

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 684**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 9/08</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/19</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/48</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/18</b>	(2007.01)
<b>A61K 47/26</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2006 PCT/US2006/042258**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2007 WO07053533**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2006 E 06827036 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 1942868**

54 Título: **Solución de cloruro sódico para la reconstitución o la dilución de fármacos**

30 Prioridad:

**01.11.2005 US 732221 P**

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

**31.07.2017**

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)  
235 East 42nd Street  
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**WEBB, CHANDRA, A. y  
ZERFAS, JULIE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 627 684 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**

Solución de cloruro sódico para la reconstitución o la dilución de fármacos

La presente solicitud reivindica la prioridad con respecto a la patente de EE.UU. n.º 60/732.221, presentada el 1 de noviembre de 2005, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

- 5 Una parte de la divulgación del presente documento de patente contiene material que está sujeto a protección de derechos de autor. El titular de los derechos de autor no tiene ninguna objeción a la reproducción facsímil por cualquiera de los documentos de patente o la divulgación de la patente, como aparece en el expediente o los registros de patentes de la Oficina de Patentes y Marcas, pero se reserva todos los derechos de autor.

**Antecedentes de la invención**

- 10 Cuando se mezcla sangre completa con una solución de fármaco, tal como en la vía intravenosa (IV) durante la administración de un fármaco inyectable IV, se puede producir la agregación de los eritrocitos o rouleaux (también denominada aglutinación de glóbulos rojos) si la solución del fármaco no contiene suficiente fuerza iónica. La agregación de los eritrocitos se produce, por ejemplo, con dextrosa al 5 % en agua (una solución parenteral de gran volumen común) y con muchos productos farmacéuticos que tienen baja fuerza iónica.

- 15 Los productos farmacéuticos suelen estar liofilizados y, por lo tanto, necesitan reconstituirse con una solución antes de la inyección parenteral. Sin embargo, cuando los productos liofilizados se reconstituyen con soluciones de baja fuerza iónica, la preparación resultante también puede causar la agregación de los eritrocitos. Aunque la reconstitución de las tortas liofilizadas con solución salina normal (NaCl al 0,9 %) en comparación con el agua estéril para inyección (sWFI) proporcionaría una fuerza iónica adicional, la solución de fármaco resultante puede ser hipertónica y podría tener efectos secundarios no deseados tras la inyección.

20 Van Den Berg y col, "Blood" vol. 96, n.º 11, Parte 1, se refiere a la aglutinación de los glóbulos rojos mediante BeneFix™. El documento WO2005089712 se refiere a un procedimiento de liofilización para potenciar la cristalización de los excipientes.

- 25 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de una solución que se pueda usar para reconstituir tortas liofilizadas o diluir soluciones farmacéuticas para proporcionar un preparado resultante para inyección que sea isotónico con respecto al plasma y que tenga suficiente fuerza iónica de modo que no provoque la agregación de los eritrocitos.

**Sumario de la invención**

- 30 La invención proporciona el descubrimiento de que la aglutinación de los eritrocitos se produce por soluciones de baja fuerza iónica que entran en contacto con la sangre. Por lo tanto, cuando se preparan formulaciones farmacéuticas para inyección intravenosa por reconstitución o dilución en soluciones de baja fuerza iónica tales como dextrosa al 5 %, dextrano al 3 % o sWFI, los preparados resultantes pueden tener la osmolaridad necesaria para ser aproximadamente isotónicos con respecto a la sangre, pero, a menudo, no tienen una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación. Por otra parte, cuando se preparan formulaciones farmacéuticas para inyección intravenosa por reconstitución o dilución con soluciones de alta resistencia iónica tales como solución salina (NaCl al 0,9 % o NaCl 154 mM), el preparado resultante puede tener una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación, pero puede poseer una osmolaridad hipertónica con respecto a la sangre, causando, de este modo, la deshidratación de los glóbulos rojos, la inflamación venosa y/o, posiblemente, tromboflebitis si las inyecciones repetidas son frecuentes o crónicas.

- 40 En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de preparación de una formulación farmacéutica para inyección intravenosa, comprendiendo el procedimiento la adición de una solución de cloruro sódico de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 150 mM a la formulación farmacéutica, produciendo una formulación preparada para inyección intravenosa, en la que la formulación preparada es aproximadamente isotónica con respecto al plasma o es ligeramente hipotónica o ligeramente hipertónica con respecto al plasma, y en la que la formulación preparada tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos (o la agregación de los eritrocitos).

- 45 La invención proporciona un procedimiento de preparación de una formulación de Factor IX para inyección intravenosa, procedimiento que comprende la adición de una solución de cloruro sódico 25 mM a 150 mM a una formulación de Factor IX liofilizada, produciendo así una formulación preparada para la inyección intravenosa, en el que la formulación liofilizada, si se reconstituye en agua, no contiene más de 5 mM de una sal ionizante y en el que la formulación preparada es aproximadamente isotónica con respecto al plasma y tiene una osmolaridad que es de 270 mOsm/ml a 330 mOsm/l o que es ligeramente hipotónica con respecto al plasma y tiene una osmolaridad que es de 220 mOsm/l a 270 mOsm/l, o que es ligeramente hipertónica con respecto al plasma y que tiene una osmolaridad que es de 330 mOsm/l a 600 mOsm/l y en el que la formulación preparada tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos tras la inyección intravenosa.

