



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 297**

51 Int. Cl.:
A61K 38/57 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04700828 .9**
96 Fecha de presentación : **08.01.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1599222**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.11.2005**

54 Título: **Composiciones acuosas estabilizadas que comprenden inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT) o variante del inhibidor de la vía del factor tisular.**

30 Prioridad: **08.01.2003 US 438519 P**
13.08.2003 US 494577 P
08.10.2003 US 509260 P
20.10.2003 US 512090 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2009

73 Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72 Inventor/es: **Chen, Bao-Lu**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 321 297 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

Composiciones acuosas estabilizadas que comprenden inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT) o variante del inhibidor de la vía del factor tisular.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones estabilizadas que comprenden la proteína inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT). Más específicamente, se refiere a composiciones que comprenden IVFT o una variante del IVFT, un agente solubilizante y un antioxidante.

Antecedentes de la invención

El inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT) tiene una longitud de 276 aminoácidos y funciona como un inhibidor de la coagulación sanguínea mediada por el factor tisular. Su secuencia de aminoácidos se muestra en el SEQ ID NO: 1. El extremo amino terminal del IVFT está cargado negativamente, y el extremo carboxilo terminal está cargado positivamente. La proteína IVFT contiene tres tipos de dominios inhibidores enzimáticos Kunitz. El IVFT contiene 18 residuos de cisteína y forma 9 puentes de disulfuro cuando está plegado correctamente. La secuencia primaria contiene tres sitios de glucosilación consenso conectados por N (Asn-X-Ser/Thr). Los residuos de asparragina de los sitios de glucosilación se localizan en las posiciones 145, 195 y 256. El IVFT también se conoce como inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteínas (LACI), inhibidor del factor tisular (TFI), e inhibidor de la vía extrínseca (EPI).

Se ha propuesto el uso del IVFT para el tratamiento de diversas indicaciones, incluyendo septicemia (documentos EE.UU. 6.063.764 y WO93/24143), trombosis venosa profunda (documentos EE.UU. 5.563.123, EE.UU. 5.589.359 y WO96/04378), isquemia (documentos EE.UU. 5.885.781, EE.UU. 6.242.414 y WO96/40224), reestenosis (documentos EE.UU. 5.824.644 y WO96/01649) y cáncer (documentos EE.UU. 5.902.582 y WO97/09063). Se ha demostrado que una variante del IVFT, que difiere del IVFT por la adición de un residuo de alanina en el amino terminal ("ala-IVFT"), es eficaz en modelos animales para el tratamiento de la septicemia. Carr y col., Circ Shock, noviembre de 1994; 44 (3): 126-37.

Tras la preparación, las composiciones del IVFT o de una variante del IVFT pueden empaquetarse para su almacenamiento en forma acuosa o en estado congelado. El IVFT o las variantes del IVFT pueden, sin embargo, formar agregados durante su almacenamiento en formulaciones acuosas. La agregación está provocada por interacciones entre las moléculas del IVFT o de las variantes del IVFT, que dan como resultado la formación de oligómeros. Estos oligómeros pueden permanecer solubles o pueden formar grandes agregados visibles que precipitan a partir de la disolución durante el almacenamiento. La formación de agregados de IVFT o de variantes de IVFT durante el almacenamiento de una composición acuosa puede afectar negativamente a su actividad biológica, dando como resultado una pérdida de eficacia terapéutica como un anticoagulante eficaz para el tratamiento de diversas dolencias, incluyendo septicemia. Adicionalmente, la formación de agregados puede causar otros problemas, tales como la obstrucción de los tubos, las membranas o las bombas cuando la composición que contiene el IVFT o la composición que contiene la variante del IVFT se administra usando un sistema de infusión. Para minimizar estos problemas, hay una necesidad en la técnica de mejorar la estabilización de las composiciones del IVFT y de las variantes del IVFT.

Resumen de la invención

La presente invención se basa en mejoras significativas en la estabilidad de composiciones acuosas que comprenden el IVFT o variantes del IVFT que se materializan cuando dichas composiciones comprenden un agente solubilizante y un antioxidante. El antioxidante puede estar en forma de un gas desplazante de oxígeno, un capturador de oxígeno o de radicales libres, o un agente quelante.

La invención proporciona al menos las siguientes formas de realización.

Una forma de realización de la invención es una composición acuosa que comprende aproximadamente 0,05 hasta 15 mg/ml de IVFT o de una variante de IVFT; aproximadamente 50 hasta aproximadamente 600 mM de un agente solubilizante elegido del grupo formado por (i) arginina o un análogo de la misma, (ii) lisina o un análogo de la misma, y (iii) mezclas de (i) y (ii); y un antioxidante elegido del grupo formado por (i) un gas desplazante de oxígeno, (ii) un capturador de oxígeno o de radicales libres, (iii) un agente quelante, y (iv) mezclas de los mismos; en la que la composición acuosa tiene (a) una estabilidad de agregación porcentual de aproximadamente el 45% o mayor; (b) una estabilidad de oxidación porcentual de aproximadamente el 45% o mayor; y (c) un pH desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8.

Otra forma de realización de la invención es un procedimiento para fabricar una composición acuosa de IVFT o de una variante de IVFT que comprende la etapa de añadir a una composición acuosa que comprende aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 15 mg/ml de IVFT o de variante de IVFT; aproximadamente 50 hasta aproximadamente 600 mM de un agente solubilizante elegido del grupo formado por (i) arginina o un derivado de la misma, (ii) lisina o un derivado de la misma, y (iii) mezclas de (i) y (ii); y b) un antioxidante elegido del grupo formado por (i) un gas desplazante de oxígeno, (ii) un capturador de oxígeno o de radicales libres, (iii) un agente quelante, y (iv) mezclas de (i), (ii) y (iii); en la que la composición acuosa tiene (a) una estabilidad de agregación porcentual de aproximadamente

el 45% o mayor; (b) una estabilidad de oxidación porcentual de aproximadamente el 45% o mayor; y (c) un pH desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8.

Otra forma de realización más de la invención es una composición farmacéutica que comprende a) la composición acuosa y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición acuosa comprende aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 15 mg/ml de IVFT o de una variante de IVFT; aproximadamente 50 hasta aproximadamente 600 mM de un agente solubilizante elegido del grupo formado por (i) arginina o un análogo de la misma, (ii) lisina o un análogo de la misma, y (iii) mezclas de (i) y (ii); y un antioxidante elegido del grupo formado por (i) un gas desplazante de oxígeno, (ii) un capturador de oxígeno o de radicales libres, (iii) un agente quelante, y (iv) mezclas de los mismos; en la que la composición acuosa tiene (a) una estabilidad de agregación porcentual de aproximadamente el 45% o mayor; (b) una estabilidad de oxidación porcentual de aproximadamente el 45% o mayor; y (c) un pH desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1 muestra la semivida durante el almacenamiento ($t_{1/2}$, en días) de cuatro composiciones estándar de ala-IVFT analizadas mediante cromatografía líquida a alta presión de intercambio iónico (IEX HPLC) en función de la concentración de arginina a 50°C. Todas las formulaciones contenían 0,15 mg/ml de ala-IVFT tamponada a pH 5,5 bien con L-arginina base y ácido cítrico, o con L-arginina HCl y ácido cítrico/citrato sódico 10 mM. Las formulaciones específicas de ala-IVFT contenían: (a) L-arginina HCl 20-150 mM, ácido cítrico/citrato sódico 10 mM como tampón; (b) L-arginina base 20-150 mM, valorada con ácido cítrico; (c) L-arginina HCl 100-300 mM, ácido cítrico/citrato sódico 10 mM como tampón; (d) L-arginina base 100-300 mM valorada con ácido cítrico.

Fig. 2 muestra la estabilidad de una composición estándar de ala-IVFT en función de la concentración de oxígeno disuelto, expresada como un porcentaje de la saturación completa con aire. El porcentaje de ala-IVFT soluble restante en muestras de estabilidad almacenadas a 30°C fue analizado mediante HPLC en fase reversa (RP). La composición estándar de ala-IVFT contenía 0,15 mg/ml de ala-IVFT, ácido cítrico/citrato sódico 20 mM, y L-arginina 300 mM. El pH era de 5,5.

Fig. 3 muestra la semivida durante el almacenamiento ($t_{1/2}$, en semanas) de una composición estándar de ala-IVFT en función de la concentración de oxígeno disuelto, expresada como un porcentaje de la saturación completa con aire. El porcentaje de ala-IVFT soluble restante en muestras de estabilidad almacenadas a 30°C fue analizado mediante RP-HPLC. La composición estándar de ala-IVFT contenía 0,15 mg/ml de IVFT, ácido cítrico/citrato sódico 20 mM, y L-arginina 300 mM. El pH era de 5,5.

Fig. 4 muestra la estabilidad de una composición estándar de ala-IVFT que contiene los agentes quelantes EDTA y DTPA añadidos en las cantidades de 0, 1, ó 4 mM. El porcentaje de ala-IVFT soluble restante en muestras de estabilidad almacenadas a 30°C fue analizado mediante RP-HPLC. La composición estándar de ala-IVFT contenía 0,15 mg/ml de ala-IVFT, ácido cítrico/citrato sódico 20 mM, y L-arginina 300 mM. El pH era de 5,5.

Fig. 5 muestra la estabilidad de una composición estándar de ala-IVFT que contiene el capturador de oxígeno metionina añadido en las cantidades de 0, 2, 5 ó 10 mM. El porcentaje de ala-IVFT soluble restante en muestras de estabilidad almacenadas a 30°C fue analizado mediante RP-HPLC. La composición estándar de ala-IVFT contenía 0,15 mg/ml de ala-IVFT, ácido cítrico/citrato sódico 20 mM, y L-arginina 300 mM. El pH era de 5,5.

Fig. 6 es un cromatograma por RP-HPLC de una muestra de ala-IVFT. Los picos A-F se describen en el Ejemplo 1.

Fig. 7 curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Eje X, supervivencia; eje Y, tiempo (horas).

Descripción detallada de la invención

Las composiciones acuosas de la presente invención se basan en el descubrimiento de que la adición a una composición acuosa del IVFT o una variante del IVFT de i) un agente solubilizante aminoacídico (por ejemplo, arginina, lisina o análogos de las mismas) y ii) un antioxidante, en el que la composición acuosa tiene un pH desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8, da como resultado una composición que contiene IVFT o que contiene una variante del IVFT que ha incrementado sustancialmente su estabilidad durante el almacenamiento con respecto a composiciones que contienen IVFT o que contienen una variante del IVFT preparadas sin la combinación de estos dos componentes adicionales. Este aumento global de la estabilidad de la composición se consigue a través de la influencia del agente soluble combinada con la del agente antioxidante, para proporcionar una composición que resiste no sólo la agregación durante el almacenamiento, sino también la oxidación perjudicial, especialmente en los residuos de metionina del IVFT. Las composiciones acuosas de la invención también resisten otros efectos perjudiciales (por ejemplo, desplegamiento, replegamiento y desnaturalización) que dan como resultado una pérdida de la actividad biológica u otras características indeseables.

Dado que el agente solubilizante y antioxidante afectan principalmente a mecanismos independientes de degradación del IVFT o de la variante del IVFT (agregación y oxidación de la metionina, respectivamente), la combinación del agente solubilizante y antioxidante proporciona una composición más estable de IVFT o de variante de IVFT de

lo que sería posible sin esta combinación, o incluso sin uno de estos dos componentes. Por ejemplo, la oxidación de las metioninas del IVFT o de la variante del IVFT puede ser indeseable incluso cuando el IVFT o la variante del IVFT son biológicamente activos.

5 Estabilidad de las composiciones acuosas

Las composiciones acuosas de la invención que contienen IVFT o que contienen una variante del IVFT típicamente han aumentado su estabilidad durante el almacenamiento con respecto a uno o más efectos de degradación del IVFT (por ejemplo, agregación y oxidación de la metionina) con respecto a composiciones preparadas en ausencia de la combinación de un agente solubilizante y un antioxidante según se describe en este documento. Esto es, como las composiciones de la invención que contienen IVFT y una variante del IVFT tienen una estabilidad de agregación porcentual aumentada y una estabilidad de oxidación porcentual aumentada, la semivida del IVFT o de la variante del IVFT no agregado y no oxidado está aumentada. La estabilidad de reacción porcentual y la estabilidad de oxidación porcentual de una muestra de IVFT o de una variante de IVFT pueden variar independientemente. Preferiblemente, el IVFT o la variante del IVFT, en las composiciones acuosas de la invención, es biológicamente activo, según se determina, por ejemplo, mediante un ensayo de tiempo de protrombina, según se describe a continuación.

