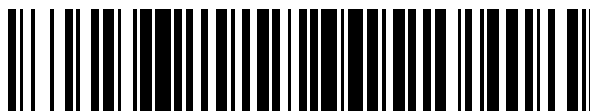


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 890**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/14** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2008 E 08864646 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 2222315**

54 Título: **Formulaciones estabilizadas de factor IX que contienen trehalosa**

30 Prioridad:

**21.12.2007 US 16230 P**

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

**04.11.2013**

73 Titular/es:

**CANGENE CORPORATION (100.0%)  
115 Innovation Drive  
Winnipeg, Manitoba R3T 5Y3, CA**

72 Inventor/es:

**MANKARIOUS, SAMIA y  
GRIFFITH, MICHAEL J.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 427 890 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

Formulaciones estabilizadas de factor IX que contienen trehalosa

### Solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reclama prioridad sobre la solicitud provisional de EE.UU. Nº 61/016.230 presentada el 21 de diciembre de 2007.

### Partes del acuerdo de investigación conjunto

Este trabajo se produjo como resultado de un acuerdo de investigación entre Inspiration Biopharmaceuticals, Inc. e ICOS Corp.

### Antecedentes de la invención

#### 10 Campo de la invención

Las realizaciones de la invención se refieren a la estabilización de la estructura y de la actividad proteica durante la liofilización y el almacenamiento, en particular a la estabilización de los factores de coagulación sanguínea tales como el factor IX.

### Descripción de la técnica relacionada

15 El factor IX es una glucoproteína monocatenaria que participa en la vía de la coagulación. El factor IX es una molécula estructuralmente compleja que contiene un péptido señal en el extremo amino y una secuencia líder prepro (las cuales son escindidas antes de la secreción del factor a la circulación), así como un dominio Gla responsable de la unión del  $\text{Ca}^{2+}$ . El calcio desempeña un papel importante en la función del factor IX a través de su unión que provoca un cambio conformacional en la proteína necesario para la actividad de coagulación. La unión del calcio  
20 tiene como resultado la exposición de sitios de unión hidrofóbicos previamente enterrados que facilitan la unión a los fosfolípidos para una coagulación eficiente. El mantenimiento de la propiedad de la unión al calcio del factor IX es necesario para producir una proteína activa. Una vez que se ha escindido el péptido de activación, el factor IX monocatenario se convierte en el factor IXa activado por enzima, una glicoproteína bicatenaria unida a través de un puente disulfuro intercatenario. Adicionalmente, la molécula contiene muchos sitios de glucosilación unidos a N y a  
25 O. La deficiencia del factor IX tiene como resultado la hemofilia B, para la que actualmente se dispone de varios tratamientos, incluidos BeneFIX®, una versión recombinante del factor IX, y Mononine®, que deriva de plasma humano.

La formulación de Mononine® consiste en histidina, manitol, cloruro sódico y polisorbato 80. Estos son principalmente excipientes que se sabe que exhiben transiciones eutécticas (acontecimientos de cristalización)  
30 durante la congelación. No obstante, la formulación de Mononine® no contiene crioprotector ni estabilizante, solo agente tampón, agente espesante, tonificante y tensioactivo. En consecuencia, durante la congelación, la liofilización y el posterior almacenamiento, la proteína está relativamente sin proteger físicamente de los efectos desnaturizantes debidos a la exposición al hielo, al agua y al aire. El problema técnico que se aborda en el presente documento es una formulación mejorada del factor IX con mejor estabilidad durante la congelación, la liofilización y el almacenamiento. Los presentes inventores han descubierto que la inclusión de trehalosa en la  
35 composición del factor IX durante la congelación, la liofilización y el almacenamiento estabilizaba la capacidad de unión al calcio del factor IX y mantenían la actividad biológica de la proteína purificada.

### Sumario de la invención

40 Las realizaciones de la invención están dirigidas a composiciones liofilizadas que incluyen factor IX y trehalosa, en las que la trehalosa está presente en una cantidad del 0,5 al 3 % en volumen de modo que durante la liofilización y el almacenamiento durante 6 meses a 25 °C, está presente más del 90 % de la propiedad de unión al calcio del factor IX.

Preferentemente, la trehalosa está presente en una cantidad del 1 al 2 % en volumen.

45 En algunas realizaciones preferidas, la composición incluye histidina como agente tampón. En algunas realizaciones preferidas, la composición incluye manitol. En algunas realizaciones preferidas, la composición incluye cloruro sódico. En algunas realizaciones preferidas, la composición incluye polisorbato 80.

En unas realizaciones más preferidas, las composiciones incluyen factor IX y trehalosa, y, adicionalmente, incluyen histidina a una concentración de 5 a 20 mM, manitol a una concentración de 2 a 5 % en volumen, cloruro sódico a una concentración de 50 a 80 mM y polisorbato 80 a una concentración del 0,001 al 0,005 % en volumen.

50 Las realizaciones de la invención están dirigidas a procedimientos para preparar una composición desecada estable de factor IX mezclando una solución que contiene factor IX con del 0,5 al 3 % en volumen de trehalosa para obtener una solución crioprotectora y desecando por congelación la solución crioprotectora para obtener una composición

desechada estable de factor IX, en la que la composición desecada de factor IX conserva más del 90 % de la actividad de unión al calcio cuando se almacena durante 6 meses a 25 °C.

Preferentemente, la trehalosa está presente en una cantidad del 1 al 2 % en volumen.

5 En algunas realizaciones preferidas, la solución incluye histidina como agente tampón. En algunas realizaciones preferidas, la solución incluye manitol. En algunas realizaciones preferidas, la solución incluye cloruro sódico. En algunas realizaciones preferidas, la solución incluye polisorbato 80.

En unas realizaciones más preferidas, la solución incluye factor IX y trehalosa, y, adicionalmente, incluye histidina a una concentración de 5 a 20 mM, manitol a una concentración del 2 al 5 % en volumen, cloruro sódico a una concentración de 50 a 80 mM, y polisorbato 80 a una concentración del 0,001 al 0,005 % en volumen.