- 55 La formulación preparada es aproximadamente isotónica con respecto al plasma, por ejemplo, cuando tiene una

osmolaridad que es de aproximadamente 270 mOsm/l a aproximadamente 330 mOsm/l. La formulación preparada es ligeramente hipotónica con respecto al plasma, por ejemplo, cuando tiene una osmolaridad que es de aproximadamente 220 mOsm/l a aproximadamente 270 mOsm/l. La formulación preparada es ligeramente hipertónica con respecto al plasma, por ejemplo, cuando tiene una osmolaridad que es de aproximadamente 330 mOsm/l a aproximadamente 600 mOsm/l.

En un aspecto, la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos cuando tiene, por ejemplo, al menos aproximadamente 25 mEq/l de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . En otro aspecto, la formulación preparada tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos cuando tiene, por ejemplo, al menos aproximadamente 40 mEq/l de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . En otro aspecto, la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos cuando tiene, por ejemplo, al menos aproximadamente 40 mEq/l de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y menos de aproximadamente 150 mEq/l de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . En otro aspecto, la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos cuando tiene, por ejemplo, una fuerza iónica medida en conductividad que es al menos de aproximadamente 2,5 mS/cm. En otro aspecto, la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos cuando tiene, por ejemplo, una fuerza iónica medida en conductividad que es al menos de aproximadamente 4,0 mS/cm.

La formulación farmacéutica que se va a preparar para inyección puede ser, por ejemplo, una formulación no líquida o una formulación en solución. Por lo tanto, una formulación no líquida puede reconstituirse en solución mediante una solución de cloruro sódico que tenga una concentración de cloruro sódico de aproximadamente 25-150 mM, 25-100 mM, 25-80 mM, 25-40 mM, 25-35 mM, 25-30 mM o aproximadamente 40 mM. Por lo tanto, se puede diluir una formulación líquida o en solución mediante una solución de cloruro sódico que tenga una concentración de cloruro sódico de aproximadamente 25-150 mM, 25-100 mM, 25-80 mM, 25-40 mM, 25-35 mM, 25-30 mM o aproximadamente 40 mM. Una formulación no líquida puede ser, por ejemplo, una formulación liofilizada.

En un aspecto, la solución de cloruro sódico que se añade comprende de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 150 mM de cloruro sódico. En un aspecto, la solución de cloruro sódico que se añade consiste esencialmente en aproximadamente 40 mM a aproximadamente 150 mM de cloruro sódico. En un aspecto, la solución de cloruro sódico que se añade comprende aproximadamente 40 mM de cloruro sódico. En un aspecto, la solución de cloruro sódico que se añade consiste esencialmente en una solución de cloruro sódico 40 mM. En un aspecto, la solución de cloruro sódico que se añade consiste esencialmente en una solución que tiene una solución de cloruro sódico que es de aproximadamente 40 mM  $\pm$  10 mM de cloruro sódico.

En un aspecto, antes de la adición de la solución de cloruro sódico, la formulación farmacéutica no contiene una cantidad apreciable de una sal ionizante. Una cantidad apreciable de una sal ionizante puede ser, por ejemplo, una cantidad que sea superior a aproximadamente 5 mM. En otro aspecto, una cantidad apreciable de una sal ionizante puede ser, por ejemplo, una cantidad que sea superior a aproximadamente 25 mM. Si la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, no contiene una cantidad apreciable de una sal ionizante si no contiene más de, por ejemplo, 5 mM o 25 mM de una sal ionizante cuando la formulación liofilizada se reconstituye en agua.

En un aspecto, antes de la adición de la solución de cloruro sódico, la formulación farmacéutica comprende histidina, glicina, sacarosa y polisorbato. En otro aspecto, antes de la adición de la solución de cloruro sódico, la formulación farmacéutica comprende histidina, glicina, sacarosa, polisorbato y una proteína terapéutica. En el presente documento, una proteína terapéutica puede ser, por ejemplo, una proteína usada para tratar trastornos de coagulación o para la hemostasia, incluyendo, pero sin limitación, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor XIII, anticuerpos, análogos relacionados de los mismos y derivados de los mismos. En otro aspecto, antes de la adición de la solución de cloruro sódico, la formulación farmacéutica comprende histidina, glicina, sacarosa, polisorbato y Factor IX (incluyendo el Factor IX recombinante (rFIX)). Como se usa en el presente documento, el Factor IX puede incluir versiones modificadas del Factor IX, incluyendo, por ejemplo, Factor IX PEGilado, fusiones de proteínas que comprenden Factor IX tal como albúmina-Factor IX o inmunoglobulina (entera o dominios de la misma)-Factor IX y Factor IX glicosilado.