Las composiciones acuosas de la invención tienen al menos una estabilidad de agregación del 45%. “Estabilidad de agregación porcentual” se refiere a la proporción de una muestra de IVFT o de variante de IVFT que es soluble medida en un ensayo de estabilidad acelerada a 40°C. En un ensayo de estabilidad acelerada a 40°C, se incuba una muestra de IVFT o de una variante de IVFT durante ocho semanas a 40°C. Tras la incubación, la muestra de IVFT o de una variante de IVFT se filtra a través de un filtro de 0,2 μm y se somete a un ensayo de cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico (IEX-HPLC) para determinar la cantidad de IVFT o de variante de IVFT soluble restante en disolución. A continuación se describe un ensayo de IEX-HPLC por debajo del 45%. Así, por ejemplo, una composición de IVFT o de una variante de IVFT que tenga una estabilidad de agregación del 60% es una composición en la que el 60% del IVFT o de la variante del IVFT es soluble medida en el ensayo de estabilidad acelerada a 40°C. Una composición de IVFT o de una variante de IVFT que tenga una estabilidad de agregación del 80% es una composición en la que el 80% del IVFT o de la variante del IVFT es soluble medida en el ensayo de estabilidad acelerada a 40°C. La estabilidad de agregación porcentual de las composiciones de la invención de IVFT o de una variante de IVFT es preferiblemente aproximadamente del 45, 50, 60, 70 ó 75% o más, más preferiblemente aproximadamente del 80, 82, 84, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% o más medida en el ensayo de estabilidad acelerada a 40°C y puede variar, por ejemplo, desde aproximadamente el 45% o más hasta aproximadamente el 99% o más, aproximadamente del 45% o más hasta aproximadamente el 70% o más, aproximadamente del 60% o más hasta aproximadamente el 80% o más, aproximadamente del 70% o más hasta aproximadamente el 90% o más, aproximadamente del 80% o más hasta aproximadamente el 90% o más, o aproximadamente del 45% o más hasta aproximadamente el 70% o más, medida en el ensayo de estabilidad acelerada a 40°C.

Las composiciones acuosas de la invención también tienen aproximadamente un 45% o más de estabilidad de oxidación. El “porcentaje de estabilidad de oxidación” se refiere a la proporción de muestra de IVFT o de variante de IVFT que no contiene una metionina oxidada medida en un ensayo de estabilidad acelerada a 30°C. En el ensayo de estabilidad acelerada a 30°C, se incuba una muestra de IVFT o de variante de IVFT durante ocho semanas a 30°C. Tras la incubación, la muestra de IVFT o de variante de IVFT se somete a un ensayo de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) para determinar la cantidad de IVFT o de variante de IVFT con metionina oxidada presente en la disolución. A continuación se describe un ensayo de RP-HPLC. Así, por ejemplo, una composición de IVFT o de variante de IVFT que tiene una estabilidad de oxidación del 60% es una composición en la que el 60% del IVFT o de la variante del IVFT no contiene una metionina oxidada medida en el ensayo de estabilidad acelerada a 30°C. Una composición de IVFT o de variante de IVFT que tiene una estabilidad de oxidación del 80% es una composición en la que el 80% del IVFT o de la variante del IVFT no contiene una metionina oxidada medida en el ensayo de estabilidad acelerada a 30°C. La estabilidad de oxidación porcentual de las composiciones de IVFT o de variante de IVFT de la invención es preferiblemente aproximadamente del 45, 50, 60, 70 ó 75% o más, más preferiblemente del 80, 82, 84, 85, 89, 90, 91, 92, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% o más, medida en el ensayo de estabilidad acelerada a 30°C y puede variar, por ejemplo, desde aproximadamente el 45% o más hasta aproximadamente el 99% o más, aproximadamente del 45% o más hasta aproximadamente el 70% o más, aproximadamente del 60% o más hasta aproximadamente el 80% o más, aproximadamente del 70% o más hasta aproximadamente el 90% o más, o aproximadamente del 80% o más hasta aproximadamente el 90% o más, medida en el ensayo de estabilidad acelerada a 30°C.

La semivida durante el almacenamiento del IVFT o de la variante del IVFT en las composiciones de la presente invención está típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 36 meses (por ejemplo, hasta aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ó 36 meses), dependiendo de la temperatura de almacenamiento. Las composiciones acuosas que comprenden IVFT o una variante del IVFT, un agente solubilizante y un antioxidante, y que tienen un pH de aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8 según la presente invención tienen típicamente una semivida durante el almacenamiento con respecto a la estabilidad de agregación y/u oxidación de más de aproximadamente 8 semanas a una temperatura de aproximadamente 15°C. Por ejemplo, la semivida durante el almacenamiento del IVFT o de la variante del IVFT es desde aproximadamente 1 mes hasta aproximadamente 24 meses (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ó 24 meses) a una temperatura de aproximadamente 15°C o aproximadamente 30°C.

ES 2 321 297 T3

Temperatura de almacenamiento

El incremento en la estabilidad de almacenamiento se consigue tanto si las composiciones de la invención son almacenadas como líquidas para su uso posterior o son congeladas y descongeladas antes de su uso. Las temperaturas de almacenamiento pueden variar desde aproximadamente -70°C hasta aproximadamente 25°C (por ejemplo, aproximadamente -70, -60, -50, -40, -30, -20, -10, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25°C). Preferiblemente, las composiciones acuosas de la invención se almacenan en forma líquida para aprovechar completamente la comodidad de haber incrementado la estabilidad de almacenamiento en esta forma, la facilidad de administración sin reconstitución y la capacidad de suministrar la formulación en jeringas precargadas listas para su uso o como preparaciones multidosis si la formulación es compatible con agentes bacteriostáticos. Una temperatura de almacenamiento preferida para las formulaciones líquidas es aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 8°C (por ejemplo, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8°C).

IVFT y variantes del IVFT

El IVFT es un polipéptido con la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, el IVFT es una proteína humana recombinante generada en un hospedador microbiano. El IVFT se caracteriza y describe adicionalmente con respecto a su actividad biológica en el documento WO01/24814.

Las variantes del IVFT incluyen análogos y derivados del IVFT, así como fragmentos del IVFT, análogos del IVFT y derivados del IVFT. Las variantes del IVFT pueden obtenerse a partir de fuentes humanas o de otras fuentes de mamíferos, sintetizarse u obtenerse mediante técnicas recombinantes. Los análogos del IVFT son moléculas con una o más sustituciones, inserciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos. Se prefieren las sustituciones conservativas, en las que un aminoácido es intercambiado por otro con unas propiedades similares. Algunos ejemplos de sustituciones conservativas incluyen, pero no se limitan a, Glu ↔ Ala, Val ↔ Ile ↔ Leu, Asp ↔ Glu, Lys ↔ Arg, Asn ↔ Gln y Phe/Trp ↔ Tyr. Típicamente entran en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos). Pueden añadirse aminoácidos adicionales en cualquier posición de la molécula, particularmente en el amino o carboxi terminal. Por ejemplo, un análogo del IVFT, el N-L-alanil-IVFT (“ala-IVFT”), tiene un residuo de alanina adicional en el extremo amino terminal. Las adiciones de aminoácidos pueden ser de 1, 2, 5, 10, 25, 100 o más aminoácidos adicionales. Las proteínas de fusión están englobadas en la definición.

Los fragmentos son porciones de IVFT, análogos de IVFT o derivados de IVFT. Algunos ejemplos de fragmentos incluyen los dominios de Kunitz 1, 2 ó 3, los dominios de Kunitz 1 y 2 ó 2 y 3, o deleciones del N terminal, el C terminal o ambos. Una guía sustancial para elaborar variantes se encuentra en el documento U.S. 5.106.833. Los fragmentos del IVFT comprenden al menos 20 aminoácidos consecutivos del SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, un fragmento puede ser de 20, 25, 30, 50, 100, 150, 200, 250 ó 275 aminoácidos consecutivos de longitud. Los fragmentos del IVFT que no poseen actividad biológica se describen en el documento U.S. 5.106.833. El uso de dichos fragmentos también se contempla en la presente invención.

Los derivados se definen como IVFT, análogos de IVFT o fragmentos de IVFT con fracciones adicionales. Algunos ejemplos de dichas adiciones incluyen glucosilación, fosforilación, acetilación o amidación.

El porcentaje de homología entre una variante del IVFT y el SEQ ID NO: 1 se determina usando el programa de alineación Blast2 (Blast2, Expect 10, códigos genéticos estándar, open gap 11, extension gap 1, gap x dropoff 50, y filtro de baja complejidad desactivado). Las variantes del IVFT tendrán generalmente aproximadamente el 70% o más, preferiblemente aproximadamente el 80% o más, más preferiblemente aproximadamente del 90% al 95% (por ejemplo, el 90, 91, 92, 93, 94 ó 95%) o más, y muy preferiblemente aproximadamente el 98% ó 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos con el SEQ ID NO: 1.

Las variantes de la secuencia de aminoácidos del IVFT pueden prepararse creando alteraciones en una secuencia de Adn que codifica para el IVFT. Los procedimientos para crear alteraciones en la secuencia de nucleótidos son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Walker y Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York), Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82: 488-492, Kunkel y col. (1987) *Methods Enzymol.* 154: 367-382, Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, Nueva York), el documento U.S. 4.873.192, y las referencias mencionadas en los mismos.

Las variantes del IVFT poseen preferiblemente una cantidad sustancial de actividad biológica, por ejemplo, del 10%, 30%, 50%, 60%, 80%, 90% o más de la actividad biológica del IVFT medidas, por ejemplo, en un ensayo de protrombina (PT), descrito a continuación. Obviamente, cualquier alteración realizada en el Adn que codifica para una variante del IVFT no debe colocar la secuencia fuera del marco de lectura, y preferiblemente no creará regiones complementarias que podrían producir una estructura de ARNm secundaria. Una guía para determinar qué residuos de aminoácidos pueden sustituirse, insertarse o deleccionarse sin anular la actividad biológica o inmunológica del IVFT o de la variante del IVFT puede encontrarse usando programas informáticos bien conocidos en la materia, tales como el programa informático DNASTAR, o en Dayhoff y col. (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). También se contempla la estabilización de las variantes del IVFT que no son biológicamente activas.

ES 2 321 297 T3

El IVFT o las variantes del IVFT pueden producirse recombinantemente según se muestra en el documento U.S. 4.966.852. Por ejemplo, puede incorporarse un ADNc para la proteína deseada en un plásmido para su expresión en procariotas o eucariotas. Existen muchas referencias conocidas por los expertos en la materia que proporcionan detalles sobre la expresión de proteínas usando microorganismos. Véase el documento U.S. 4.847.201 y Maniatis y col., 1982, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor, Nueva York).

Hay disponible una variedad de técnicas para transformar microorganismos y usar los microorganismos transformados para expresar el IVFT o las variantes del IVFT. Los siguientes son meros ejemplos de posibles metodologías. Las secuencias de ADN del IVFT o de la variante del IVFT pueden conectarse con secuencias de control apropiadas. Las secuencias de ADN del IVFT o de la variante del IVFT pueden incorporarse en un plásmido, tal como pUC13 o pBR322, que están disponibles comercialmente en compañías tales como Boehringer Mannheim. Una vez que el IVFT o la variante del IVFT es insertado en un vector, puede ser clonado en un hospedador adecuado. El ADN puede amplificarse mediante técnicas tales como las mostradas en los documentos U.S. 4.683.202 y U.S. 4.683.195. El ADNc puede obtenerse mediante la inducción de células, tales como las células de hepatoma HepG2 o SKHep, para que elaboren ARNm, y después identificar y aislar el ARN y retrotranscribirlo para obtener el ADNc. Una vez que el vector de expresión es transformado en un hospedador tal como *E. coli*, pueden cultivarse las bacterias y expresarse la proteína. Las bacterias preferidas son microorganismos procarióticos, y *E. coli* es especialmente preferida. Un microorganismo preferido útil en la presente invención es la *E. coli* K-12, cepa MM294, depositada según lo estipulado en el Tratado de Budapest, el 14 de febrero de 1984, con la American Type Culture Collection, ubicada ahora en 10801 University Blvd., Manassas, Virginia (número de acceso 39607).

El IVFT o las variantes del IVFT pueden producirse en bacterias o en levaduras, y subsiguientemente purificarse. Generalmente pueden emplearse procedimientos tales como los mostrados en los documentos U.S. 5.212.091, U.S. 6.063.764, y U.S. 6.103.500 ó WO96/40784. El IVFT o las variantes del IVFT pueden purificarse, solubilizarse y replegarse según el documento WO96/40784 y Gustafson y col., *Prat. Express. Pur.* 5: 233 (1994). Por ejemplo, cuando se prepara según el Ejemplo 9 del documento WO96/40784, las preparaciones de ala-IVFT que se obtienen contienen desde aproximadamente el 85% hasta el 90% de la proteína total en peso como ala-IVFT biológicamente activo.

El IVFT o la variante del IVFT se añade típicamente a composiciones acuosas de la presente invención en una cantidad desde aproximadamente 0,05 mg/ml hasta aproximadamente 15 mg/ml (por ejemplo, 0,05; 0,15, 0,5, 1, 2, 5,5, 7,5, 10, 12,5 ó 15 mg/ml).