10 Preferentemente, la desecación por congelación incluye una etapa de templado.

Las realizaciones de la invención están dirigidas a procedimientos de liofilizar una formulación farmacéutica que incluye factor IX y trehalosa mediante un procedimiento que incluye una o más de las etapas siguientes:

- 15 (a) congelar la formulación farmacéutica que contiene factor IX y de 0,5 a 3 % en volumen de trehalosa a una temperatura de -40 °C o menos;
- (b) templar la formulación farmacéutica a entre aproximadamente -20 °C y -35 °C;
- (c) disminuir la temperatura de la formulación farmacéutica a -40 °C o menos;
- (d) desecar la formulación farmacéutica en una primera etapa de desecación a 5 °C a 20 °C a presión reducida;
- 20 y
- (e) desecar la formulación farmacéutica en una segunda etapa de desecación a 45 °C a 55 °C a presión reducida.

Preferentemente, la formulación farmacéutica también incluye histidina a una concentración de 5 a 20 mM, manitol a una concentración del 2 al 5 % en volumen, cloruro sódico a una concentración de 50 a 80 mM, y polisorbato 80 a una concentración del 0,001 al 0,005 % en volumen.

25 Otros aspectos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas.

### **Breve descripción de las figuras**

A continuación se describirán estas y otras características de de la presente invención con referencia a las figuras de realizaciones preferidas.

30 La Figura 1 muestra la estabilidad del factor IX a 40 °C/HR del 75 %. "■" indica 0,4 mg/ml de la proteína factor IX en histidina 10 mM, 3 % de manitol, NaCl 66 mM, 0,0075 % de polisorbato 80, pH 6,8 (R1). "•" indica 0,4 mg/ml de la proteína factor IX en histidina 10 mM, 3 % de manitol, NaCl 66 mM, 0,0075 % de polisorbato 80, pH 6,8 con 1 % de trehalosa (R2).

35 La Figura 2 muestra el perfil de elución SE-HPLC de las composiciones de factor IX después de almacenar durante 12 semanas. La Figura 2A muestra 0,4 mg/ml de la proteína factor IX en histidina 10 mM, 3 % de manitol, NaCl 66 mM y 0,0075 % de polisorbato 80, pH 6,8 (R1). La Figura 2B muestra 0,4 mg/ml de la proteína factor IX en histidina 10 mM, 3 % de manitol, NaCl 66 mM, 0,0075 % de polisorbato 80, pH 6,8 con 1 % de trehalosa (R2).

40 La Figura 3 muestra el perfil de elución SE-HPLC (calcio) del factor IX después de almacenar durante 12 semanas. La Figura 3A muestra 0,4 mg/ml de la proteína factor IX en histidina 10 mM, 3 % de manitol, NaCl 66 mM y 0,0075 % de polisorbato 80, pH 6,8 (R1). La Figura 3B muestra 0,4 mg/ml de la proteína factor IX en histidina 10 mM, 3 % de manitol, NaCl 66 mM, 0,0075 % de polisorbato 80, pH 6,8 con 1 % de trehalosa (R2).

La Figura 4 muestra la estabilidad de la unión al calcio del factor IX a 40 °C/HR del 75 %. "■" indica 0,4 mg/ml de la proteína factor IX en histidina 10 mM, 3 % de manitol, NaCl 66 mM, 0,0075 % de polisorbato 80, pH 6,8 (R1). "•" indica 0,4 mg/ml de la proteína factor IX en histidina 10 mM, 3 % de manitol, NaCl 66 mM, 0,0075 % de polisorbato 80, pH 6,8 con 1 % de trehalosa (R2).

45 La Figura 5 muestra el análisis en SDS-PAGE de las formulaciones de factor IX después de almacenar durante 12 semanas en condiciones no reductoras (A) y reductoras (B). Panel A: Calle 1, blanco; calle 2, marcadores; calle 3, patrón de referencia del factor IX (Mononine®); calle 4, 0,4 mg/ml, R1, lio-20 °C; calle 5, 0,4 mg/ml, R2, lio-20 °C; calle 6, 0,4 mg/ml, R1, lio 2-8 °C; calle 7, 0,4 mg/ml, R2, lio 2-8 °C; calle 8, 0,4 mg/ml, R1, lio 25 °C; calle 9, 0,4 mg/ml, R2, lio 25 °C; calle 10, 0,4 mg/ml, R1, lio 40 °C; calle 11, ,4 mg/ml, R2, lio 40 °C; calle 12, marcadores. Panel  
50 B: calles 1 y 2, marcadores; calle 3, patrón de referencia del factor IX (Mononine®); calle 4, 0,4 mg/ml, R1, lio-20 °C; calle 5, 0,4 mg/ml, R2, lio-20 °C; calle 6, 0,4 mg/ml, R1, lio 2-8 °C; calle 7, 0,4 mg/ml, R2, lio 2-8 °C; calle 8, 0,4 mg/ml, R1, lio 25 °C; calle 9, 0,4 mg/ml, R2, lio 25 °C; calle 10, 0,4 mg/ml, R1, lio 40 °C; calle 11, ,4 mg/ml, R2, lio 40 °C; calle 12, marcadores.

La Figura 6 muestra el perfil de elución mediante HPLC de intercambio aniónico de las composiciones de factor IX después de almacenar durante 12 semanas. La Figura 6A muestra 0,4 mg/ml de la proteína factor IX en histidina 10 mM, 3 % de manitol, NaCl 66 mM y 0,0075 % de polisorbato 80, pH 6,8 (R1). La Figura 6B muestra 0,4 mg/ml de la proteína factor IX en histidina 10 mM, 3 % de manitol, NaCl 66 mM, 0,0075 % de polisorbato 80, pH 6,8 con 1 % de trehalosa (R2).

