



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 522**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96922266 .0**

86 Fecha de presentación : **08.07.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **0838221**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.04.1998**

54 Título: **Preparaciones liofilizadas de HGF.**

30 Prioridad: **11.07.1995 JP 7-199018**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73 Titular/es: **Toshikazu Nakamura**
1-4, Hoshojicho, Okazaki, Sakyo-ku
Kyoto-shi, Kyoto 606-8333, JP
DAIICHI PHARMACEUTICAL Co., Ltd.

72 Inventor/es: **Tanaka, Katsumi;**
Higashio, Kanji y
Kumazawa, Eitaro

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 279 522 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

Preparaciones liofilizadas en HGF.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una preparación liofilizada de HGF obtenida mediante liofilización de una disolución que contiene HGF (factor de crecimiento de hepatocitos). Más particularmente, se refiere a la preparación liofilizada de HGF que contiene al menos uno de un estabilizante, cloruro sódico, tampón o agente tensioactivo. La invención, por lo tanto, presenta una preparación estabilizada de HGF que puede conservarse durante un largo periodo.

Estado de la técnica

El HGF es una proteína que intensifica la proliferación de hepatocitos, y se ha informado de proteínas que tienen diferentes secuencias de aminoácidos, y son conocidas con los nombres de HGF, TCF, SCF, etc. En la invención, estas proteínas conocidas que tienen actividad de crecimiento de hepatocitos se denominan colectivamente HGF.

El HGF es un péptido fisiológicamente activo que muestra diversas acciones farmacológicas, y se informa de sus acciones farmacológicas, por ejemplo, en *Experimental Medicine (Japan)*, Vol. 10, Nº 3 (número extraordinario), 330-339 (1992). Debido a sus acciones farmacológicas, se espera que el HGF se desarrolle como un agente para la cirrosis hepática, agente para una nefropatía, promotor de la proliferación de células epiteliales, agente carcinostático, inhibidor de los efectos secundarios en la terapia contra el cáncer, agente para una neumopatía, agente para una lesión gastroduodenal, agente para un trastorno cerebral y nervioso, agente para mitigar los efectos secundarios causados por inmunosupresores, promotor de la descomposición del colágeno, agente para trastornos del cartílago, agente para una enfermedad arterial, agente para la fibrosis pulmonar, agente para una hepatopatía, agente para una coagulación anormal de la sangre, agente para una hipoproteïnemia, agente para curar heridas, agente mejorador para un trastorno nervioso, promotor de hemocitoblastos, promotor del crecimiento capilar, etc. (Patente Japonesa abierta a examen público Nº 4-18028, Patente Japonesa abierta a examen público Nº 4-49246, documento de Patente EP Nº 492614, Patente Japonesa abierta a examen público Nº 6-25010, documento de Patente WO 93/8821, Patente Japonesa abierta a examen público Nº 6-172207, Patente Japonesa abierta a examen público Nº 7-89869, Patente Japonesa abierta a examen público Nº 6-40934, documento de Patente WO 94/2165, Patente Japonesa abierta a examen público Nº 6-40935, Patente Japonesa abierta a examen público Nº 6-56692, Patente Japonesa abierta a examen público Nº 7-41429, documento de Patente WO 93/3061, Patente Japonesa abierta a examen público Nº 5-213721, etc.).

Se describen preparaciones de HGF en el documento de Patente WO 90/10651 y la Patente Japonesa abierta a examen público Nº 6-247872. Esta publicación WO 90/10651 describe un HGF de tipo de eliminación (dLeHGF), en el que se eliminan cinco restos de aminoácidos del HGF, y se denomina TCF-II. Esta memoria descriptiva muestra que el HGF se estabiliza mediante albúmina, suero humano, gelatina, sorbitol, manitol, xilitol, etc. Pero, se refiere a preparaciones en disolución acuosa, y el HGF se estabiliza en una disolución acuosa. La publicación de Patente Japonesa abierta a examen público Nº 6-247872 descubre una preparación que tiene HGF contenido en alta concentración por coexistencia de aminoácidos básicos y HGF (TCF).