Agente solubilizante de aminoácidos

Un agente solubilizante de aminoácidos incorporado en las composiciones de la presente invención que contienen IVFT o una variante del IVFT protege al IVFT o a la variante del IVFT sobre todo de la agregación, aumentando así su estabilidad durante el almacenamiento. La disminución en la formación de agregados con la adición de agentes solubilizantes de aminoácidos se produce de una forma dependiente de la concentración. Esto es, un aumento de la concentración del agente solubilizante de aminoácidos da lugar a un aumento en la estabilidad de la composición de IVFT o de variante de IVFT, debido a la correspondiente reducción en la formación de agregados durante el almacenamiento.

Los agentes solubilizantes aminoacídicos preferidos son arginina, lisina, o análogos de arginina o lisina. La arginina o la lisina pueden estar presentes tanto en forma de base libre como en forma de sal, por ejemplo, en forma de la sal del ácido clorhídrico. Los análogos de arginina o de lisina también pueden estar en forma de base libre o de sal. Los análogos de arginina incluyen, por ejemplo, éster etílico de aminoguanidinoarginina, hidroxamato de arginina y p-nitroanilida de arginina. Los análogos de lisina incluyen, por ejemplo, lisinamida, éster etílico de lisina, hidroxamato de lisina y p-nitroanilida de lisina. Preferiblemente, el agente solubilizante es arginina, presente tanto en su forma de base libre como en su forma de sal de clorhidrato. También se prefieren para su uso como agentes solubilizantes los estereoisómeros L naturales de arginina o lisina, aunque las composiciones estabilizadas de la presente invención pueden incorporar los estereoisómeros D o mezclas de los estereoisómeros L y D.

Los agentes solubilizantes de arginina o lisina o sus análogos son incorporados en la composición acuosa en una cantidad que comporta el efecto deseado de estabilizar las composiciones de IVFT o de variante del IVFT durante el almacenamiento, de forma que la formulación muestra, con respecto a una composición similar pero sin agente solubilizante añadido, una resistencia mejorada a la degradación. Preferiblemente, la cantidad total de agente solubilizante en la composición es desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 600 mM (por ejemplo, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 ó 600 mM), más preferiblemente desde aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 400 mM, y muy preferiblemente aproximadamente 300 mM.

La determinación de la cantidad de base aminoacídica en particular que se debe añadir a la composición acuosa que contiene el IVFT o la variante del IVFT para disminuir la formación de agregados, aumentar la estabilidad del polipéptido y aumentar la estabilidad de almacenamiento de la composición, puede determinarse fácilmente usando procedimientos generalmente conocidos por el experto en la materia y descritos en, por ejemplo, el Ejemplo 6, a continuación. Por ejemplo, el efecto de un agente solubilizante de arginina o de lisina sobre la estabilidad del IVFT o de la variante del IVFT durante su almacenamiento en una composición acuosa puede determinarse fácilmente midiendo el cambio de una o más de varias propiedades de la composición de IVFT o de variante de IVFT con el tiempo, tal

como, por ejemplo, la concentración de polipéptido soluble. La cantidad de polipéptido soluble en disolución puede cuantificarse mediante HPLC de exclusión iónica. En los casos en los que la principal vía de degradación del IVFT o de la variante del IVFT es la agregación, una cantidad eficaz de agente solubilizante que se debe incorporar en una composición que contiene IVFT o una variante del IVFT para obtener una estabilidad mejorada es una cantidad que da como resultado una disminución en la formación de agregados con el tiempo, y por lo tanto, una mayor retención de polipéptido soluble en su forma molecular no agregada (es decir, monomérica).

Antioxidantes

Las composiciones acuosas de IVFT o de variante de IVFT de la presente invención también comprenden un antioxidante. Un "antioxidante" es un componente que reduce la oxidación del IVFT o de la variante del IVFT, especialmente los residuos del aminoácido metionina de la molécula. La oxidación de los residuos de metionina presentes en la molécula de IVFT o de variante de IVFT es una de las principales vías de degradación durante el almacenamiento en la composición, que bien reaccionan directamente con los residuos de metionina o bien catalizan las reacciones de oxidación. Por lo tanto, el uso de ciertos aditivos antioxidantes para combatir los efectos de dichos contaminantes da lugar a una estabilidad mucho mayor de las composiciones de IVFT o de variante de IVFT, incluso de composiciones que ya incorporan un agente solubilizante según la invención. Preferiblemente, el antioxidante es farmacéuticamente aceptable, y está presente en una concentración desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 50 mM (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,1, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 mM), más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 mM (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 mM). El término "farmacéuticamente aceptable" significa que no hay efectos biológicos adversos significativos cuando la formulación se administra a un paciente. El término "paciente" engloba tanto pacientes humanos como veterinarios.

Los tres tipos generales de antioxidantes eficaces en las composiciones de IVFT o de variante de IVFT de la presente invención son: agentes desplazantes de oxígeno, capturadores de oxígeno o de radicales libres, y agentes quelantes.

Gases desplazantes de oxígeno

El oxígeno disuelto presente en una composición acuosa de IVFT o de variante de IVFT puede dar lugar finalmente a la oxidación de la metionina, y consecuentemente, bien a la pérdida de eficacia del IVFT para su función terapéutica pretendida, o bien a la incorporación de especies oxidadas (por ejemplo, sulfóxido de metionina) en el polipéptido de IVFT o de variante de IVFT, que puede tener efectos fisiológicos desconocidos o indeseables. Los gases desplazantes de oxígeno son gases que son eficaces para purgar o desplazar el oxígeno disuelto. Preferiblemente, un gas desplazante de oxígeno reducirá la concentración de oxígeno soluble significativamente con respecto a la concentración de oxígeno disuelto cuando la composición está equilibrada al aire en condiciones ambientales. Preferiblemente, el gas desplazante de oxígeno reduce la concentración de oxígeno disuelto hasta menos de aproximadamente el 10% con respecto a una concentración de oxígeno disuelto de una composición acuosa de IVFT o de variante de IVFT que no comprenda el gas desplazante de oxígeno. Esta condición incrementa drásticamente la estabilidad.

Los gases desplazantes de oxígeno preferidos son sustancialmente inertes con respecto a la composición de IVFT o de variante de IVFT, es decir, no se produce una cantidad significativa de reactividad química tras la exposición de la composición de IVFT al gas desplazante de oxígeno, de forma que la actividad biológica del IVFT se mantiene. Algunos gases desplazantes de oxígeno adecuados incluyen nitrógeno, aire enriquecido en nitrógeno, oxígeno enriquecido en nitrógeno, gases nobles (por ejemplo, helio o argón), metano, etano, propano, dióxido de carbono y mezclas de estos gases. "Aire enriquecido en nitrógeno" y "oxígeno enriquecido en nitrógeno" son mezclas de nitrógeno y aire u oxígeno, respectivamente, con una concentración de nitrógeno mayor que la que se encuentran en la atmósfera (es decir, mayor de aproximadamente 79% en vol.). El nitrógeno es un gas desplazante de oxígeno preferido.

El gas desplazante de oxígeno puede estar presente en la composición en cualquier concentración hasta, e incluyendo, su límite de solubilidad. La solubilidad de un gas desplazante de oxígeno en una composición de IVFT o de una variante de IVFT puede aumentarse manteniendo la composición en una atmósfera presurizada, tal como en un recipiente cerrado que contiene el gas desplazante por encima del nivel de líquido de la composición. Alternativamente, puede mantenerse una presión subatmosférica en el espacio de cabeza para reducir la solubilidad de un gas desplazante de oxígeno.

Los gases desplazantes de oxígeno pueden introducirse en una composición de IVFT o de una variante de IVFT de cualquier forma convencional, tal como purgando el espacio de cabeza por encima del nivel de líquido en un vial u otro recipiente que contenga la composición de IVFT o de variante de IVFT con el gas desplazante, purgando o burbujeando gas desplazante a través de la composición de IVFT o de variante de IVFT, usando ciclos de presurización/despresurización con el gas desplazante, evacuación seguida por una represurización con el gas desplazante, y similares.

Una vez efectuado el desplazamiento de oxígeno según se describió anteriormente, la resolubilización del oxígeno en la composición de IVFT o de variante de IVFT se evita mediante su aislamiento del aire por parte del gas desplazante de oxígeno.

Capturadores de oxígeno o de radicales libres

Otro tipo de antioxidante útil en la presente invención es un capturador de oxígeno o de radicales libres. En general, dichos capturadores son más reactivos con el oxígeno y/o los radicales libres que un IVFT o una variante del IVFT. Sirven como moléculas de “sacrificio” que reaccionan con el oxígeno disponible, evitando así interacciones perjudiciales entre el oxígeno y el IVFT o el oxígeno y la variante del IVFT, muy notablemente la oxidación de los residuos de metionina. En una forma de realización preferida, el capturador de oxígeno o de radicales libres tiene una concentración desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 mM.

Los capturadores de oxígeno o de radicales libres adecuados son estables en las composiciones de IVFT o de variante de IVFT de la presente invención. Los capturadores de oxígeno o de radicales libres farmacéuticamente aceptables preferidos incluyen metionina, ácido ascórbico o ascorbato sódico, L, DL o D- α -tocoferol y acetato de L, DL o D- α -tocoferol, betacaroteno, selenio, piritinol, galato de propilo, butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT). La fase apropiada para el capturador de oxígeno o de radicales libres dependerá naturalmente de su compatibilidad con una composición de IVFT o de variante de IVFT. Generalmente pueden incorporarse apropiadamente en las composiciones de la presente invención antioxidantes tales como el ácido ascórbico o la sal de acetato del α -tocoferol (es decir, acetato de α -tocoferol).

Puede usarse cualquier estereoisómero (isómero L, D o DL) o combinación de isómeros de metionina. Un antioxidante especialmente preferido es la metionina, particularmente la L-metionina. Generalmente se obtienen resultados superiores cuando la metionina añadida representa al menos una cantidad equivalente en una base molar a la presente en el IVFT o en la variante del IVFT. En su forma nativa, el IVFT contiene 5 residuos de metionina por molécula de proteína. La metionina que es parte de la proteína del IVFT o de la variante del IVFT se denomina “metionina del IVFT o de la variante del IVFT” para distinguirla de la metionina añadida a la composición como antioxidante, y que no es parte de la proteína del IVFT o de la variante del IVFT. Por supuesto, la metionina de un polipéptido que no sea el IVFT o de la variante del IVFT también puede servir como capturador de oxígeno para el propósito de la presente invención. Por ejemplo, un polipéptido que comprende poli(metionina) podría reducir la tasa de oxidación de la metionina del IVFT o de la variante del IVFT de una forma similar a la metionina libre añadida a la composición. Por lo tanto, es importante distinguir la “metionina del IVFT o de la variante del IVFT” según se definió anteriormente, de la “metionina que no es del IVFT ni de la variante del IVFT”, que incluye cualquier residuo de metionina añadido a la composición, bien en su forma libre o bien unido a un polipéptido que no sea el IVFT o la variante del IVFT.

Preferiblemente, la metionina está presente en una cantidad tal que la proporción molar de la metionina que no es del IVFT ni de la variante del IVFT y la metionina del IVFT o de la variante del IVFT es desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 10.000:1, más preferiblemente desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 5.000:1, incluso más preferiblemente desde aproximadamente 100:1 hasta aproximadamente 1.000:1, incluso aún más preferiblemente desde aproximadamente 300:1 hasta aproximadamente 1.000:1, e incluso aún más preferiblemente desde aproximadamente 500:1 hasta aproximadamente 1.000:1. En términos de su concentración absoluta, la metionina está presente en la composición preferiblemente en una concentración desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 mM (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 mM). Sin embargo, la concentración de metionina usada puede variar dependiendo de la concentración del IVFT o de la variante del IVFT en las composiciones de la invención. Un efecto importante de la metionina o de otros capturadores de oxígeno es prevenir la formación de residuos de sulfóxido de metionina en el IVFT o en la variante del IVFT que pueden causar efectos indeseados o desconocidos en condiciones fisiológicas, incluso en los casos en los que el IVFT o la variante del IVFT pueden ser biológicamente activos. Por lo tanto, la cantidad de antioxidante que se debe añadir debería ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de forma que la cantidad de sulfóxido de metionina generada tras la oxidación de la metionina añadida sea aceptable ante las autoridades sanitarias. Típicamente, esto significa que la composición no contiene más de aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 30% de residuos de metionina como sulfóxido de metionina.

Agentes quelantes

Otro tipo de antioxidante útil en la presente invención es un agente quelante, también conocido como secuestrante, que se une eficazmente a los iones metálicos de transición (por ejemplo, Fe⁺³). Los iones metálicos de transición pueden estar presentes en la composición, y pueden catalizar reacciones de oxidación perjudiciales que den lugar a una degradación y agregación proteicas. Los agentes quelantes se eligen para que tengan poca o ninguna reactividad química con los demás componentes de la composición, y para que sean generalmente compatibles con el mantenimiento de las propiedades fisiológicas deseadas de la composición (por ejemplo, pH y osmolaridad). Por lo tanto, se prefiere que los agentes quelantes se usen en composiciones en las que no se han añadido deliberadamente cationes metálicas de transición a la composición para propósitos tales como el mantenimiento del pH o la osmolaridad.