#### **Descripción detallada de la realización preferida**

Las realizaciones de la invención están dirigidas a procedimientos de liofilizar el factor IX en presencia de trehalosa y a formulaciones de factor IX que contienen trehalosa. Las formulaciones de factor IX se evaluaron con y sin la adición de trehalosa, un crioprotector que no cristaliza durante el proceso de liofilización. La trehalosa persiste como concentrado que sufre transición vítrea con congelación a temperaturas más bajas. Por tanto, la proteína se preserva en presencia de trehalosa, se conserva en un estado amorfo mixto y es estabilizada mediante congelación y desecación por congelación. La trehalosa mejoró la estabilidad y previno la agregación de la proteína factor IX almacenada. Sorprendentemente, también se descubrió que la inclusión de trehalosa en la formulación mejoraba significativamente la conservación del cambio conformacional inducido por calcio requerido para la actividad del factor IX. La aparente pérdida de la capacidad de unión al calcio se correlacionó con la pérdida de potencia. Esta pérdida de la capacidad de unión al calcio y de potencia estaba considerablemente retrasada en las formulaciones que incluían trehalosa.

En realizaciones preferidas, se conserva al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 70 %, todavía más preferentemente al menos el 80 %, todavía más preferentemente al menos el 90 % de la capacidad de unión al calcio del factor IX mediante la inclusión de trehalosa en la composición de factor IX durante la congelación, la liofilización y el almacenamiento. Preferentemente, la trehalosa está presente en una cantidad suficiente para conservar más del 90 % de la propiedad de unión al calcio del factor IX durante la congelación, la liofilización y el almacenamiento durante al menos tres meses a 25 °C, más preferentemente al menos 6 meses a 25 °C y todavía más preferentemente al menos 1 año a 25 °C.

#### **Componentes de la formulación**

En realizaciones preferidas, las composiciones del factor IX de la presente invención incluyen un agente tampón, un agente espesante, un tonificante, un tensioactivo y un crioprotector/estabilizante. En algunas realizaciones, también se pueden incluir otros excipientes. Estas composiciones maximizan la estabilidad del factor IX en preparaciones liofilizadas y también en el estado líquido.

En realizaciones preferidas, en la composición se incluye un agente tampón. Preferentemente, el pH deberá mantenerse en el intervalo de entre 6 y 8 durante la liofilización y el almacenamiento, y, más preferentemente, a un pH de aproximadamente 6,8. El agente tampón puede ser cualquier entidad química fisiológicamente aceptable o combinación de entidades químicas que tienen la capacidad de actuar como tampones, incluyendo histidina, tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), 1,3-bis-[tris-(hidroxi-metil)metilamino]-propano (BIS-Tris Propano), piperazina-N,N'-bis-(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS), ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) y ácido N-2-acetamido-2-aminoetanosulfónico (ACES). Normalmente, el agente tampón está incluido a una concentración de 5-20 mM. En una realización más preferida, el agente tampón es histidina a una concentración de aproximadamente 10 mM. Agentes espesantes son las entidades químicas que proporcionan estructura a la "torta" o masa sólida residual de una preparación farmacéutica después de que se ha liofilizado y que la protegen contra el colapso. Los agentes espesantes usados en las presentes formulaciones se seleccionan del grupo en el que se incluyen, entre otros, manitol, glicina y alanina. El manitol, la glicina o la alanina están presentes en una cantidad del 1-10 %, preferentemente del 2-5 % y más preferentemente de aproximadamente el 3 %.

En las presentes formulaciones se incluye cloruro sódico en una cantidad de 30-100 mM, preferentemente de 50-80 mM y, más preferentemente, de aproximadamente 66 mM.

En realizaciones preferidas, las composiciones de factor IX incluyen un tensioactivo, preferentemente en una cantidad del 0,1 % o menos y, más preferentemente, en una cantidad del 0,001-0,005 %. Por ejemplo, el tensioactivo puede seleccionarse del grupo que incluye, entre otros, polisorbato 20, polisorbato 80, polioles plurónicos y BRIJ 35 (lauriléter de polioxietileno 23). Se dispone de varias calidades de polioles plurónicos (comercializados con la marca PLURONIC, fabricada por BASF Wyandotte Corporation). Estos polioles, de varios pesos moleculares (desde 1.000 a más de 16.000) y propiedades fisicoquímicas se han usado como tensioactivos. PLURONIC F-38, de un peso molecular de 5.000 y PLURONIC F-68, de un peso molecular de 9.000, contienen (en peso) 80 por ciento de grupos de polioxietileno hidrófilo y 20 por ciento de grupos de polioxipropileno hidrófobos. En realizaciones preferidas, se incluye polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,0075 %.

Preferentemente, en las formulaciones de la presente invención se usa un agente estabilizante. El estabilizante se selecciona del grupo que incluye sacarosa, trehalosa, rafinosa y arginina. Estos agentes están presentes en las formulaciones de la presente invención en una cantidad de entre 0,5-3 %, preferentemente del 1-2 %, más preferentemente de aproximadamente el 1 %. En una realización muy preferida, en la composición se incluye

trehalosa en una concentración del 1 %.

En realizaciones preferidas, el factor IX usado en las presentes composiciones es factor IX derivado de plasma humano altamente purificado o, más preferentemente, puede ser el factor IX producido de forma recombinante. El factor IX recombinante puede producirse en células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con un vector portador de una secuencia de ADN que codifica la molécula del factor IX. Procedimientos para crear dichas células de CHO transfectadas se describen en, entre otros, la patente de EE.UU. N° 4.757.006 de Toole, Jr., aunque el la técnica también se conocen procedimientos alternativos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.868.112, también de Toole, Jr., y la solicitud internacional de PCT WO-A-91/09122).

Aunque las composiciones de factor IX descritas en la presente solicitud se pueden liofilizar y reconstituir en las concentraciones indicadas, un experto en la técnica entenderá que estas preparaciones también se pueden reconstituir en forma más diluida. Por ejemplo, una preparación de acuerdo con la presente invención que se liofiliza y/o reconstituye normalmente en 2 ml de disolución también se puede reconstituir en un volumen mayor del diluyente, tal como 5 ml. Esto es particularmente adecuado cuando la preparación del factor IX se está inyectando en un paciente inmediatamente, ya que, en este caso, es menos probable que el factor IX pierda actividad, lo que se puede producir con más rapidez en las soluciones más diluidas de factor IX.