El documento de Patente EP-A-0456188 describe agentes terapéuticos para cirrosis hepática que contienen un factor de crecimiento de hepatocitos como ingrediente activo, un estabilizante (albúmina, manitol, sorbitol, glicina), un tampón (tampón de fosfato), cloruro sódico (NaCl o disoluciones salinas), y un agente tensioactivo (polisorbato) (Ejemplos 1-5). Se mencionan alternativas, que incluyen citrato, de la col. 9, línea 52 a la col. 10, línea 13.

El documento de Patente EP-A-0462277 describe experimentos 8-14 de composiciones que comprenden un factor de crecimiento de hepatocitos (TCF-II), un estabilizante (albúmina, sorbitol, glicina), un tampón (PBS), cloruro sódico o disolución salina, y un agente tensioactivo (Tween 80).

El documento de Patente EP-A-0722737 describe un factor de crecimiento de hepatocitos contenido en preparaciones farmacéuticas. En los Ejemplos de preparación 1-3 se mencionan composiciones liofilizadas que comprenden un HGF, un estabilizante (manitol, albúmina, sorbitol, glicina), un tampón (fosfato), cloruro sódico o disoluciones salinas, y un agente tensioactivo (polisorbato).

El documento de Patente EP-A-0308238 describe formulaciones liofilizadas estables que contienen factores de crecimiento, sin embargo, ninguno de ellos son factores de crecimiento de hepatocitos.

El documento de Patente EP-A-0588477 describe una composición medicinal que comprende TCF-II adecuado para el tratamiento de hepatopatías. El Ejemplo 3 describe composiciones liofilizadas que comprenden TCF-II, un estabilizante (albúmina, sorbitol o glicina), un tampón (PBS), cloruro sódico o disoluciones salinas, y un agente tensioactivo (Tween 80).

El documento de Patente JP-A-6040938 describe composiciones liofilizadas de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que comprenden un estabilizante (heparina, manitol, albúmina), un tampón (tampón de fosfato), cloruro sódico o disoluciones salinas, y un agente tensioactivo (polisorbato).

El documento de Patente JP-A-6172207 describe un factor de crecimiento de hepatocitos contenido en preparaciones farmacéuticas que incluyen composiciones liofilizadas que comprenden un HGF, un estabilizante (manitol, albúmina, sorbitol, glicina), un tampón (fosfato), cloruro sódico o disoluciones salinas, y un agente tensioactivo (polisorbato).

5

El documento de Patente EP-A-0612530 describe preparaciones farmacéuticas en forma liofilizada que comprenden TCF-II, tampón de fosfato, Arg y Tween 80.

El documento de Patente EP-A-0517182 describe un agente de crecimiento de hepatocitos que comprende un polisacárido o uno de sus derivados, heparina, sulfato de heparano, sulfato de condroitina, y sulfato de dextrano.

10

Generalmente, la proteína no es tan estable en una actividad de congelación (*Protein, Nucleic Acid, Enzyme (Japan)*, **37(9)**, 1517, 1992). El estabilizante de la proteína en disolución acuosa tiene la finalidad de estabilizar por acción mutua de la molécula de agua y la proteína. Por lo tanto, en una preparación liofilizada de proteína en ausencia de agua, el estabilizante de la proteína para una disolución acuosa no muestra un efecto estabilizante en la mayoría de los casos (*Protein, Nucleic Acid, Enzyme (Japan)*, **37(9)**, 1517, 1992).

15

Por otra parte, no se ha conocido nada acerca de una preparación liofilizada de HGF, y no podría esperarse hasta que punto la preparación liofilizada de HGF mostraría estabilidad física y biológica.

20

La propia preparación de disolución acuosa de HGF, cuando se conserva a baja temperatura o temperatura ambiente durante varios días, cambia de propiedades, mostrando agregación, turbidez y gelificación, y forma variantes y polímeros, y tiene una baja estabilidad física y disminuye su actividad biológica, y por lo tanto tiene una baja estabilidad de actividad biológica, y no es una preparación estable adecuada para una conservación a largo plazo. Ha habido un punto fatal para el desarrollo de HGF como medicinas o fármacos para animales en forma de preparación para inyección. La invención soluciona los problemas citados anteriormente. Esto es, es un objeto de la invención presentar una preparación estable que pueda conservarse durante un largo periodo, como medicina para tratamiento médico o fármacos para animales.