Los agentes quelantes son preferiblemente farmacéuticamente aceptables. Los agentes quelantes farmacéuticamente aceptables preferidos incluyen los diversos compuestos carboxilatos de amino que tienen la capacidad de formar complejos metal-ligando con uno o más iones metálicos de transición en disolución. Dichos carboxilatos de amino incluyen los ácidos etilendiaminotetraacético (EDTA) y dietiltriaminopentaacético (DTPA), el ácido 1,2-bis(2-amino-fenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), el ácido etilenglicol-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), y otros compuestos carboxilatos de amino con uno o más grupos carboxilato. Puede usarse cualquier forma salina derivada de estos agentes quelantes carboxilatos de amino, por ejemplo, la forma de sal disódica, siempre que quede algo

de capacidad del agente quelante para complejarse con iones metálicos de transición libres presentes en la composición de IVFT o de variante de IVFT. Las formas de estos agentes quelantes distintas a las formas salinas también son eficaces, e incluyen las diversas formas de éster, anhídrido y halogenadas de estos compuestos.

5 *Tampón*

El pH de las composiciones de IVFT o de variante de IVFT afecta a la solubilidad de la proteína, y por tanto a su estabilidad. Véase Chen y col. (1999) *J. Pharm. Sciences* 88 (9): 881-888. Un intervalo de pH preferido para la composición de la presente invención es desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8 (por ejemplo, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 u 8), más preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 6,5. Dado que el pH es un factor significativo en la solubilidad del IVFT, el uso de un tampón para mantener el pH adecuado puede mejorar adicionalmente la estabilidad de las formulaciones. Por lo tanto, las composiciones acuosas de la presente invención pueden comprender adicionalmente un tampón para mantener el pH de la disolución. Preferiblemente, el tampón es un ácido sustancialmente libre de su forma salina, un ácido en su forma salina, o una mezcla de un ácido y su forma salina.

Preferiblemente, el pH de la composición se mantiene usando un agente solubilizante aminoacídico de arginina o lisina en su forma de base en combinación con un ácido sustancialmente libre de su forma salina. Dicha combinación mantiene una osmolaridad menor en la disolución que si se usara como tampón un ácido en su forma salina en combinación con una base aminoacídica. La ventaja de dicha combinación es que se puede incorporar una mayor concentración del agente solubilizante aminoacídico de arginina o lisina y/o de antioxidante (por ejemplo, metionina) en una composición acuosa sin exceder la isotonicidad de la disolución. Un “ácido sustancialmente libre de su forma salina” significa que un ácido que sirve como agente tamponante en la composición acuosa contiene típicamente menos de aproximadamente el 2% de sus formas salinas.

Típicamente, cuando se usa un tampón que comprende un ácido en una composición acuosa, se prepara usando una forma salina del ácido o una combinación del ácido y una forma salina de la base conjugada del ácido. Así, por ejemplo, el tampón puede prepararse usando el ácido con la sal sódica, potásica, amónica, cálcica y/o magnésica de su base conjugada. Cuando el tampón se elige para que comprenda la forma básica del agente solubilizante de arginina o lisina en combinación con un ácido sustancialmente libre de su forma salina, los tampones preferidos se eligen de entre el ácido cítrico, el ácido succínico, el ácido fosfórico, el ácido glutámico, el ácido maleico, el ácido málico, el ácido acético, el ácido tartárico y el ácido aspártico. El ácido cítrico y el ácido succínico son especialmente preferidos para su uso como tampón en combinación con arginina y lisina en su forma de base libre. Por otro lado, según se mencionó anteriormente, puede usarse la arginina en su forma salina, tal como la forma de sal de clorhidrato de arginina. En este caso, el tampón comprenderá generalmente una combinación de un ácido según se describió anteriormente, y una forma salina de su base conjugada. Otros tampones que pueden usarse incluyen histidina e imidazol. En conjunto, las concentraciones preferidas del tampón son desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 50 mM (por ejemplo, 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 mM); las concentraciones más preferidas son desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 30 mM.

Si el tampón usado es una base aminoacídica y un ácido sustancialmente libre de su forma salina, las composiciones que contienen IVFT o que contienen una variante del IVFT pueden prepararse de forma que sean sustancialmente isotónicas sin tener que incluir agentes isotonzantes adicionales, tal como cloruro sódico. Una composición que es sustancialmente isotónica sólo provoca un mínimo flujo de agua, o ninguno, a través de las membranas de las células circundantes tras su administración *in vivo*. En general, es deseable la isotonicidad de las composiciones acuosas, ya que reduce el dolor tras la administración y minimiza los potenciales efectos hemolíticos asociados con composiciones hipertónicas o hipotónicas. La condición isotónica se corresponde con una osmolaridad de la disolución desde aproximadamente 240 mOsmol/L hasta aproximadamente 340 mOsmol/L (por ejemplo, 240, 250, 260, 270; 280, 290, 300, 310, 320, 330 ó 340 mOsmol/L), que es preferible en la presente invención. Más preferiblemente, se consigue una condición sustancialmente isotónica a una osmolaridad de aproximadamente 290 mOsmol/L.

Sin embargo, en algunos casos, dependiendo de las propiedades deseadas de la composición de IVFT o de variante de IVFT (por ejemplo, pH y osmolaridad) que haya que mantener, el ácido usado como agente tamponante puede ser una forma salina del ácido o una mezcla del ácido y su forma salina. En este caso, un tampón preferido es una mezcla de un ácido y su forma salina. El ácido puede ser, por ejemplo, ácido cítrico, ácido succínico, ácido fosfórico, ácido glutámico, ácido maleico, ácido málico, ácido acético, ácido tartárico y ácido aspártico. La forma salina del ácido puede ser la sal sódica, potásica, cálcica o magnésica de su base conjugada. Los tampones especialmente preferidos son aquellos en los que la sal de la base conjugada está en la forma sódica. Dichos tampones incluyen ácido cítrico/citrato sódico, ácido succínico/succinato sódico, ácido fosfórico/fosfato sódico, ácido glutámico/glutamato sódico, ácido maleico/maleato sódico, ácido málico/malato sódico, ácido acético/acetato sódico, ácido tartárico/ tartrato sódico, y ácido aspártico/aspartato sódico. Cuando se usa arginina como agente solubilizante, incluso en su forma de base libre, un tampón preferido es ácido cítrico/citrato sódico o ácido succínico/succinato sódico. En este caso, la concentración del tampón es preferiblemente desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 30 mM (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25 ó 30 mM), más preferiblemente aproximadamente 20 mM.

Cuando se usa la combinación de una base aminoacídica tamponada por un ácido sustancialmente libre de su forma salina, son posibles unas formulaciones casi isotónicas, con unas concentraciones mayores de aminoácidos estabilizantes que las que se pueden conseguir con el uso de un sistema tamponante que sea una mezcla de un ácido y

su forma salina. Las mayores concentraciones del agente solubilizante asociado con las composiciones sustancialmente isotónicas en dichos casos también dan como resultado una mejor estabilidad del IVFT o de la variante del IVFT, y por tanto, un aumento en la vida de almacenamiento.

5 Por ejemplo, cuando se usa ácido cítrico para tamponar una base de arginina añadida a una formulación acuosa que comprende IVFT o una variante del IVFT y con un pH de 5,5, la concentración de arginina puede aumentarse hasta 300 mM manteniendo aún la isotonicidad de la formulación. Esto da como resultado en un incremento de casi el 35% en la vida de almacenamiento del IVFT o de la variante del IVFT a 50°C. Aunque puede conseguirse una vida de almacenamiento similar del IVFT o de la variante del IVFT usando la misma concentración de arginina y de ácido cítrico/citrato sódico como agentes tamponantes, debe añadirse arginina en su forma ácida para conseguir un pH similar, y la formulación resultante es hipertónica. La capacidad de usar mayores concentraciones de un aminoácido como agente estabilizante primario elimina la necesidad de más agentes solubilizantes tradicionales del IVFT o de la variante del IVFT, tales como la albúmina sérica bovina o la albúmina sérica humana, que son agentes estabilizantes menos deseables debido a su potencial contaminación vírica.

15 *Agentes estabilizantes adicionales*

Las composiciones de IVFT o de variante de IVFT pueden contener otros compuestos que incrementen la eficacia o promuevan las características deseables del IVFT o de la variante del IVFT, siempre que el efecto estabilizante primario conseguido con un agente solubilizante aminoacídico combinado con un antioxidante no se vea afectado negativamente. Por ejemplo, la degradación del polipéptido de IVFT o de variante de IVFT debida a la congelación y descongelación o a un cizallamiento mecánico durante el tratamiento de las composiciones de IVFT o de variante de IVFT de la presente invención, puede inhibirse incorporando tensioactivos en las mismas con objeto de disminuir la tensión superficial en la interfase en disolución-aire. Los tensioactivos adecuados son tensioactivos no iónicos, incluyendo ésteres de polioxietilensorbitol tales como polisorbato 80 (Tween 80) y polisorbato 20 (Tween 20); ésteres de polioxipropileno-polioxietileno tales como Pluronic F68; alcoholes de polioxietileno tales como Brij 35; simeticona; polietilenglicol tal como PEG400; lisofosfatidilcolina; y polioxietileno-p-t-octilfenol tal como Triton X-100. La estabilización clásica de productos farmacéuticos mediante tensioactivos o emulsificantes se describe en, por ejemplo, Levine y col. (1991) J. Parenteral Sci. Technol. 45 (3): 160-165. Un tensioactivo preferido empleado en la práctica de la presente invención es el polisorbato 80.

Opcionalmente pueden añadirse otros agentes estabilizantes, tales como la albúmina, para incrementar adicionalmente la estabilidad de las composiciones de IVFT o de variante de IVFT. La cantidad de albúmina puede añadirse a unas concentraciones de aproximadamente el 1% p/v o menos. También pueden incluirse azúcares o alcoholes de azúcares en las composiciones que contienen IVFT o que contienen variante de IVFT de la presente invención. Puede usarse cualquier azúcar, tal como un mono, di, o polisacárido, o un glucano soluble en agua (por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa sódica). La sacarosa es el aditivo de azúcar más preferido. Pueden usarse alcoholes de azúcares (es decir, hidrocarburos C₄-C₆ con un grupo -OH), por ejemplo, pueden usarse manitol, sorbitol, inositol, galacitol, dulcitol, xilitol o arabitól. El manitol es el aditivo de alcohol de azúcar más preferido. Los azúcares o los alcoholes de azúcar mencionados anteriormente pueden usarse individualmente o combinados. No hay un límite fijo en la cantidad usada, siempre que el azúcar o el alcohol de azúcar sean solubles en la preparación líquida y no afecten negativamente a los efectos estabilizantes conseguidos usando los procedimientos de la invención. Preferiblemente, la concentración del azúcar o del alcohol de azúcar está entre aproximadamente el 1% p/v y aproximadamente el 15% p/v, más preferiblemente entre aproximadamente el 2% p/v y aproximadamente el 10% p/v.

Preparación de composiciones estables

Las composiciones de la presente invención se preparan preferiblemente premezclando el agente solubilizante, el antioxidante, el tampón opcional y cualquier otro excipiente antes de la incorporación del IVFT o de la variante del IVFT. Tras la adición de una cantidad preferida de agente solubilizante y antioxidante para conseguir un aumento en la estabilidad del IVFT o de la variante del IVFT, puede ajustarse el pH de la composición, preferiblemente en un intervalo descrito en este documento que será óptimo para el IVFT o la variante del IVFT. Aunque el pH puede ajustarse tras la adición del IVFT o de la variante del IVFT, preferiblemente se ajusta antes de su adición, ya que esto reduce el riesgo de desnaturalización. Entonces pueden usarse los dispositivos mecánicos apropiados para conseguir una mezcla adecuada de los constituyentes.

Composiciones farmacéuticas

60 Preferiblemente, las composiciones acuosas de la presente invención están bien en una forma tal que puedan ser administradas a un sujeto, o bien están en una forma tal que puedan ser usadas para preparar una formulación que pueda ser administrada a un sujeto. Las composiciones acuosas que comprenden IVFT o variantes del IVFT pueden formularse en una dosis unitaria, y pueden estar en una forma inyectable o infundible tal como una disolución, una suspensión o una emulsión. Preferiblemente, una composición acuosa de la invención se almacena en la formulación acuosa para aprovechar el aumento de la estabilidad de almacenamiento conseguido según la presente invención y según se detalla a continuación. Las composiciones farmacéuticas de IVFT o de variante de IVFT se estabilizan preferiblemente mediante filtración a través de membrana, y se almacenan en recipientes unidos o multidosis, tales como viales o ampollas precintados. Dichas composiciones también pueden congelarse.

ES 2 321 297 T3

Los procedimientos adicionales para formular composiciones son generalmente conocidos en la materia y pueden usarse para incrementar adicionalmente la estabilidad de las composiciones farmacéuticas acuosas del IVFT o de una variante del IVFT, siempre que no afecten negativamente a los efectos beneficiosos de los agentes solubilizantes, antioxidantes y tamponantes descritos en este documento. Puede encontrarse una discusión exhaustiva de la formulación y selección de los vehículos farmacéuticamente aceptables, agentes solubilizantes, etc. en Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) (18ª ed., Mack Pub. Co., Eaton, Pennsylvania).