### Ejemplos

El factor IX recombinante se preparó en células de ovario de hámster chino transfectadas con ADNc que codifica el factor IX humano. El factor IX se purificó en medio acondicionado usando un procedimiento que incluye cromatografía de intercambio aniónico y catiónico para separar el producto deseado de los componentes del medio, incluidas las proteínas y el ADN de las células huésped.

La liofilización se llevó a cabo por medios conocidos en la técnica. Información sobre la liofilización se puede encontrar en Carpenter, J. F. y Chang, B. S., *Lyophilization of Protein Pharmaceuticals, Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing and Preservation*, K. E. Avis y V. L. Wu, eds. (Buffalo Grove, Ill.: Interpharm Press, Inc.), pág. 199-264 (1996). En el contexto de la presente invención, los términos “deseccación por congelación” y “liofilización” se usan de forma intercambiable para incluir todas las etapas para concentrar la muestra, incluidas las etapas de templado y desecación. En realizaciones preferidas, la liofilización incluye 1-3 etapas de templado. En realizaciones preferidas, la liofilización se lleva a cabo con una etapa de templado. El término “templar” indica una etapa en el procedimiento de liofilización de una preparación farmacéutica que sufre liofilización, antes de la desecación por congelación de la preparación, en la que la temperatura de la preparación se eleva desde una temperatura menor a una temperatura mayor y, después, se enfría de nuevo tras un periodo de tiempo. Las etapas de desecación se llevan a cabo a presión reducida, normalmente en el intervalo de 0,05 kPa a 0,03 kPa.

A continuación se proporciona un protocolo de ejemplo.

**TABLA 1**

Nº de etapa	Etapas	Temperatura de conservación °C	Extracción de N2	Tiempo (minutos)	Presión (Kpa)
1	Carga	Temperatura ambiente			Ambiente
2	Congelación	-50		100	Ambiente
3	Congelación	-50		120	Ambiente
4	Congelación	-23		60	Ambiente
5	Congelación	-23		120	Ambiente
6	Congelación	-50		60	Ambiente
7	Congelación	-50		120	Ambiente
8	Desecación principal	-50	X	60	0,015
9	Desecación principal	-43	X	100	0,015
10	Desecación principal	10	X	120	0,015
11	Desecación principal	10	X	1440	0,015
13	Desecación secundaria	50	X	435	0,015

(continuación)

Nº de etapa	Etapas	Temperatura de conservación °C	Extracción de N2	Tiempo (minutos)	Presión (Kpa)
14	Dsecación secundaria	50	X	240	0,015
15	Pre-aireación	25	X		150
16	Bloqueo	25	X	0,15	150
17	Almacenamiento	4	X	< 72 horas	<10 <sup>6</sup>
18	Aireación	4	X		Ambiente

5 La actividad se determinó con el ensayo de coagulación de una etapa con el factor IX. En la técnica se conocen ensayos de una etapa. El ensayo usado en el presente documento usa un plasma de referencia de coagulación universal (UCRP) como patrón para la actividad del factor IX y plasma sin factor IX para la dilución de patrones de calibración y muestras desconocidas. El ensayo implica mezclar plasma con activador y cloruro cálcico para iniciar la cascada de coagulación con la formación del coágulo de fibrina medida mediante la absorbancia en un lector de microplacas. El tiempo de coagulación medido en este ensayo es el aPTT (tiempo de tromboplastina parcial activada), el tiempo requerido para que la absorbancia atraviese un valor umbral previamente determinado. La determinación precisa de la actividad del factor IX se consigue comparando la señal de los desconocidos con el patrón de referencia del factor IX (UCRP) analizado de forma simultánea. Obsérvese que todos los datos presentados proceden de 1 vial por temperatura por punto de tiempo.

#### Ejemplo 1

El factor IX en una formulación estabilizada que contiene trehalosa muestra mayor estabilidad durante el almacenamiento a 25 °C y a 40 °C

15 El factor IX se liofilizó en cada una de las dos formulaciones candidatas como se muestra en la Tabla 2 más adelante. Ambas formulaciones incluyeron histidina 10 mM, 3 % de manitol, NaCl 66 mM, 0,0075 % de polisorbato 80, pH 6,8. Una de las formulaciones (R2) contenía adicionalmente trehalosa (1 %). Las formulaciones se evaluaron durante 26 semanas en condiciones de almacenamiento en tiempo real de -20 °C y 2-8 °C, así como las condiciones de 25 °C/HR del 60 % y 40 °C/HR del 75 %. El factor IX a 0,4 mg/ml se evaluó a lo largo del estudio mediante un panel de procedimientos analíticos, incluidos HPLC-(SE) de exclusión por tamaño, HPLC-(IE) de intercambio iónico, HPLC-(RP) de fase inversa, SDS-PAGE, concentración de proteínas, turbidez, pH, aspecto visual (torta y líquido reconstituido), humedad residual y actividad. La configuración de la formulación fue una carga de 5 ml en viales de vidrio de 10 ml.

25 Los resultados del ensayo obtenidos en cada punto de tiempo se normalizaron dividiendo los valores medidos para cada condiciones de almacenamiento por el valor medido obtenido para el producto formulado almacenado a -20 °C, que, por definición, se tomó como representación del 100 %. Este enfoque se adoptó en un esfuerzo de minimizar la variabilidad del ensayo del laboratorio de investigación durante el periodo de tiempo del estudio.