25

30 Descripción de la invención

La invención se refiere a

(1) una preparación liofilizada, que comprende factor de crecimiento de hepatocitos como ingrediente biológicamente activo, sulfato de dextrano como agente estabilizante, un tampón de citrato, y un agente tensioactivo que es polisorbato;

35

(2) la preparación liofilizada conforme a (1), en la que la preparación comprende además cloruro sódico;

(3) el uso de sulfato de dextrano como agente estabilizante para fabricar una preparación liofilizada de factor de crecimiento de hepatocitos que contiene factor de crecimiento de hepatocitos, un tampón de citrato y un agente tensioactivo que es polisorbato; y

40

(4) el uso de sulfato de dextrano conforme a (3), en el que la preparación comprende además cloruro sódico.

45

En la preparación liofilizada de HGF de la invención, el HGF se estabiliza, y puede conservarse durante un largo periodo.

El mejor modo para llevar a cabo la invención

50

Como HGF usado en la presente invención, puede usarse uno preparado mediante diversos métodos, si se purifica hasta un grado que pueda usarse como medicina.

Se conocen diversos métodos para preparar HGF. Por ejemplo, el HGF puede obtenerse mediante extracción y purificación de órganos (por ejemplo, hígado, bazo, pulmón, médula ósea, cerebro, riñón, placenta, etc.), glóbulos sanguíneos (por ejemplo, trombocitos, leucocitos, etc.), suero y plasma de mamíferos tales como ratas, vacas, caballos, ovejas, y similares (véase *FEBS Letters*, **224**, 312, 1987; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5844, 1989, etc.).

55

También, es posible obtener HGF mediante cultivo de células de cultivo o líneas celulares primarias que producen HGF, seguido por separación y purificación del producto del cultivo (por ejemplo, sobrenadante del cultivo, célula cultivada, etc.). Además, el HGF puede obtenerse por un método de ingeniería genética, que comprende clonar el gen que codifica el HGF con un vector apropiado, insertarlo en una célula anfitriona apropiada para obtener un transformado, y separar el HGF recombinado deseado a partir del sobrenadante del cultivo del transformado (por ejemplo, *Nature*, **342**, 440, 1989, Patente Japonesa abierta a examen público N° 5-111383, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 967, 1989). La célula anfitriona no está limitada específicamente, y pueden usarse diversas células anfitrionas usadas convencionalmente en métodos de ingeniería genética, que son, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, levadura, hongos filamentosos, y células de plantas o animales.

60

65

ES 2 279 522 T3

Más específicamente, el método de extraer y purificar HGF a partir de tejidos vivos es, por ejemplo, administrar tetracloruro de carbono a una rata por vía intraperitoneal, retirar el hígado de la rata con hepatitis, molerlo, y purificar mediante una técnica ordinaria de purificación de proteínas, tal como cromatografía de columna en gel, usando S-Sepharose y Heparin Sepharose, HPLC, y similares.

5 Además, mediante el método de ingeniería genética, el gen que codifica la secuencia de aminoácidos del HGF humano es clonado en un vector tal como ADN del virus del papiloma bovino y similares, para obtener un vector de expresión, y usando este vector de expresión, se transforman células de animales tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de ratón C127, células COS de mono, y similares, y puede obtenerse HGF a partir del sobrenadante del cultivo de los transformados.

10 En el HGF obtenido de este modo, una parte de la secuencia de aminoácidos del HGF puede eliminarse o sustituirse por otro(s) aminoácido(s), puede insertarse otra secuencia de aminoácidos, pueden unirse uno o más aminoácidos al extremo N y/o extremo C, o pueden eliminarse o sustituirse asimismo cadena(s) de sacáridos, con tal de que tengan sustancialmente el mismo efecto que el HGF.

La "preparación liofilizada de HGF" hace referencia a una preparación preparada liofilizando una disolución acuosa que contiene HGF mediante el uso de un método ordinario de liofilización.

20 El "estabilizante" es sulfato de dextrano. La preparación liofilizada de HGF preparada añadiendo el estabilizante es una preparación con un aumento adicional de la estabilidad de conservación del HGF.