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación. Todas las patentes, solicitudes de patentes y referencias mencionadas en esta divulgación están incorporadas como referencia en su totalidad.

Parte experimental

Se usaron los siguientes protocolos en los Ejemplos 1-6, a continuación, para determinar el efecto de un agente solubilizante y/o antioxidante en particular sobre la degradación y la estabilidad durante el almacenamiento en composiciones acuosas de IVFT o de una variante de IVFT.

HPLC en fase reversa (RP)

Se realizó una RP-HPLC en un sistema Waters 626 LC equipado con un automuestreador 717 (Waters Corporation, Milford, Maine) usando una columna Vydac 214BTP54 C₄ y una precolumna Vydac 214GCC54 (Separations Group, Hesperia, California). Las columnas se equilibraron inicialmente con una fase móvil A (10% de acetonitrilo, 0,1% de TFA). Este procedimiento de RP-HPLC detecta las especies monoméricas de IVFT o de variantes del IVFT como un pico principal. Pueden resolverse otros picos que contienen residuos de metionina oxidada individuales y múltiples de esta proteína, así como picos que representan formas acetiladas y carbamiladas del IVFT o de la variante del IVFT.

HPLC de intercambio iónico (IEX- HPLC)

Se realizó una IEX-HPLC en una columna de vidrio de Pharmacia Moho-S HR 5/5 usando un sistema Waters 626 LC con un automuestreador 717 calentador/refrigerante según se describe en Chen y col., *supra*. La columna se equilibró con un 80% de fase móvil A (70:30 v/v, acetato sódico 20 mM:acetonitrilo a pH 5,4) y un 20% de fase móvil B (70:30 v/v, acetato sódico 20 mM y cloruro amónico 1 M:acetonitrilo a pH 5,4). Tras la inyección, el IVFT o la variante del IVFT se eluyó aumentando la fase móvil B al 85% en 21 minutos a una tasa de flujo de 0,7 ml/minuto. El IVFT o la variante del IVFT eluyó a aproximadamente 16,5 minutos como un único pico, y se detectó mediante absorbancia UV a 280 nm con un detector de absorbancia Waters 486. La adquisición y el tratamiento de los datos se realizaron con un sistema Perkin-Elmer Turbochrom. La concentración proteica se estimó integrando el área del pico y comparándola con una curva estándar generada a partir de las muestras de concentraciones conocidas.

Medidas de pH y osmolaridad

El pH de la disolución de las diversas formulaciones se midió mediante un pehachímetro de Orion (Modelo 611, Orion Research Incorporated Laboratory Products Group, Boston, Massachusetts). El pehachímetro fue calibrado mediante los procedimientos de calibración con dos tampones sugeridos por el fabricante usando un estándar a pH 4 (Fisher Scientific, n° de Cat SB101-500) y un estándar a pH 7 (Fisher Scientific, n° de Cat. SB107-500).

La osmolaridad de la disolución de estas formulaciones fue medida mediante un osmómetro de presión de vapor de Wescor (Modelo 5500, Wescor Inc., Logan, Utah). El osmómetro fue calibrado con los dos estándares suministrados por el fabricante: un estándar a 290 mmol/kg (Wescor, Reorder No. OA-010) y un estándar a 1.000 mmol/kg (Wescor, Reorder No. OA-029).

Otros materiales y procedimientos

La disolución tampón de la formulación fue preparada por Chiron Tech Service. Se obtuvieron viales tubulares de vidrio de diez cc de tipo-I y laminados Daikyo Gummi, con tapones no siliconizados, para su uso en los siguientes estudios.

Los niveles de oxígeno disuelto en los viales de IVFT o de variante de IVFT fueron determinados mediante Nova BioProfile 200. La estimación de la constante de aparente primer orden se realizó usando el programa informático KaleidaGraph® (Synergy Software, Reading Pennsylvania) para la oxidación del IVFT.

Ejemplo 1

Ensayos de tiempo de protrombina

Los ensayos adecuados para el tiempo de protrombina se describen en la patente de ee.uu. 5.888.968 y en el documento WO96/40784. En resumen, el tiempo de protrombina puede determinarse usando un coagulómetro (por ejemplo, Coag-A-Mate MTX II de Organon Teknika). Un tampón adecuado para el ensayo es NaCl 100 mM, Tris 50 mM ajustado a pH 7,5, que contiene 1 mg/ml de albúmina sérica bovina. Los reactivos adicionales requeridos son plasma humano normal (por ejemplo, "Verify 1" de Organon Teknika), reactivo de tromboplastina (por ejemplo,

ES 2 321 297 T3

“Simplastin Excel” de Organon Teknika), y disolución estándar de IVFT (por ejemplo, 20 μg de ala-IVFT 100% puro (o un equivalente del mismo) por ml de tampón de ensayo).

Se obtiene una curva estándar analizando el tiempo de coagulación de una serie de diluciones de una disolución estándar de IVFT, por ejemplo, hasta unas concentraciones finales que varían desde 1 hasta 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para la determinación del tiempo de coagulación, primero se diluye la muestra, o el estándar de IVFT, en tampón de ensayo. Después se añade el plasma humano normal. La reacción de coagulación es iniciada mediante la adición del reactivo trombo-plastina. Entonces el instrumento registra el tiempo de coagulación. Se obtiene una curva estándar lineal de IVFT a partir de una representación gráfica del log del tiempo de coagulación frente al log de la concentración de IVFT. La curva estándar se ajusta según la pureza del estándar de IVFT para que corresponda a la concentración equivalente de IVFT de un estándar 100% puro. Por ejemplo, si el estándar es una preparación de ala-IVFT que es un 97% bioquímicamente pura (es decir, contiene un 3% en peso de especies moleculares sin actividad biológica del IVFT), entonces la concentración de cada dilución del estándar es multiplicada por 0,97 para dar la concentración real de IVFT. Así, un estándar de IVFT que es de 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ basado en el peso real por ml de una preparación que es un 97% pura será equivalente a, y tratada como, una concentración de 1,0 x 0,97, ó 0,97 $\mu\text{g}/\text{ml}$. También son posibles otras medidas de la eficacia del IVFT para tratar la septicemia, así como otras diversas indicaciones, incluyendo dichas medidas, medidas tales como la reducción en la tasa de mortalidad a 28 días por cualquier causa, y la mejora en las puntuaciones de algunas disfunciones de múltiples órganos (MOD) con respecto a placebo.

20 Ejemplo 2

Efectos de la concentración de L-arginina sobre la estabilidad de ala-IVFT en varias composiciones

Se prepararon composiciones de Ala-IVFT con una concentración final 0,15 mg/ml de ala-IVFT a un pH de 5,5 a partir de disoluciones madre de 0,6 mg/ml cuyo tampón fue intercambiado mediante diálisis, analizado para averiguar las concentraciones resultantes de ala-IVFT usando espectroscopía de UV/Vis, y se diluyeron a la concentración objetivo de partida de 0,15 mg/ml usando un tampón de ácido cítrico, con o sin citrato sódico añadido. La adición del citrato sódico sólo se usó para aquellas muestras en las que el agente solubilizante L-arginina estaba presente como L-arginina HCl, mientras que se usó ácido cítrico solo para tamponar las composiciones que contenían L-arginina base.

Entonces estas disoluciones se alicuotaron (1 ml cada una) a viales de 3-cc para un almacenamiento estable. Se apartaron los viales suficientes para las medidas de concentración en el punto temporal de partida. El resto de los viales se colocaron en una estufa a 50°C para un estudio de estabilidad acelerada. El agente solubilizante y las concentraciones de tampón en las composiciones de las cuatro muestras, con 0,15 mg/ml de ala-IVFT a un pH de 5,5, se enumeran a continuación:

- 1) agente solubilizante L-arginina HCl 20-150 mM y tampón de ácido cítrico/citrato sódico 10 mM;
- 2) agente solubilizante L-arginina base 20-150 mM valorado a pH 5,5 con ácido cítrico;
- 3) agente solubilizante L-arginina HCl 100-300 mM y tampón de ácido cítrico/citrato sódico 10 mM; y
- 4) agente solubilizante L-arginina base 100-300 mM valorado a pH 5,5 con ácido cítrico.

A los 3, 7, 14 y 30 días, el contenido de cada vial fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml y a continuación se centrifugó a 10.000 rpm durante aproximadamente 2 minutos. Tras la centrifugación se separó la proteína soluble de la muestra de la proteína agregada/precipitada. La cantidad de proteína soluble fue determinada mediante el procedimiento de IEX-HPLC (Chen y col. (1999) J. Pharm. Sci. 88 (9): 881-888). Entonces se ajustaron los datos de concentración en función del tiempo de almacenamiento a un modelo de descomposición exponencial de primer orden ($Y = Y_0 e^{-kt}$) para calcular la semivida durante el almacenamiento de la proteína soluble restante usando el programa informático gráfico KaleidaGraph®.

Los valores de la semivida durante el almacenamiento ($t_{1/2}$) para las formulaciones de ala-IVFT están representados como una función de la concentración de L-arginina en la Fig. 1. Estos datos muestran un incremento en la semivida durante el almacenamiento de ala-IVFT con una concentración creciente de L-arginina. Usando el agente solubilizante L-arginina solo, las composiciones muestran un significativo incremento de la semivida durante el almacenamiento en comparación con las composiciones con poco o nada de agente solubilizante añadido.

60 Ejemplo 3

Cinética de degradación de las formulaciones de ala-IVFT

Una de las principales vías de degradación de ala-IVFT durante su almacenamiento a 2-8°C es la oxidación de los residuos de metionina. Las especies oxidativas de metionina pueden resolverse como especies de elución más temprana relativa a las especies del pico principal mediante el procedimiento de HPLC en fase reversa (RP-HPLC). La Fig. 6 es un cromatograma de RP-HPLC de una muestra de ala-IVFT, que muestra la resolución de las especies oxidadas. El pico A contiene múltiples especies de MetSO, el pico C contiene especies individuales de MetSO, el pico

ES 2 321 297 T3

D es material que contiene ala-IVFT sustituido con norvalina, los picos E y F son ala-IVFT acetilado y/o carbamilado. Las especies de los picos A y C se integraron por separado. El resto de las especies, incluyendo el pico principal y los picos D, E y F, fueron agrupados conjuntamente como las especies del pico principal.

5 Para comprender la cinética de degradación a 30°C, se prepararon muestras de 2 ml de ala-IVFT según se describe en el Ejemplo 2, que contenían cada una 0,15 mg/ml de IVFT, tampón de ácido cítrico/citrato sódico 20 mM y L-arginina 300 mM. Estas muestras se introdujeron en viales de vidrio de 10 cc (muestras de 2 ml en cada uno) y se incubaron a 30°C. Primero se examinó la pérdida de proteína soluble debido a la agregación/precipitación, ya que éste fenómeno daría como resultado una disminución en el área total del pico según la HPLC. Después de 8 semanas de almacenamiento a 30°C, las muestras de estabilidad mostraron una disminución del 2 al 5% en el área total del pico tanto por IEX-HPLC como por RP-HPLC, lo que indica una cantidad relativamente pequeña de agregación/precipitación de ala-IVFT usando la formulación anterior. Entonces se evaluó la degradación por oxidación de metionina representando gráficamente las principales especies del pico, las especies del pico A, y las especies del pico C mediante RP-HPLC como función del tiempo de almacenamiento a 30°C. Junto con el descenso en las especies del pico principal, estaba el aumento de las especies del pico C y las especies del pico A. Se formó aproximadamente un 11% y un 9% de especies oxidadas como especies de MetSO individual y MetSO múltiple, respectivamente, después de 8 semanas de almacenamiento. Esto sugiere que la oxidación de la metionina es una vía de degradación significativa en unas condiciones de almacenamiento estándar, según los procedimientos de detección disponibles. Los resultados, mostrados en la Tabla 1, también revelan que la formación de especies de MetSO aumenta con la temperatura.

TABLA 1

Efectos de la temperatura sobre la oxidación del Ala-IVFT

Temperatura	Área del pico de MetSO de Ala-IVFT (pico C) mediante RP-HPLC (%)	
	Material de partida	Después de 4 semanas
40°C	6,8	23,7
30°C	6,8	10,4
2-8°C	6,8	7,0

Ejemplo 4

40 *Efecto del oxígeno disuelto sobre la estabilidad del ala-IVFT*

Se prepararon muestras con la composición según se describe en el Ejemplo 3. Entonces se modificó el nivel de oxígeno disuelto purgando el espacio de cabeza del vial con una mezcla de gas desplazante de nitrógeno/aire a través de una instalación de fermentación. Cada muestra se tamponó a un pH de 5,5. Para facilitar el equilibrado del gas de desplazamiento entre el espacio de cabeza y el líquido, los viales se agitaron a 200 rpm durante una hora con purgado. Entonces los viales se mantuvieron a 30°C, y las muestras de ala IVFT se retiraron en los puntos temporales designados para los análisis de estabilidad. De nuevo se midió el nivel de oxígeno disuelto en cada vial en los puntos temporales para un análisis de estabilidad.