**TABLA 2**

MOMENTOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD		Semanas					
		0	2	4	8	12	26
Formulación del factor IX	Condición de almacenamiento						
	-20° C	X	X	X	X	X	X
	4° C			X	X	X	X
	25°C/HR del 60 %		X	X	X	X	
	40°C/HR del 75 %		X	X	X	X	
Formulación del factor IX con trehalosa	Condición de almacenamiento						
	-20° C	X	X	X	X	X	X
	4° C		X	X	X	X	X
	25°C/HR del 60 %		X	X	X	X	
	40°C/HR del 75 %		X	X	X	X	

30

**TABLA 3**

Formulación sin trehalosa										
Condición de almacenamiento	Constante de velocidad	Tiempo de almacenamiento	% Funcional Calculado Medido		Tiempo de almacenamiento	% Funcional Calculado Medido		Tiempo de almacenamiento	% Funcional Calculado Medido	
2 – 8° C	0,00198	12	102 %	106 %	26	105 %	102 %	52	111 %	n.d.
25° C	-0,01960	12	79 %	74 %	26	60 %	n.d.	52	36 %	n.d.
40° C	-0.1870	12	11 %	15 %	26	1 %	n.d.	52	0 %	n.d.
Formulación con trehalosa										
Condición de almacenamiento	Constante de velocidad	Tiempo de almacenamiento	% Funcional Calculado Medido		Tiempo de almacenamiento	% Funcional Calculado Medido		Tiempo de almacenamiento	% Funcional Calculado Medido	
2 – 8° C	0,00044	12	101 %	97 %	26	101 %	102 %	52	102 %	n.d.
25° C	-0,00390	12	95 %	97 %	26	90 %	90 %	52	82 %	n.d.
40° C	-0,00960	12	89 %	99 %	26	78 %	76 %	52	61 %	n.d.

5 Como indican los resultados mostrados en la Tabla 3, la adición de trehalosa (1 %) mejoró espectacularmente la estabilidad del factor IX liofilizado durante el almacenamiento a 40 °C/HR del 75 %. Mientras que la actividad específica, es decir la actividad del factor IX en unidades/ml de proteína en producto farmacéutico reconstituido, de la formulación sin trehalosa disminuyó a ~15 % durante 12 semanas de almacenamiento a 40 °C/HR del 75 %, la actividad específica del factor IX formulado con trehalosa se redujo únicamente de un modo modesto.

Como se muestra en la Figura 1, un análisis de la tasa de deterioro de la actividad específica durante el periodo de tiempo de 12 semanas sugiere que la trehalosa divide la tasa de deterioro a 40 °C/HR de 75 % casi por 20 ( $-0,0096 \text{ sem}^{-1}$  frente a  $-0,187 \text{ sem}^{-1}$ ).

10 También cabe destacar el efecto protector de la trehalosa sobre la estabilidad del factor IX liofilizado almacenado en condiciones de temperatura ambiente (nominalmente 25 °C/60 %). El efecto evidente de la trehalosa es dividir la tasa de deterioro de la actividad específica por ~5, de  $0,0196 \text{ sem}^{-1}$  a  $0,0039 \text{ sem}^{-1}$  (Tabla 3). La tasa de deterioro evidente del factor IX formulado con trehalosa indica que el producto liofilizado sería estable cuando se almacena a temperatura ambiente durante hasta 26 semanas (6 meses). Los valores de la actividad específica medidos y calculados proporcionan respaldo a que el factor IX formulado con trehalosa puede conservar un ~90 % de actividad a las 26 semanas (Tabla 3).

### Ejemplo 2

Las formulaciones de factor IX que contienen trehalosa muestran menos agregación durante el almacenamiento del producto liofilizado como se muestra mediante HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC)

20 La formación de agregados de alto peso molecular, detectados mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC), disminuye la pureza aparente y la actividad específica de las preparaciones de factor IX. La adición de trehalosa (15) al tampón de la formulación de R1 parece prevenir sustancialmente la agregación del factor IX durante el almacenamiento del producto liofilizado. Los perfiles de elución en SE-HPLC para los productos formulados R1 y R2 tras 12 semanas de almacenamiento se muestran en la Figura 2.

25 La exclusión por tamaño del factor IX se realizó usando una columna Tosoh G3000SWx1 (7,8 mm x 30 cm, 5 µm, 250 Å) en HPLC de la serie Agilent 1100. El procedimiento isocrático empleó Tris 50 mM, NaCl 200 mM, a pH 7,5, como la fase móvil.

### Ejemplo 3

30 La HPLC de exclusión por tamaño en presencia de calcio muestra que el factor IX almacenado con trehalosa mantiene la capacidad de sufrir cambios conformacionales inducidos por calcio.

Los iones de calcio desempeñan un papel importante en la función del factor IX a través de su unión que provoca un cambio conformacional en la proteína necesario para la actividad de coagulación. El cambio conformacional inducida por calcio, que disminuye el volumen hidrodinámico de la proteína en solución se puede detectar como una disminución del peso molecular aparente mediante procedimientos tales como SE-HPLC.

35 Como se observó al medir directamente la actividad del factor IX (Tabla 3), la adición de trehalosa (1 %) al tampón de la formulación mejora espectacularmente la estabilidad del factor IX liofilizado durante el almacenamiento en

términos de conservar la función del factor IX, que, en este caso, es la capacidad para unir calcio y sufrir un cambio conformacional inducido por calcio. Los perfiles de elución de SE-HPLC, en presencia de calcio, para las composiciones del factor IX en presencia (R2) y ausencia (R1) de trehalosa después del almacenamiento de 12 semanas se muestran en la Figura 3. Mientras que el porcentaje de factor IX funcional en el producto farmacéutico formulado R1 (sin trehalosa) disminuyó al ~31 % durante 12 semanas de conservación a 40 °C/HR del 75 %, el porcentaje de factor IX funcional en el producto farmacéutico formulado R2 (+ trehalosa) fue únicamente ligeramente menor que el factor IX almacenado a temperaturas bajas (-20 °C, 2-8 °C).

Como se muestra en la Figura 4, un análisis de la tasa de deterioro en la función (cambio conformacional inducido por calcio) durante el periodo de tiempo de 12 semanas sugiere que la trehalosa divide la tasa de deterioro a 40 °C/HR de 75 % por ~19 (-0,0046 sem<sup>-1</sup> frente a -0,0853 sem<sup>-1</sup>), que es muy similar a la disminución ~20 de la tasa de deterioro en la potencia (Figura 1).