El "tampón" es un tampón de citrato. El tampón actúa para ajustar el pH de la disolución acuosa después de la redisolución, y para mantener la solubilidad del HGF. Esto es, por ejemplo, en el caso del HGF recombinado usado en los ejemplos, la solubilidad del HGF varía con el pH, y la solubilidad es aproximadamente de 0,1 a 5,0 mg/ml alrededor de pH 7, pero la solubilidad está por encima de 20 mg/ml alrededor de pH 5, y por lo tanto se prefiere mantener el pH alrededor de 5,0 a 6,0. El tampón es un tampón de citrato, y se usa más preferiblemente citrato sódico. Este tampón de citrato contribuye también a la estabilización de HGF en una disolución acuosa después de la redisolución. Un intervalo preferido de adición del tampón es, por ejemplo, de 1 a 100 mM a la cantidad de agua después de la redisolución.

El "agente tensioactivo" incluye, por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80, y pueden utilizarse dos o más tipos de los mismos simultáneamente. Un agente tensioactivo particularmente preferido es el polisorbato 80. Es conocido que el HGF es probable que sea adsorbido en un material del recipiente tal como vidrio y resina. Por lo tanto, añadiendo un agente tensioactivo, se impide la adsorción de HGF en el recipiente después de la redisolución. Un intervalo preferido de cantidad de adición de agente tensioactivo es de 0,001 a 2,0% en peso, por ejemplo, al peso de agua después de la redisolución.

El "cloruro sódico" actúa para mantener la solubilidad del HGF. Esto es, por ejemplo, en el caso de HGF recombinado usado en los Ejemplos, la solubilidad se intensifica añadiendo cloruro sódico, y la solubilidad aumenta notablemente, en particular, a 300 mM o más (Patente Japonesa abierta a examen público N° 6-247872). La cantidad de adición de cloruro sódico está limitada por la relación de presión osmótica, pero puede ser una cantidad que muestra una relación de presión osmótica de la preparación para inyección para uso general. En particular, se prefiere que la relación de presión osmótica sea de 1 a 2, que se permite como la relación de presión osmótica de inyección para un tratamiento médico o fármaco para animales, y se prefiere añadir, por ejemplo, de 150 a 300 mM a la cantidad de agua después de la redisolución.

La preparación liofilizada de HGF se prepara mediante liofilización de una disolución acuosa que contiene HGF, mediante un método ordinario de liofilización. Por ejemplo, el HGF se disuelve en un disolvente apropiado (por ejemplo, agua esterilizada, tampón, disolución fisiológica, etc.), se filtra a través de un filtro que ha de esterilizarse, y se añaden el estabilizante, tampón, agente tensioactivo, y cloruro sódico, y la mezcla se liofiliza. La preparación de la invención puede contener aditivos necesarios para la fabricación farmacéutica, por ejemplo, un auxiliar para la disolución, un antioxidante, un agente que mitiga el dolor, un agente isotónico, y similares. El método de liofilización puede comprender tres operaciones unitarias, por ejemplo, (1) una etapa de congelación de enfriar y congelar a presión ordinaria, (2) una primera etapa de secado de sublimar y secar el agua libre no retenida por el soluto, a presión reducida, y (3) una segunda etapa de secado de retirar el agua adsorbida intrínseca y el agua de cristalización del soluto (*Pharm. Tech. Japan*, **8(1)**, 75-87, 1992). El HGF es muy estable cuando se prepara una disolución, cuando se liofiliza, y en una disolución acuosa redisolviendo la preparación liofilizada. El contenido de HGF puede ajustarse apropiadamente dependiendo de la enfermedad que ha de tratarse y la vía de administración.

60 La preparación liofilizada se usa añadiendo agua destilada para inyección y redisolviendo, antes del uso.

Aplicabilidad industrial

65 La preparación liofilizada de HGF de la invención puede estabilizar el HGF, y puede conservarse durante un largo periodo.

ES 2 279 522 T3

Ejemplos

La invención se describe con más detalle mediante la presentación de Ejemplos, pero debe observarse que la invención no está limitada a estos Ejemplos solos. En los Ejemplos, se usó dLeHGF (HGF del tipo de eliminación de cinco aminoácidos, también conocido como TCF-II), descrito en la publicación de Patente WO 90/10651).

Ejemplo 1

Preparación de una preparación liofilizada de HGF

En tampón de citrato 10 mM (pH 5,0) que contenía cloruro sódico 300 mM y polisorbato 80 al 0,01%, se disolvieron 20 mg/ml de HGF, y se obtuvo de forma aséptica una disolución acuosa de HGF. Después de ajustar el pH de la disolución acuosa, se cargó de forma aséptica en un vial, y se liofilizó en las condiciones mostradas en la Tabla 1, y se obtuvo una preparación liofilizada de HGF. La flecha (→) en la Tabla muestra el cambio de temperatura.