50 En un estudio preliminar inicial, se prepararon viales ala-IVFT con unos niveles de oxígeno disuelto que representaban el 0%, 20%, 100% y 200% de la saturación del aire (asumiendo un contenido en oxígeno del 21% en la condición de saturación del 100%). Los resultados de la evaluación de estabilidad a 30°C se muestran en la Fig. 2. Los resultados indican que la oxidación del ala-IVFT estaba sustancialmente inhibida cuando el nivel de oxígeno se reducía hasta prácticamente el 0% de saturación del aire, lo que significa que la atmósfera por encima del líquido era esencialmente la del gas desplazante de nitrógeno puro. La mejora en la estabilidad resultante de la disminución del oxígeno disuelto desde el 200% hasta el 20% de saturación del aire fue, como contraste, relativamente menor.

60 A continuación Entonces se realizó un segundo estudio para evaluar más específicamente el rendimiento de estabilidad de las muestras de ala-IVFT con un oxígeno disuelto que variaba desde el 0% hasta el 12% de saturación del aire. Se encontró un efecto sustancial sobre la estabilidad en este intervalo. La relación entre la semivida durante el almacenamiento a 30°C del ala-IVFT y el nivel de oxígeno disuelto se muestran en la Fig. 3. Se consiguió una mejora drástica en la estabilidad del ala-IVFT cuando el nivel de oxígeno en la muestra se reducía hasta por debajo del 5% de saturación de aire (contenido en oxígeno de aproximadamente el 1%). También se midió el nivel de oxígeno disuelto en los viales de muestra individuales en los puntos temporales correspondientes a los análisis de la concentración de ala-IVFT, y no se observó un cambio significativo en el nivel de oxígeno disuelto en los viales. Estos resultados muestran que el uso de un gas desplazante tal como nitrógeno para desplazar una cantidad suficiente de oxígeno puede mejorar drásticamente la estabilidad de almacenamiento del ala-IVFT si la concentración de oxígeno disuelto se

ES 2 321 297 T3

reduce hasta un nivel lo suficientemente bajo. Se estima por tanto que los gases desplazantes tales como el nitrógeno son antioxidantes, ya que inhiben la oxidación del ala-IVFT.

Ejemplo 5

5

Efectos de los quelantes de metales sobre la oxidación del ala-IVFT

Se diluyó una disolución principal de ala-IVFT a 10 mg/ml hasta 0,15 mg/ml con un tampón que contenía los quelantes de metales EDTA o DTPA a una concentración de 1 mM o de 4 mM. Estas composiciones también contenían ácido cítrico/citrato sódico 20 mM y L-arginina 300 mM como agente solubilizante. Las disoluciones diluidas de ala-IVFT se introdujeron en viales de vidrio de 10 cc (2 ml de muestra en cada uno) y se almacenaron a unas temperaturas bien de 2-8°C o bien de 30°C para los análisis de estabilidad.

Las curvas de estabilidad del área del pico principal restante a 30°C de temperatura de almacenamiento usando análisis mediante RP-HPLC se muestran en la Fig. 4. Los datos de semivida durante el almacenamiento obtenidos a partir de este estudio en unas condiciones tanto de 2-8°C como de 30°C se proporcionan en la Tabla 2, a continuación. La presencia de los quelantes de metales estabilizó el ala-IVFT de una forma dependiente de la concentración, lo que sugiere que la oxidación del residuo de metionina del ala-IVFT está catalizada por iones metálicos en disolución. Independientemente del mecanismo real, los quelantes de metales sirven para prevenir la oxidación del ala-IVFT y son, por lo tanto, eficaces como antioxidantes.

Ejemplo 6

25

Efecto de aminoácidos con metionina libre sobre la oxidación del ala-IVFT

La disolución principal de ala-IVFT a 10 mg/ml se diluyó hasta 0,15 mg/ml con un tampón que contenía metionina. Estas composiciones también contenían ácido cítrico/citrato sódico 20 mM y L-arginina 300 mM como agente solubilizante. Las disoluciones diluidas de ala-IVFT se introdujeron en viales de vidrio de 10 cc (2 ml de muestra en cada uno) y se almacenaron a unas temperaturas bien de 2-8°C o bien de 30°C para los ensayos de estabilidad.

30

Las curvas de estabilidad del área del pico principal restante a 30°C de temperatura de almacenamiento usando análisis mediante RP-HPLC se muestran en la Fig. 5. Los datos de semivida durante el almacenamiento obtenidos a partir de este estudio en unas condiciones tanto de 2-8°C como de 30°C se proporcionan en la Tabla 2, a continuación. Estos datos muestran que la oxidación del residuo de metionina del ala-IVFT está efectivamente inhibida por la inclusión de metionina de 2 a 10 mM en la composición. De hecho, a una temperatura de almacenamiento de 2-8°C, no se detectó siquiera una degradación oxidativa del ala-IVFT en presencia de metionina de 2 a 10 mM después de 6 meses de almacenamiento. De nuevo, la estabilidad de las composiciones de ala-IVFT que contienen agente solubilizante L-arginina mejora adicionalmente por el uso de un antioxidante, en este caso el captador de oxígeno metionina. Sin ceñirnos a ninguna teoría en particular, se cree que la metionina libre inhibe la oxidación del ala-IVFT proporcionando una metionina de "sacrificio", de forma que los residuos de metionina unidos a la proteína tienen menos probabilidad de verse afectados.

35

40

La oxidación de la metionina puede estar provocada por múltiples factores, incluyendo la presencia de iones metálicos, oxígeno disuelto y peróxido. Se han identificado muchos antioxidantes para la prevención de la oxidación de metionina en proteínas, tales como agentes quelantes, capturadores de oxígeno, agentes reductores y gases desplazantes. Los agentes quelantes se unen a los iones metálicos que catalizan las reacciones oxidativas. Los capturadores de oxígeno reaccionan con el oxígeno con una oxidación preferente, y protegen así a las proteínas eliminando la fuente de oxidación. Los agentes reductores alivian el efecto de los antioxidantes sobre la oxidación de las proteínas. Los gases desplazantes reducen la presión parcial del oxígeno en el espacio de cabeza, y consecuentemente, la concentración de oxígeno disuelto.

50

La eficacia de los agentes quelantes de metales, tales como los probados en el Ejemplo 4, y del captador de oxígeno metionina, para reducir la oxidación del ala-IVFT, están comparados en la Tabla 2. En comparación con la muestra de control (la formulación dada en el Ejemplo 3), que contenía 0,15 mg/ml de ala-IVFT, un tampón de ácido cítrico/citrato sódico 20 mM y L-arginina 300 mM, todos los antioxidantes incrementaron la semivida durante el almacenamiento del ala-IVFT. De entre todas las condiciones evaluadas, la inclusión de metionina 10 mM en la formulación de ala-IVFT mostró ser especialmente eficaz para estabilizar la proteína de ala-IVFT frente a la oxidación.

60

65

ES 2 321 297 T3

TABLA 2

Comparación de los efectos de los antioxidantes sobre la estabilidad del Ala-IVFT

5

10

15

20

25

30

35

Antioxidantes	Semivida durante el almacenamiento a 2-8°C (meses)	Semivida durante el almacenamiento a 30°C (meses)
Quelantes de metales (Ejemplo 4)		
EDTA 1 mM	63	25
EDTA 4 mM	157	28
DTPA 1 mM	52	11
DTPA 4 mM	160	23
Capturadores de oxígeno (Ejemplo 5)		
Metionina 2 mM		23
Metionina 5 mM	No se detectó degradación durante hasta seis meses de almacenamiento	24
Metionina 10 mM		39
Formulación de control		
Citrato 20 mM, arginina 300 mM, pH 5,5	36	5,3

Ejemplo 7

40

Efecto de la concentración de proteína ala-IVFT sobre la oxidación del ala-IVFT

45

Se examinó el efecto de la concentración de ala-IVFT sobre la oxidación de ala-IVFT para unas concentraciones de ala-IVFT que varían desde 0,15 mg/ml hasta 10 mg/ml. Las muestras de estabilidad se prepararon diluyendo una composición principal de ala-IVFT de 10 mg/ml hasta 3, 1, 0,6, 0,3 y 0,15 mg/ml con el tampón de ácido cítrico/citrato sódico 20 mM usado en el Ejemplo 3. Las muestras también contenían L-arginina 300 mM. Las muestras principales diluidas y sin diluir se introdujeron subsiguientemente en viales de vidrio 10-cc (2 ml de muestra en cada uno), se taponaron y se almacenaron bien a 2-8°C o bien a 30°C para la evaluación de la estabilidad.

50

55

Las curvas de estabilidad para el pico principal restante mediante RP-HPLC en ambas condiciones de temperatura, acelerada a 30°C y la condición de almacenamiento real de 2-8°C, muestran que la semivida durante el almacenamiento del ala-IVFT depende fuertemente de la concentración proteica con una relación inversa. Las semividas de estas curvas de estabilidad se enumeran en la Tabla 3. El grado de oxidación aumenta con menores concentraciones proteicas. Sin ceñirnos a ninguna teoría en particular, creemos que es posible que cualquier incremento en la tasa puede estar provocado por un aumento entre la proporción de oxidantes y moléculas proteicas en disolución.

60

65

ES 2 321 297 T3

TABLA 3

Semivida durante el almacenamiento del pico principal restante mediante RP-HPLC para el IVFT de fase 3 a diferentes concentraciones tras el almacenamiento bien a 30°C o bien a 2-8°C

Temperatura de almacenamiento	T _{1/2} (meses) durante el almacenamiento a una concentración de proteína de					
	10 (mg/ml)	3 (mg/ml)	1 (mg/ml)	0,6 (mg/ml)	0,3 (mg/ml)	0,15 (mg/ml)
30°C	22	28	9,3	8,5	6,4	5,6
2-8°C	195	157	98	85	59	44

5

10

15

20 Ejemplo 8

Estudios de supervivencia

25 Se realizó un estudio de punción y ligadura cecal murinas para comparar un lote recién preparado de calidad clínica de ala-IVFT recombinante (rIVFT) (IVFT 92) con material de calidad clínica que estaba parcialmente desamidado y (IVFT 78). Este modelo induce una infección polimicrobiana intraperitoneal y sistémica mediante una contaminación fecal directa y una necrosis cecal, simulando estrechamente una septicemia intraabdominal humana. Opal y col., Critical Care Medicine 29, 13-18, 2001.

30 Ambas preparaciones de IVFT se prepararon según se describe en las solicitudes con números de serie 60/494.546, depositado el 13 de agosto de 2003, 60/509.277 depositado el 8 de octubre de 2003, y 60/512.199, depositado el 20 de octubre de 2003. Estas solicitudes se incorporan por referencia en su totalidad. Se administró bien rIVFT 78, bien rIVFT 92 o bien diluyente de control en modo ciego durante 48 horas (SQ q12 horas x cuatro dosis). Antes y 48 horas después del procedimiento quirúrgico se extrajo sangre para determinar el nivel cuantitativo de, endotoxina y citocinas (factor de necrosis tumoral α e interleucina-6). Los animales se observaban diariamente y las muertes se registraban según se producían. Todos los animales se sometieron a una evaluación por necropsia para buscar pruebas histológicas de lesiones orgánicas y bacteriología cuantitativa al final del periodo experimental.

40 Las representaciones gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier están representadas en la Fig. 7. Hubo una ventaja de supervivencia significativa para los ratones que recibieron el rIVFT recién preparado en comparación con la forma del rIVFT parcialmente oxidada y desamidada. Ambos grupos de rIVFT fueron mejores que aquellos ratones que recibieron diluyente en el grupo de control. Como se esperaba, los ratones con una falsa operación (una intervención quirúrgica con identificación de ciego pero sin ligación ni punción) sobrevivieron al periodo de estudio de siete días. No hubo diferencias significativas en los criterios de valoración secundarios para bacteriemia, endotoxemia o producción de citocinas entre los dos grupos tratados con rIVFT.

45 Este estudio demuestra que el IVFT parece ofrecer una ventaja de supervivencia mediante un mecanismo no explicado por los niveles sanguíneos de bacterias, endotoxinas o citocinas. El IVFT desamidado y oxidado ofrece menos protección que el IVFT recién preparado.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa que comprende:

5 de aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 15 mg/ml de IVFT o de una variante del IVFT;
de aproximadamente 50 hasta aproximadamente 600 mM de arginina o un análogo de la misma; y
10 de aproximadamente 2 mM hasta aproximadamente 10 mM de metionina;

en la que la composición acuosa tiene un pH desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8.

2. La composición de la reivindicación 1 que comprende una variante del IVFT, en la que la variante del IVFT es homóloga en aproximadamente un 70% o más con el IVFT (SEQ ID NO: 1).

3. La composición de la reivindicación 2 en la que la variante del IVFT es ala-IVFT.

4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la arginina está en una forma elegida del grupo formado por una sal de clorhidrato, L-arginina, y una base libre.

5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende desde aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 400 mM de arginina o un análogo de la misma.