#### Ejemplo 4

##### El factor IX formulado con trehalosa muestra menos contaminación por contaminantes de alto peso molecular

Se realizó SDS-PAGE para obtener una comparación visual directa de la pureza del factor IX liofilizado después de almacenar durante 12 semanas en las diversas condiciones. Como se muestra en el Panel A de la figura 5, parece haber pequeñas cantidades de contaminantes de alto peso molecular en todas las muestras, pero la cantidad es progresivamente mayor para el factor IC que se ha almacenado a temperaturas más altas. Esto se ve más fácilmente en las calles 8 y 10 del gel de SDS-PAGE no reducido, en el que se muestran las muestras del factor IC formulado R1 (sin trehalosa) que se mantuvo a 25 °C/HR del 60 % y a 40 °C/HR del 75 %, respectivamente. Las correspondientes muestras del factor IX formulado R2 (más trehalosa), que se muestran en las calles 9 y 11, muestran pocas pruebas de un incremento en la cantidad de contaminantes de alto peso molecular cuando se comparan con las muestras de factor IX formulado R1 o R2 que se almacenó a 2-8 °C o a -20 °C (calles 4-7).

Aunque en la preparación de factor IX usada en el presente estudio se podían detectar formas degradadas del factor 13C, las cantidades no parecieron aumentar con el tiempo de almacenamiento en cualquiera de las condiciones experimentales. El factor IX-gamma (Factor IX $\gamma$ ) es una forma truncada y de menor peso molecular del factor IX que se forma cuando la proteína intacta se escinde proteolíticamente en o cerca del enlace peptídico Arg318-Ser319 para liberar un péptido de kDa de la región carboxi-terminal de la molécula. El factor IX $\gamma$  que está presente en las formulaciones del factor IX se puede ver en geles de SDS-PAGE no reducidos (Panel A) como una banda menor que migra con un peso molecular evidente de aproximadamente kDa. La inspección visual del gel mostrado en el Panel A de la Figura 5 sugiere que no se ha producido una proteólisis significativa del factor IX en el factor IX $\gamma$  durante el almacenamiento durante el periodo de tiempo del presente estudio.

#### Ejemplo 5

##### La cromatografía de intercambio iónico muestra composiciones del factor IX estabilizadas con trehalosa.

La cromatografía de intercambio iónico tiene el potencial de separar parcialmente las isoformas de proteínas que difieren en carga y/o en la distribución de la carga. La cromatografía de intercambio aniónico del factor IX se realizó usando una columna GE Healthcare Tricorn MonoQ 5/50GL (5 x 50 mm, 10  $\mu$ m). El procedimiento de gradiente binario usó Tris 50 mM a pH 7,5 como fase móvil A y Tris 50 mM, NaCl 1M a pH 7,5 como fase móvil B.

La cromatografía de intercambio aniónico, como se realiza en el presente estudio, dio lugar a la elución del factor IX formulado R1 (sin trehalosa) como un único pico simétrico que se amplió durante el tiempo de almacenamiento a 40 °C/HR del 75 %, mientras que la elución del factor IX formulado R2 (con trehalosa) parecía no cambiar sustancialmente a este respecto. Estos resultados se muestran en la Figura 6.

#### Conclusión

Añadiendo trehalosa (1 %) a una formulación que se sabe que estabiliza el factor IX liofilizado altamente purificado durante al menos dos años a 2-8 °C, se obtiene una formulación todavía mejor en términos de mantenimiento de la estructura y la función de la proteína. La composición del factor IX sin trehalosa (R1) parecía ser estable a temperatura ambiente (25 °C/HR del 60 %) durante aproximadamente un mes. En presencia de trehalosa (R2), el producto farmacológico factor IX fue estable durante aproximadamente seis meses (basado en un  $\geq$ 90 % de conservación de la actividad).

Cuando el factor IX se formula con y sin trehalosa en una formulación liofilizada que contiene histidina, manitol, cloruro sódico y polisorbato 80, la formulación con trehalosa presenta un perfil de estabilidad superior durante el almacenamiento a 25 °C y a 40 °C, probablemente debido al beneficio crioprotector producido por las propiedades amorfas del disacárido desecado.

La formulación del factor IX con trehalosa presentó datos de estabilidad comparables a los del factor IX almacenado a temperaturas refrigeradas. Los datos respaldan la posibilidad de desviaciones de temperatura del producto farmacológico de factor IX en la formulación con trehalosa a temperatura ambiente durante varias semanas y



potencialmente durante todavía más tiempo.

El almacenamiento del factor IX en la formulación sin trehalosa a 40 °C/HR del 75 % condujo a:

- 5
- un incremento de las especies de alto peso molecular identificado mediante SE-HPLC.
  - una tendencia a la disminución de la actividad en 12 semanas, determinado mediante el ensayo de coagulación de una etapa.
  - una ampliación significativa del perfil cromatográfico de IE-HPLC.

El almacenamiento del factor IX en la formulación sin trehalosa a 40 °C/HR del 75 % también dio como resultado la degradación como se ha descrito anteriormente, aunque en menor medida.

10

No se observaron diferencias significativas entre las formulaciones con respecto a la morfología de la torta, la concentración, la turbidez del producto reconstituido o la RP-HPLC.

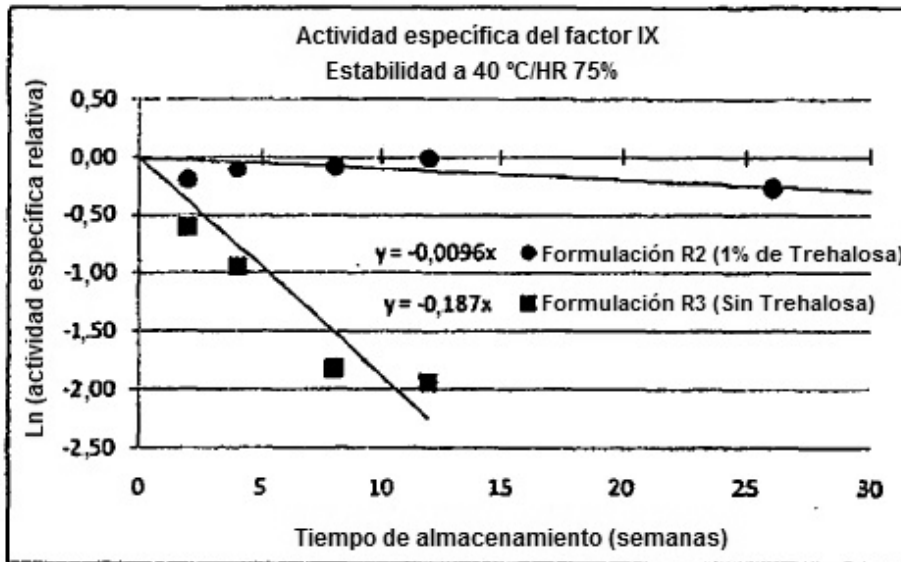
La estabilidad durante 26 semanas del factor IX a temperaturas refrigeradas y congeladas fue comparable para ambas formulaciones.