TABLA 1

	Etapa de congelación		Primera etapa de secado		Segunda etapa de secado	
Temperatura (°C)	5 → -40	-40	-40 → 0	0	0 → 20	20
Tiempo (h)	1	10	8	24	1	24
Presión (Pa) (mmHg)	101325 760	101325 760	<133,3 <1	<133,3 <1	<133,3 <1	<133,3 <1

Ejemplo 2

Preparación de una preparación liofilizada de HGF

Se obtuvo una preparación liofilizada de HGF usando tampón de citrato 10 mM (pH 6,0) en vez de tampón de citrato 10 mM (pH 5,0) del Ejemplo 1.

Ejemplo 3

Preparación de una preparación liofilizada de HGF

Se obtuvo una preparación liofilizada de HGF usando tampón de fosfato 10 mM (pH 6,0) en vez de tampón de citrato 10 mM (pH 5,0) del Ejemplo 1.

Ejemplo 4

Preparación de una preparación liofilizada de HGF

Se obtuvo una preparación liofilizada de HGF usando tampón de fosfato 10 mM (pH 7,0) en vez de tampón de citrato 10 mM (pH 5,0) del Ejemplo 1.

Ejemplo 5

Preparación de una preparación liofilizada de HGF

En tampón de citrato 10 mM (pH 5) que contenía cloruro sódico 300 mM y polisorbato 80 al 0,01%, se disolvieron 20 mg/ml de HGF. En sucesión, se disolvieron 50 mg/ml de glicina, y se obtuvo de forma aséptica una disolución de HGF. Después de ajustar el pH de la disolución, se cargó de forma aséptica en un vial, y se liofilizó en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, y se obtuvo una preparación liofilizada de HGF.

Ejemplo 6

Preparación de una preparación liofilizada de HGF

Se obtuvo una preparación liofilizada de HGF usando alanina en vez de la glicina del Ejemplo 5.

ES 2 279 522 T3

Ejemplo 7

Preparación de una preparación liofilizada de HGF

5 En tampón de citrato 10 mM (pH 5) que contenía cloruro sódico 300 mM y polisorbato 80 al 0,01%, se disolvieron 20 mg/ml de HGF. En sucesión, se disolvieron 200 mg/ml de sorbitol, y se obtuvo de forma aséptica una disolución de HGF. Después de ajustar el pH de la disolución, se cargó de forma aséptica en un vial, y se liofilizó en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, y se obtuvo una preparación liofilizada de HGF.

10 Ejemplo 8

Preparación de una preparación liofilizada de HGF

15 En tampón de citrato 10 mM (pH 6) que contenía cloruro sódico 300 mM y polisorbato 80 al 0,01%, se disolvieron 10 mg/ml de HGF. En sucesión, se disolvieron 50 mg/ml de sulfato de dextrano, se ajustó el pH, y se obtuvo una disolución de HGF. Se cargó luego en un vial, y se liofilizó en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, y se obtuvo una preparación liofilizada de HGF.

20 Ejemplo 9

Preparación de una preparación liofilizada de HGF

25 Se obtuvo una preparación liofilizada de HGF de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto por el uso de tampón de citrato 10 mM (pH 6,0) en vez de tampón de citrato 10 mM (pH 5,0), y regulando la concentración de HGF a 10 mg/ml.

Ejemplo de Ensayo 1

Efectos de un procedimiento de liofilización sobre la actividad biológica de HGF

30 Para observar los cambios en la actividad biológica de HGF en el procedimiento de liofilización, usando una disolución acuosa de HGF antes de liofilización y una disolución acuosa de HGF redisoluelta directamente después de la liofilización del Ejemplo 1, se determinó la actividad biológica del HGF (el método de determinación de la actividad biológica se muestra a continuación). Los resultados se muestran en la Tabla 2. Ya que la actividad específica no cambió antes y después de la liofilización, se muestra que la actividad biológica del HGF no se inactiva por el procedimiento de liofilización y redisolución, lo que sugiere que se puede usar el HGF como preparación liofilizada.