6. La composición de la reivindicación 5 que comprende aproximadamente 300 mM de arginina.

7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, con un porcentaje de estabilidad de agregación de aproximadamente el 45% o mayor, y un porcentaje de estabilidad de oxidación de aproximadamente el 45% o mayor.

8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la metionina es L-metionina.

9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene un pH desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 6,5.

10. La composición de la reivindicación 9, con un pH de aproximadamente 5,5.

11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene una osmolaridad de aproximadamente 240 mOsmol/L hasta aproximadamente 600 mOsmol/L.

12. La composición de la reivindicación 11 que tiene una osmolaridad de aproximadamente 290 mOsmol/L.

13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene una semivida durante el almacenamiento de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 24 meses a una temperatura de aproximadamente 30°C.

14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende adicionalmente un tampón elegido del grupo constituido por: (i) un ácido sustancialmente libre de su forma salina; (ii) un ácido en su forma salina; y (iii) una mezcla de un ácido y su forma salina.

15. La composición de la reivindicación 14, en la que dicho tampón comprende un ácido en su forma salina.

16. La composición de la reivindicación 15, en la que dicho tampón comprende citrato sódico.

17. La composición de la reivindicación 14 en la que el tampón es un ácido sustancialmente libre de su forma salina, y el ácido se elige del grupo constituido por ácido cítrico, ácido succínico, ácido fosfórico, ácido glutámico, ácido maleico, ácido málico, ácido acético, ácido tartárico y ácido aspártico.

18. La composición de la reivindicación 14 en la que el tampón comprende una mezcla de un ácido y su forma salina, en la que:

60 el ácido se elige del grupo constituido por ácido cítrico, ácido succínico, ácido fosfórico, ácido glutámico, ácido maleico, ácido málico, ácido acético, ácido tartárico y ácido aspártico; y

la forma salina del ácido se elige del grupo constituido por una sal sódica, potásica, cálcica y magnésica de una base conjugada del ácido.

65 19. La composición de la reivindicación 18 en la que el tampón se elige del grupo constituido por ácido cítrico/citrato sódico, ácido succínico/succinato sódico, ácido fosfórico/fosfato sódico, ácido glutámico/glutamato sódico,

ES 2 321 297 T3

ácido maleico/maleato sódico, ácido málico/malato sódico, ácido acético/acetato sódico, ácido tartárico/tartrato sódico y ácido aspártico/aspartato sódico.

5 20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 14-19 en la que el tampón tiene una concentración de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 30 mM.

21. La composición de la reivindicación 20, en la que el tampón tiene una concentración de aproximadamente 20 mM.

10 22. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes con una estabilidad de agregación porcentual desde aproximadamente el 45% hasta aproximadamente el 99%.

15 23. La composición de la reivindicación 22 en la que la estabilidad de agregación porcentual es aproximadamente el 60% hasta aproximadamente el 80%.

24. La composición de la reivindicación 22 en la que la estabilidad de agregación porcentual es aproximadamente el 70% hasta aproximadamente el 90%.

20 25. La composición de la reivindicación 24 en la que la estabilidad de agregación porcentual es aproximadamente el 80% hasta aproximadamente el 90%.

26. La composición de la reivindicación 22 en la que la estabilidad de agregación porcentual es aproximadamente el 45% hasta aproximadamente el 70%.

25 27. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes con una estabilidad de oxidación porcentual desde aproximadamente el 45% hasta aproximadamente el 99%.

30 28. La composición de la reivindicación 27 en la que la estabilidad de oxidación porcentual es aproximadamente el 60% hasta aproximadamente el 80%.

29. La composición de la reivindicación 27 en la que la estabilidad de oxidación porcentual es aproximadamente el 70% hasta aproximadamente el 90%.

35 30. La composición de la reivindicación 29 en la que la estabilidad de oxidación porcentual es aproximadamente 80% hasta aproximadamente 90%.

31. La composición de la reivindicación 27 en la que la estabilidad de oxidación porcentual es aproximadamente el 45% hasta aproximadamente el 70%.

40 32. Una composición farmacéutica, que comprende:

la composición acuosa de cualquiera de las reivindicaciones precedentes; y

un excipiente farmacéuticamente aceptable.

45 33. La composición farmacéutica de la reivindicación 32 con una estabilidad de agregación porcentual desde aproximadamente el 45% hasta aproximadamente el 99%.

50 34. La composición farmacéutica de la reivindicación 32 con una estabilidad de oxidación porcentual desde aproximadamente el 45% hasta aproximadamente el 99%.

35. La composición de la reivindicación 1, que comprende desde aproximadamente 0,15 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml de IVFT o de variante de IVFT.

55 36. La composición de la reivindicación 35, que comprende aproximadamente 0,15 mg/ml de IVFT o de variante de IVFT.

37. La composición de la reivindicación 35, que comprende aproximadamente 0,5 mg/ml de IVFT o de variante de IVFT.

60 38. La composición de la reivindicación 1, en la que la metionina está presente en una concentración de 5 mM.

39. La composición de la reivindicación 1, que comprende:

65 0,15 mg/ml de ala-IVFT;

300 mM de L-arginina;

ES 2 321 297 T3

5 mM de metionina; y

20 mM de ácido cítrico/citrato sódico;

5 en la que la composición acuosa tiene un pH de 5,5.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

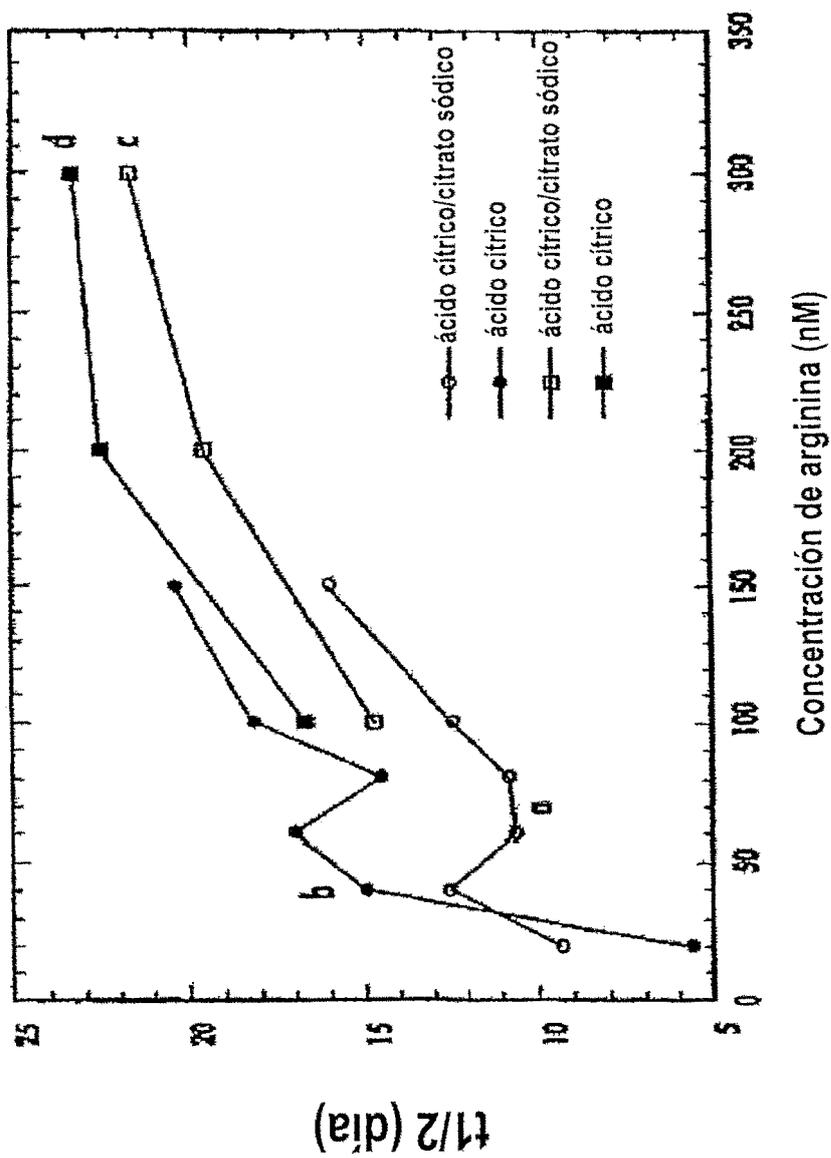
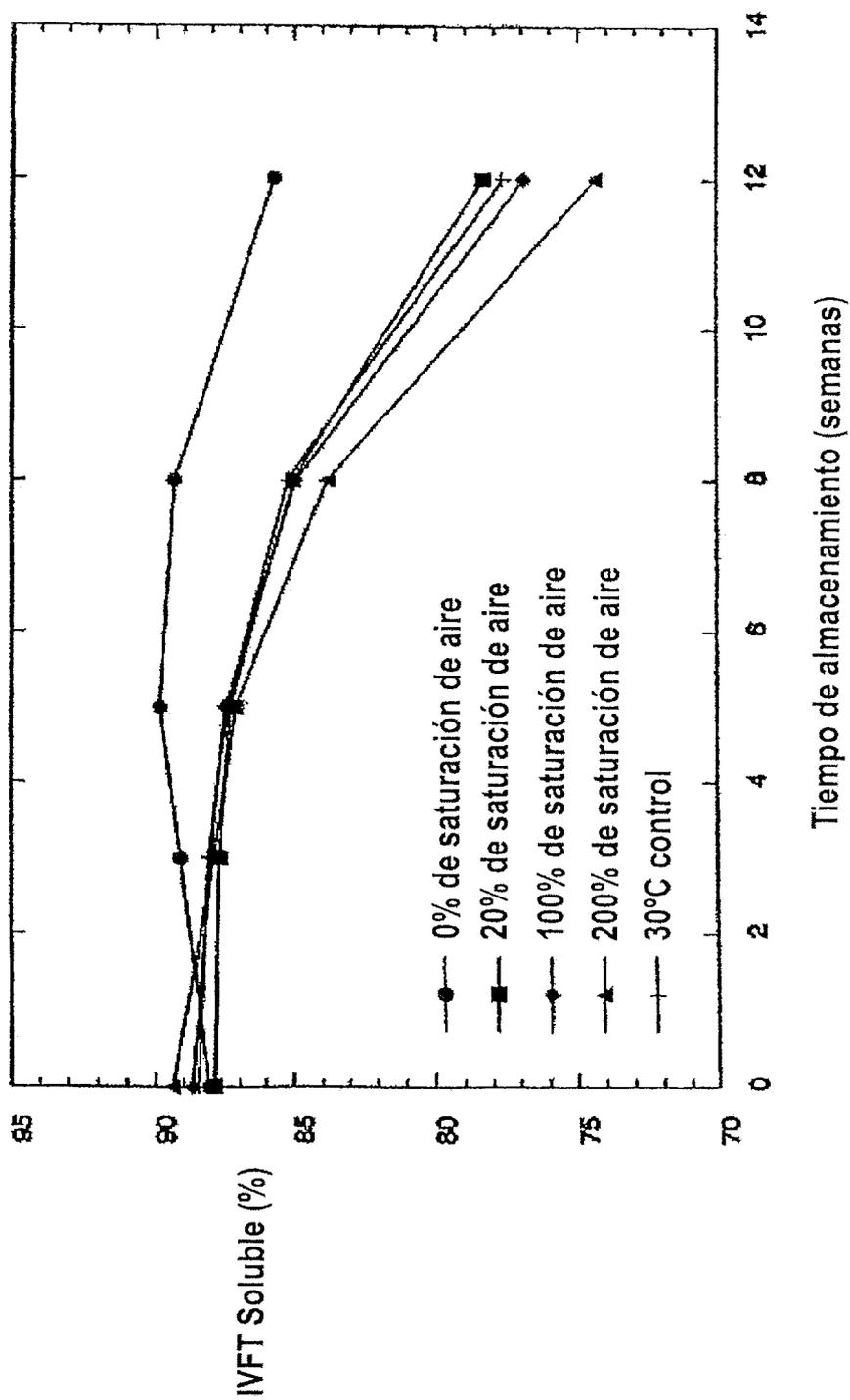