Los niveles de humedad residual y los tiempos de reconstitución fueron cada uno ligeramente mayores para la formulación con trehalosa en comparación con la formulación sin trehalosa.

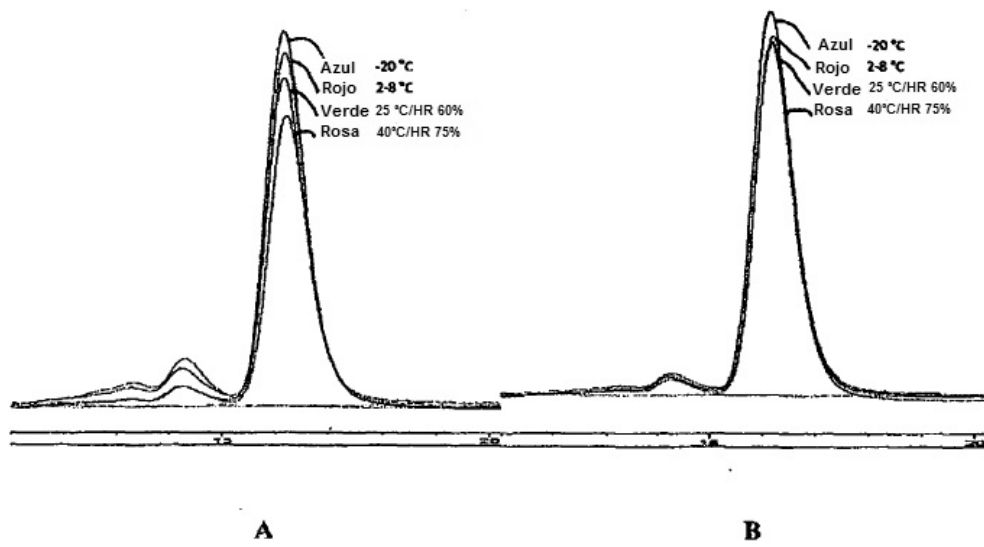
15

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición liofilizada que comprende factor IX y trehalosa, en la que la trehalosa está presente en una cantidad del 0,5 al 3 % en volumen conservándose durante la liofilización y el almacenamiento durante 6 meses a 25 °C más del 90 % de la propiedad de unión al calcio del factor IX.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la trehalosa está presente en una cantidad del 1 al 2 % en volumen.
3. La composición de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, que además comprende histidina como agente tampón.
- 10 4. La composición de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, que comprende además manitol, cloruro sódico o polisorbato 80.
5. La composición de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, que comprende además histidina a una concentración de 5 a 20 mM, manitol a una concentración del 2 al 5 % en volumen, cloruro sódico a una concentración de 50 a 80 mM y polisorbato 80 a una concentración del 0,001 al 0,005 % en volumen.
6. Un procedimiento para preparar una composición desecada estable del factor IX, que comprende:
  - 15 mezclar una solución que comprende factor IX con del 0,5 al 3 % de trehalosa en volumen para obtener una solución crioprotectora; y
  - desecar por congelación la solución crioprotectora para obtener una composición desecada estable de factor IX,
  - 20 en el que la composición desecada del factor IX conserva más del 90 % de la actividad de unión al calcio cuando se almacena durante 6 meses a 25 °C-
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la trehalosa está presente en una cantidad del 1 al 2 % en volumen.
8. El procedimiento de la reivindicación 6 o de la reivindicación 7, en el que la solución comprende además histidina, manitol, cloruro sódico o polisorbato 80.
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 6 o de la reivindicación 7, en el que la solución comprende además histidina a una concentración de 5 a 20 mM, manitol a una concentración del 2 al 5 % en volumen, cloruro sódico a una concentración de 50 a 80 mM y polisorbato 80 a una concentración del 0,001 al 0,005 % en volumen.
10. El procedimiento de la reivindicación 6 o de la reivindicación 7, en el que la desecación por congelación comprende una única etapa de templado.
- 30 11. Un procedimiento de liofilización de una formulación farmacéutica que comprende factor IX y trehalosa, que comprende las etapas de:
  - (a) congelar la formulación farmacéutica que comprende factor IX y del 0,5 al 3 % en volumen de trehalosa a una temperatura de -40 °C o menos;
  - 35 (b) templar la formulación farmacéutica a entre aproximadamente -20 °C y -35 °C;
  - (c) disminuir la temperatura de la formulación farmacéutica a -40 °C o menos;
  - (d) desecar la formulación farmacéutica en una primera etapa de desecación a 5 °C a 20 °C a presión reducida;
  - y
  - (e) desecar la formulación farmacéutica en una segunda etapa de desecación a 45 °C a 55 °C a presión reducida.
- 40 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la formulación farmacéutica comprende además histidina a una concentración de 5 a 20 mM, manitol a una concentración del 2 al 5 % en volumen, cloruro sódico a una concentración de 50 a 80 mM y polisorbato 80 a una concentración del 0,001 al 0,005 % en volumen.