Método de determinación de la actividad biológica

40 Se purificaron hepatocitos obtenidos por perfusión del hígado de ratas Wistar macho, y, después de confirmar la tasa de supervivencia celular, se sembraron en una placa con una densidad de 1×10^4 /pocillo. Después de una preincubación durante 20 horas en un incubador con dióxido de carbono al 5%, se añadieron una muestra de HGF y una muestra normal (n = 3). Después de una preincubación adicional durante 24 horas en un incubador con dióxido de carbono al 5%, se añadió [^3H -timidina] para marcar durante 2 horas. Las células se recogieron en un recogedor de células, y se determinó la cantidad de [^3H] dentro de las células. Los resultados de la determinación se comprobaron mediante un método de calibración de líneas paralelas, y se determinó la actividad específica frente a la muestra normal.

50 TABLA 2

Actividad biológica antes y después de la liofilización	
Muestra	Actividad específica
Preparación en disolución antes de la liofilización	0,89
Preparación liofilizada inmediatamente después de la redisolución	0,94

65

ES 2 279 522 T3

Ejemplo de Ensayo 2

Propiedades después de disolver la preparación liofilizada

5 Las preparaciones liofilizadas preparadas en los Ejemplos se conservaron durante 1 mes a -40°C, 25°C, y 50°C, y se disolvieron, y se observaron visualmente las propiedades de las preparaciones disueltas. La preparación liofilizada se disolvió usando agua purificada. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Cuando se conservaron a -40°C o 25°C, las preparaciones de todos los Ejemplos fueron estables en cuanto a las propiedades. Cuando se almacenó a 50°C, la preparación del Ejemplo 1 se enturbió inmediatamente después de la disolución, pero las preparaciones de los
10 Ejemplos 5, 6 y 7 fueron estables en cuanto a las propiedades.

TABLA 3

Propiedades después de disolver las preparaciones liofilizadas (conservadas durante 1 mes)			
Preparación	Propiedades		
	-40°C	25°C	50°C
Ejemplo 1	Transparente	Transparente	Turbio
Ejemplo 5	Transparente	Transparente	Transparente
Ejemplo 6	Transparente	Transparente	Transparente
Ejemplo 7	Transparente	Transparente	Transparente

Ejemplo de Ensayo 3

Cambios en contenido de polímero en las preparaciones liofilizadas

Las preparaciones liofilizadas preparadas en los Ejemplos 1, 5, 6 y 7 se conservaron durante 1 mes o 2 meses a -40°C, 25°C, 40°C, y 50°C, y se determinó la proporción de contenido de polímero y contenido de HGF contenidos en las preparaciones liofilizadas. El método de determinación es el método de filtración en gel como se explica a continuación. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y Tabla 5. Independientemente de la temperatura de conservación, la producción de polímero fue baja en las preparaciones de todos los Ejemplos, y las preparaciones fueron físicamente estables. En particular, la producción de polímero fue extremadamente baja en las preparaciones de los Ejemplos 5, 6 y 7, y las preparaciones fueron físicamente estables.

Método de determinación del contenido de polímero

La concentración de HGF se diluyó a 2 mg/ml, y se determinó en las siguientes condiciones mediante el método de filtración en gel.

50 Columna: TOSOH TSK G-3000SW XL (ϕ 0,78X30 cm)

Caudal: 0,5 ml/min

Detección: DO 280

55 Temperatura: 25°C

Vehículo: trometamol 10 mM, NaCl 150 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,05%, pH 7,0

60 Aplicación: 20 μ l

Tiempo de retención del polímero: 13,0 min

Tiempo de retención del HGF: 14,4 min

65

ES 2 279 522 T3

TABLA 4

Contenido de polímero/contenido de HGF en preparaciones liofilizadas conservadas durante 1 mes				
	-40°C	25°C	40°C	50°C
Ejemplo 1	1,07%	1,59%	2,76%	6,17%
Ejemplo 5	0,92%	1,39%	1,83%	4,09%
Ejemplo 6	0,93%	1,54%	1,81%	2,90%
Ejemplo 7	0,90%	1,35%	2,57%	6,64%