FIG. 1

FIG. 2



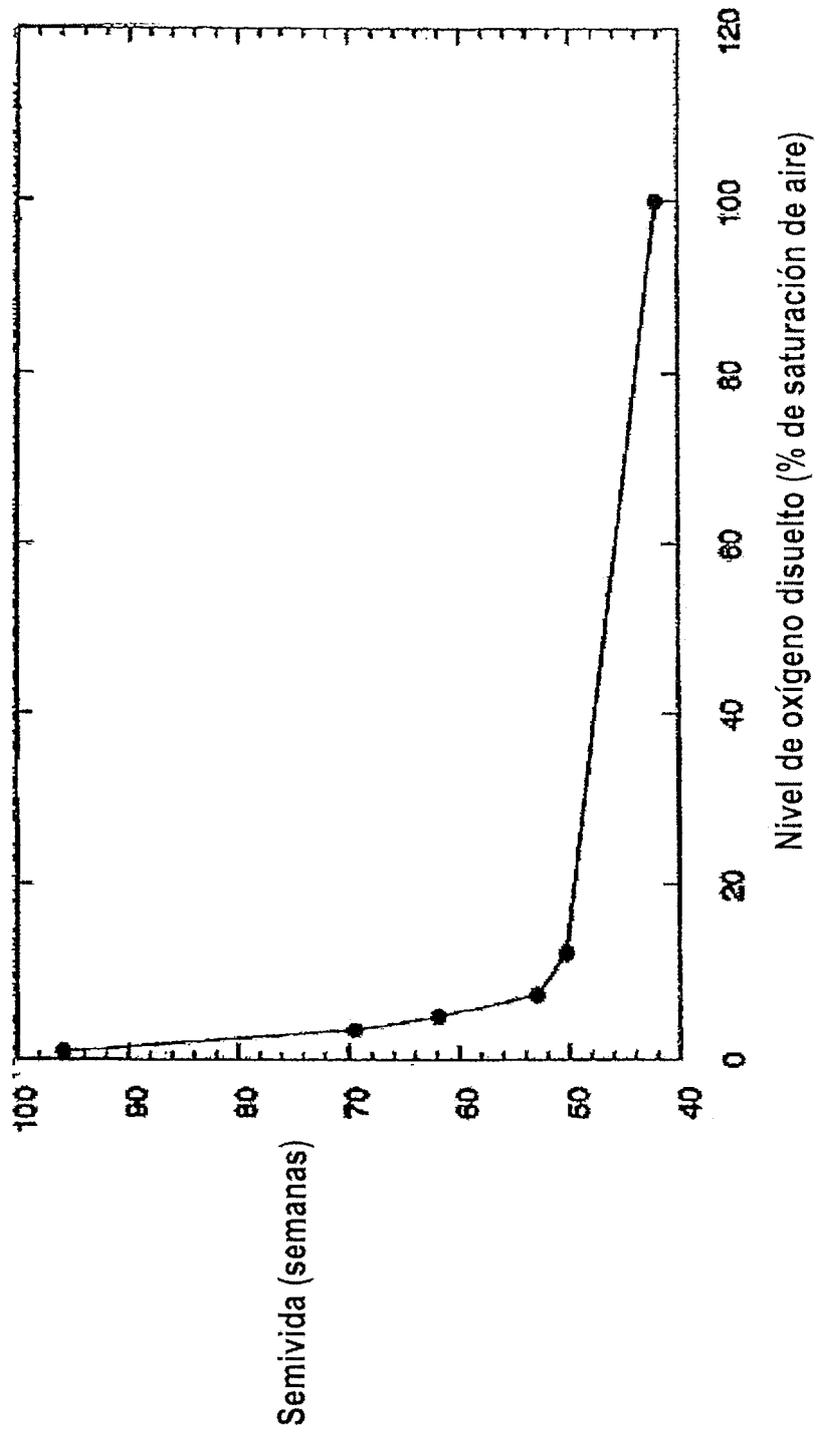


FIG. 3

Fig. 4

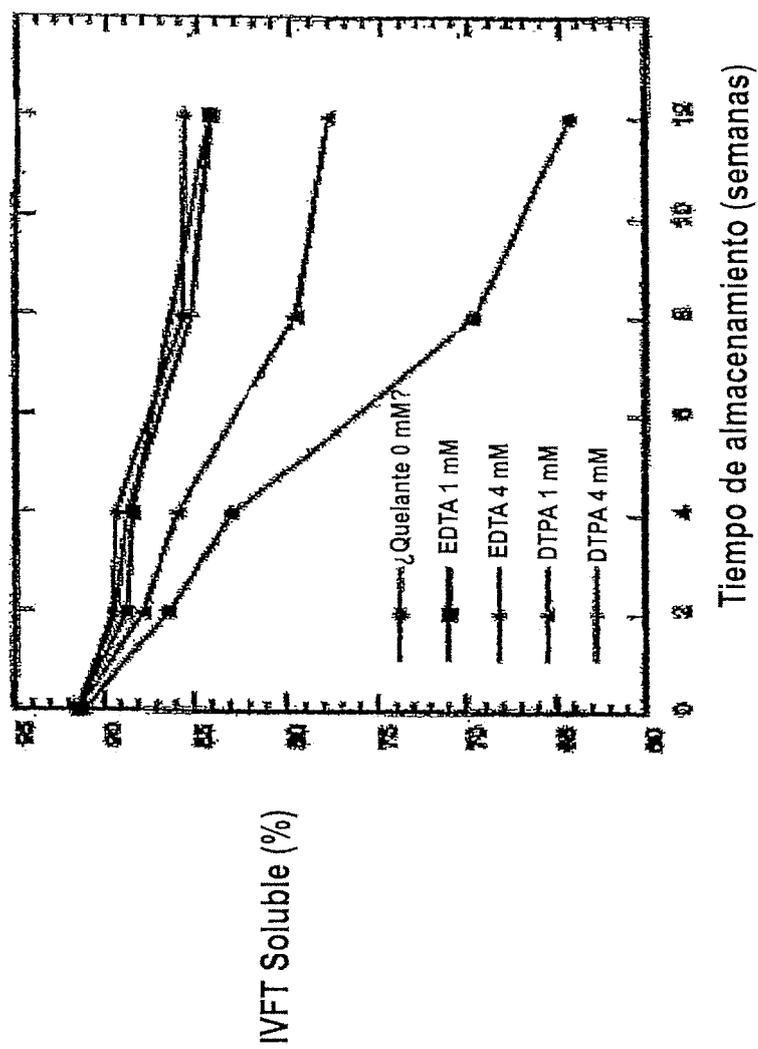
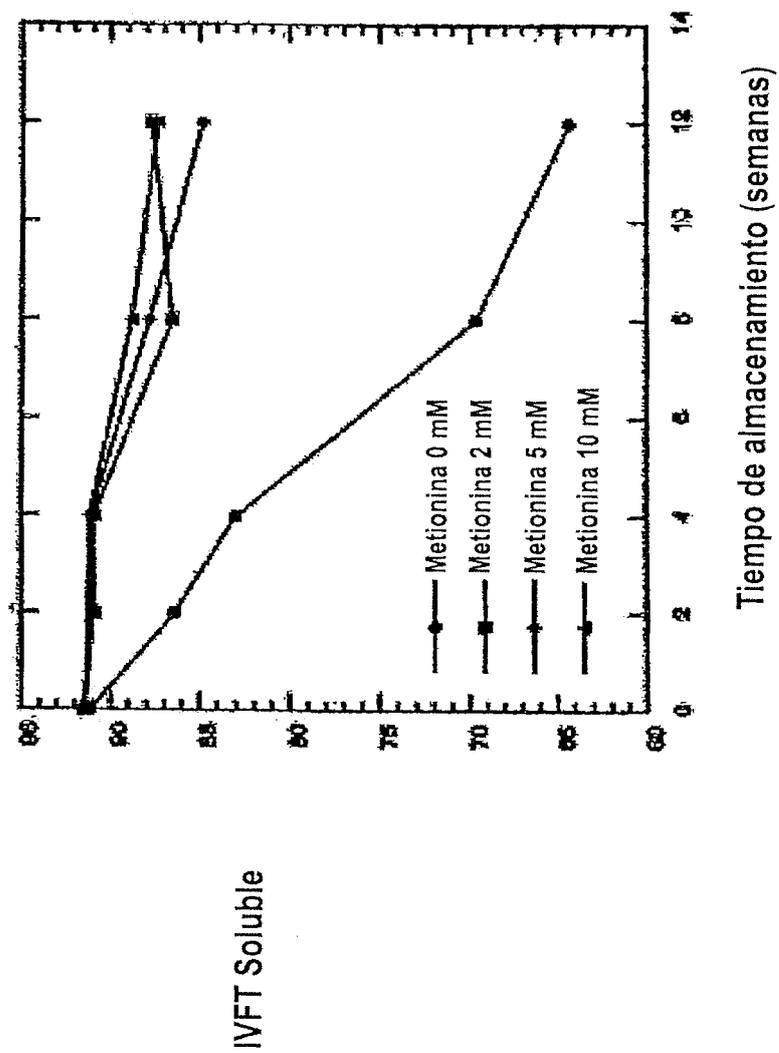


FIG. 5



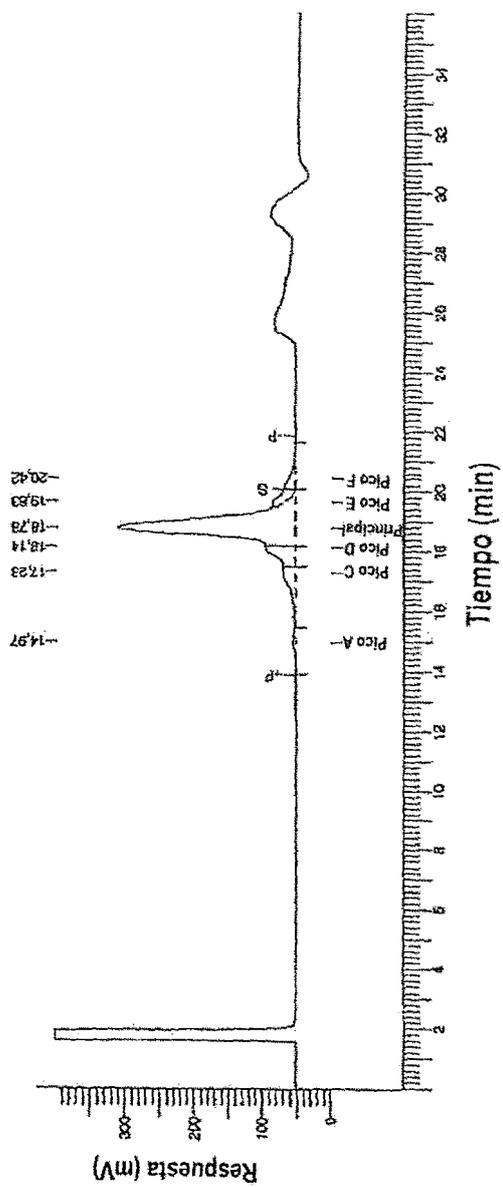
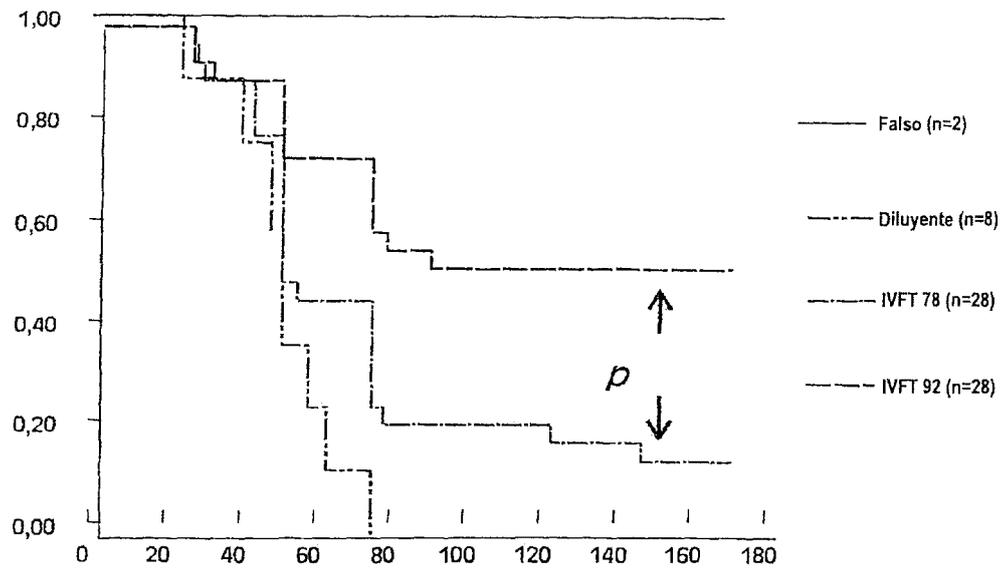


FIG. 6

FIG. 7



ES 2 321 297 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Chen, Bao-Lu Huang, Chin-Yi

5 <120> Composiciones Estabilizadas Que Comprenden La Proteína Inhibidor De La Vía Del Factor Tisular O Proteínas Variantes Del Inhibidor De La Vía Del Factor Tisular

<130> 12441.00054

10

<150> US 60/438.519

<151> 2003-01-08

15 <150> US60/474.577

<151> 2003-08-13

<150> US60/509.260

20

<151> 2003-10-08

<150> US60/512.090

<151> 2003-10-20

25

<160> 1

<170> Patentin versión 3.1

<210> 1

30

<211> 276

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 321 297 T3

<400> 1

Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu
 1 5 10 15
 Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp
 20 25 30
 Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
 35 40 45
 Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn
 50 55 60
 Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn
 65 70 75 80
 Ala Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe
 85 90 95
 Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg
 100 105 110
 Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly
 115 120 125
 Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys
 130 135 140
 Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly
 145 150 155 160
 Thr Gln Leu Asn Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys
 165 170 175
 Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
 180 185 190
 Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn
 195 200 205
 Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly
 210 215 220
 Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys
 225 230 235 240
 Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys
 245 250 255
 Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe
 260 265 270
 Val Lys Asn Met
 275