**FIGURA 1**



**Figura 2. Perfil de elución de SE-HPLC de las composiciones del factor IX después de almacenar durante 12 semanas**

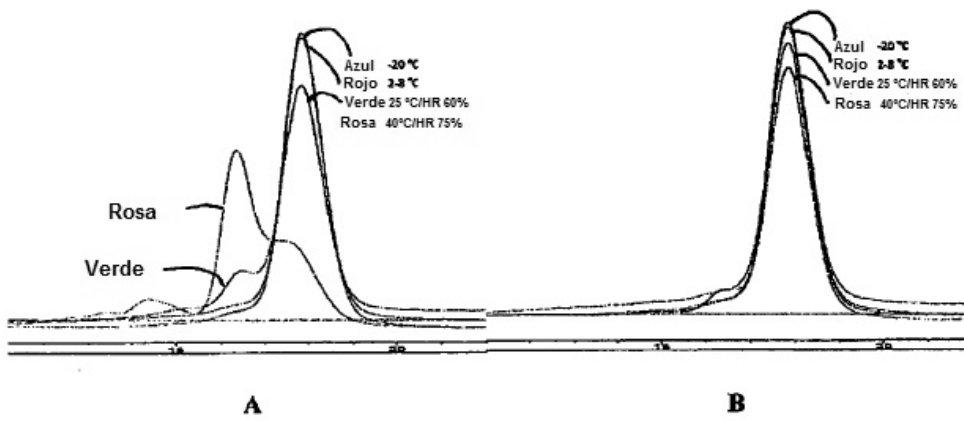


Figura 3. Perfil de elución de SE-HPLC (Calcio) de IB1001 después de almacenar durante 12 semanas

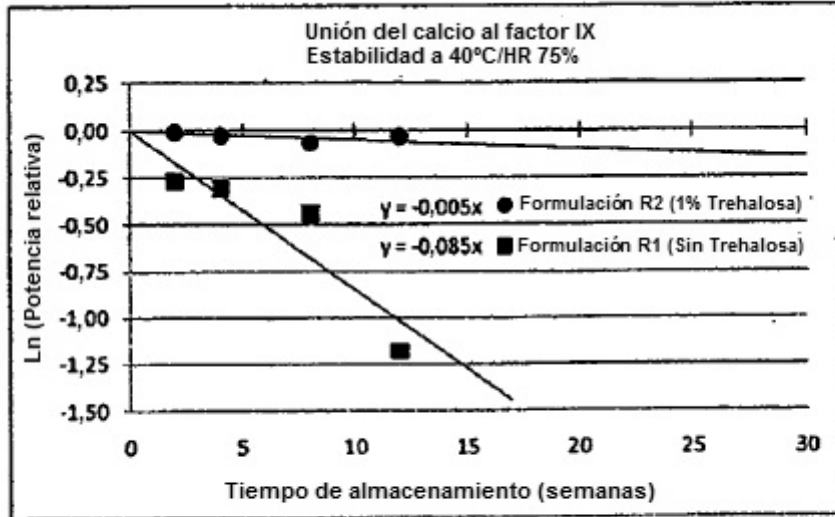


Figura 4. Estabilidad de la unión del calcio al factor IX a 40°C/HR 75 %

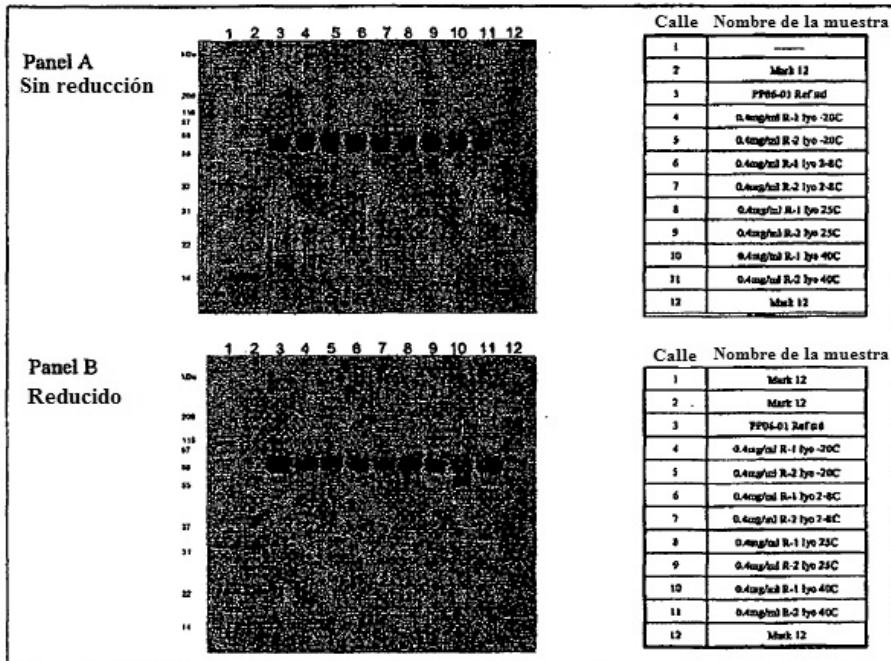
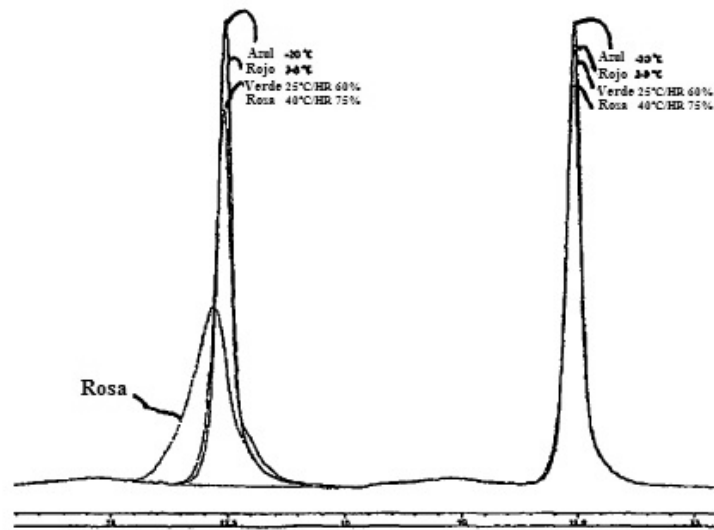


Figura 5. Análisis SDS-PAGE del factor IX IBI1001 después de almacenar durante 12 semanas



**Figura 6. Perfil de elución de HPLC de intercambio aniónico de IB1001 después de almacenar durante 12 semanas**