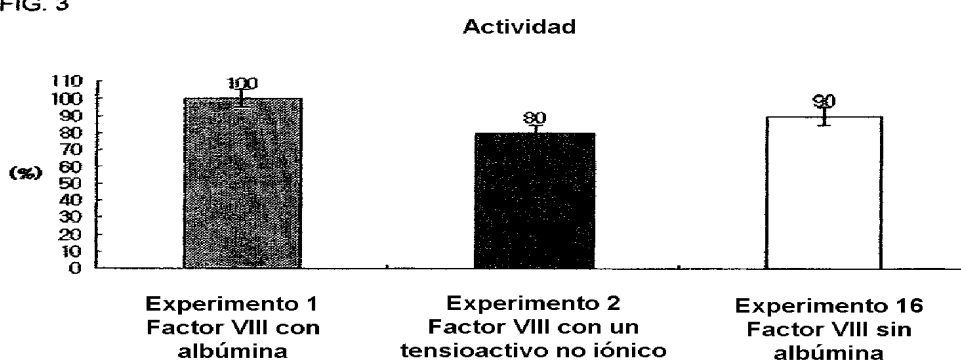


FIG. 4

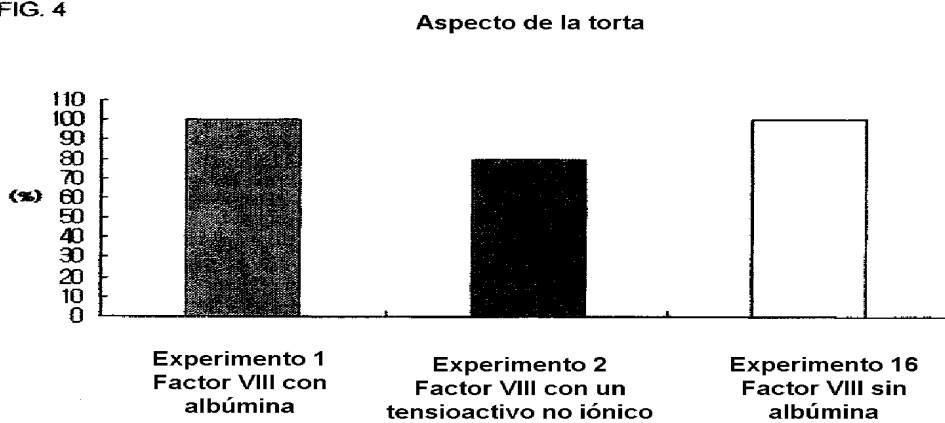


FIG. 5