TABLA 5

Contenido de polímero/contenido de HGF en preparaciones liofilizadas conservadas durante 2 meses				
	-40°C	25°C	40°C	50°C
Ejemplo 1	0,92%	1,44%	3,91%	12,23%
Ejemplo 5	0,88%	1,21%	2,49%	7,49%
Ejemplo 6	0,85%	1,10%	1,96%	5,76%

Ejemplo de Ensayo 4

Efectos del sulfato de dextrano en la producción de polímero

La preparación liofilizada preparada en el Ejemplo 8 se conservó durante 1 mes a 50°C, y se determinó la proporción de contenido de polímero y contenido de HGF contenidos en las preparaciones liofilizadas. El método de determinación fue el mismo que en el Ejemplo 3. Como ejemplo comparativo, se usó y ensayó de manera similar la preparación liofilizada del Ejemplo 9 preparada con la misma composición y método, excepto que no estaba contenido el sulfato de dextrano. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Como se muestra en la Tabla 6, añadiendo sulfato de dextrano, se ha encontrado que la producción de polímero fue baja incluso si se conservada a alta temperatura, y que mejora la estabilidad.

TABLA 6

Contenido de polímero/contenido de HGF en preparaciones liofilizadas		
	Antes del comienzo de la conservación	Después de conservación durante 1 mes a 50°C
Ejemplo 8	2,46%	9,45%
Ejemplo 9	1,78%	14,01%

ES 2 279 522 T3

Ejemplo de Ensayo 5

Cambios de actividad biológica de las preparaciones liofilizadas

5 Las preparaciones liofilizadas preparadas en los Ejemplos 1, 5, 6 y 7 se conservaron durante 1 mes o 2 meses a -40°C, 40°C, 50°C y 60°C, y se determinó la actividad biológica de la disolución acuosa después de redissolver las preparaciones liofilizadas, mediante el método de determinación de actividad biológica mostrado en el Ejemplo de Ensayo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 7 y Tabla 8. Los valores iniciales de actividad biológica de las disoluciones acuosas después de redissolver las preparaciones de los Ejemplos 1, 5, 6 y 7 fueron respectivamente 1,01 ± 0,25, 0,91 ± 0,18, 0,88 ± 0,05, y 1,03 ± 0,04. Cuando se conservaron a 60°C, se observó una ligera tendencia de disminución de la actividad biológica, pero cuando se conservaron a 50°C o una temperatura inferior, no hubo casi cambio en la actividad biológica en las preparaciones de cualquier Ejemplo, y la actividad biológica fue estable.

15

TABLA 7

20

Actividad biológica de preparaciones liofilizadas conservadas durante 1 mes (actividad específica)				
	-40°C	40°C	50°C	60°C
Ejemplo 1	0,96 ± 0,13	0,92 ± 0,13	0,81 ± 0,07	0,54 ± 0,05
Ejemplo 5	0,80 ± 0,14	0,99 ± 0,10	0,80 ± 0,16	0,72 ± 0,03
Ejemplo 6	0,92 ± 0,14	1,02 ± 0,06	0,94 ± 0,08	0,78 ± 0,03
Ejemplo 7	0,92 ± 0,02	0,97 ± 0,04	0,83 ± 0,06	---

25

30

TABLA 8

35

Actividad biológica de preparaciones liofilizadas conservadas durante 2 meses (actividad específica)			
	-40°C	40°C	60°C
Ejemplo 1	1,14 ± 0,14	0,98 ± 0,01	0,46 ± 0,09
Ejemplo 5	0,95 ± 0,05	0,84 ± 0,09	0,57 ± 0,01
Ejemplo 6	1,11 ± 0,14	1,09 ± 0,03	0,52 ± 0,02

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una preparación liofilizada, que comprende factor de crecimiento de hepatocitos como ingrediente biológica-
mente activo, sulfato de dextrano como agente estabilizante, un tampón de citrato, y un agente tensioactivo que es
polisorbato.

10 2. La preparación liofilizada conforme a la reivindicación 1, en la que la preparación comprende además cloruro
sódico.

10 3. El uso de sulfato de dextrano como agente estabilizante para la fabricación de una preparación liofilizada de
factor de crecimiento de hepatocitos, que contiene factor de crecimiento de hepatocitos, un tampón de citrato, y un
agente tensioactivo que es polisorbato.

15 4. El uso de sulfato de dextrano conforme a la reivindicación 3, en el que la preparación comprende además cloruro
sódico.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65