En un aspecto, en el que la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, antes de la adición de la solución de cloruro sódico, la formulación, medida como si se hubiese reconstituido en agua (en un volumen que es el mismo que el volumen de llenado, es decir, el volumen de la formulación antes de la liofilización), comprende: (a) de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM de histidina; (b) de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 0,3 M de glicina; (c) de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 por ciento de sacarosa; y (d) de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,05 por ciento de polisorbato (o de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,05 por ciento). En un aspecto, la formulación puede comprender además, medida si se reconstituye en agua, (e) de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml o más de una proteína terapéutica, o de aproximadamente 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1.000, 2.000 UI/ml (unidades internacionales/ml) o más de una proteína terapéutica. En un aspecto, la formulación puede comprender además, medida si se reconstituye en agua, (e) de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml o más de Factor IX, o de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de Factor IX, o de aproximadamente 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1.000, 2.000 UI/ml (unidades internacionales/ml) o más de Factor IX.

5 En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de prevención de la aglutinación de los eritrocitos causada por inyección intravenosa, comprendiendo el procedimiento reconstituir o diluir una formulación farmacéutica con una solución de cloruro sódico de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 150 mM, de modo que la formulación farmacéutica reconstituida o diluida tenga una suficiente fuerza iónica para prevenir la aglutinación de los eritrocitos cuando la formulación farmacéutica reconstituida o diluida se administre a un sujeto por inyección intravenosa.

10 En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de preparación de una formulación farmacéutica liofilizada para inyección intravenosa, comprendiendo el procedimiento reconstituir la formulación farmacéutica liofilizada con una solución de cloruro sódico de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 150 nM, de modo que, tras la reconstitución, la formulación tenga una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos y una osmolaridad que sea aproximadamente isotónica (o ligeramente hipertónica o ligeramente hipotónica).

15 En un aspecto, la formulación liofilizada se reconstituye con la solución de cloruro sódico, en la que el volumen de la solución de cloruro sódico usado para la reconstitución es inferior al volumen de la formulación previo a la liofilización (es decir, volumen de llenado). De esta manera, la divulgación proporciona un procedimiento de reducción del volumen de la formulación que se va a inyectar.

20 En un aspecto, la formulación liofilizada se reconstituye con la solución de cloruro sódico, en la que el volumen de la solución de cloruro sódico usado para la reconstitución es superior al volumen de la formulación previo a la liofilización (es decir, volumen de llenado). De esta manera, la divulgación proporciona un procedimiento de mantenimiento de la isotonicidad de la formulación que se va a inyectar.

25 Por ejemplo, se puede reconstituir una formulación liofilizada con un volumen de solución de cloruro sódico que sea superior al volumen de la formulación antes de la liofilización, tal como la reconstitución con 5 ml de cloruro sódico, en la que el volumen de la formulación antes de la liofilización es de 4 ml. Por ejemplo, una formulación liofilizada de 4 ml reconstituida en 4 ml de agua es una solución isotónica que contiene histidina 10 mM, glicina 260 mM, sacarosa al 1 %, polisorbato al 0,005 %, que es de aproximadamente 300 mOsm/l. Pero si la formulación liofilizada se reconstituye con 4 ml de una solución de NaCl 40 mM (80 mOsm/l), entonces la formulación resultante tendría una solución ligeramente hipertónica (300 mOsm/l + 80 mOsm/l = 380 mOsm/l). Pero si la formulación liofilizada se reconstituye con 5 ml de una solución de NaCl 40 mM, entonces la solución resultante es aproximadamente 8 mM (8 mOsm/l) de histidina, glicina 208 mM (208 mOsm/l), sacarosa al 0,8 % (24 mOsm/l), polisorbato al 0,004 % (osmolaridad despreciable) y NaCl 40 mM (80 mOsm/l), que es de aproximadamente 320 mOsm/l. De este modo, mediante la reconstitución de una formulación antes de la liofilización que es aproximadamente isotónica con un volumen de solución de cloruro sódico que es superior al volumen de llenado, la invención puede proporcionar una solución resultante que sigue siendo isotónica. En otras palabras, mediante la reconstitución de una formulación antes de la liofilización que es aproximadamente isotónica con un volumen de solución de cloruro sódico que es inferior o aproximadamente igual al volumen de llenado, se puede producir una solución que sea ligeramente hipertónica. Para evitar esto, la divulgación proporciona un procedimiento de mantenimiento de la isotonicidad mediante la reconstitución de una formulación liofilizada con una solución de cloruro sódico en un volumen que es superior al volumen de la formulación antes de la liofilización.

40 En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de mantenimiento de la isotonicidad de una formulación liofilizada tras la reconstitución, comprendiendo el procedimiento la reconstitución de una formulación liofilizada en un volumen que es al menos un 20 % superior al volumen de formulación antes de la liofilización, siendo la formulación antes de la liofilización aproximadamente isotónica, de manera que la formulación reconstituida sea aproximadamente isotónica y tenga una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos. Mediante la reconstitución de una formulación liofilizada en un volumen superior a su volumen previo a la liofilización, la contribución a la osmolaridad de la torta liofilizada disminuye de manera directamente proporcional al aumento de volumen a partir de la reconstitución en comparación con la situación previa a la liofilización. Por ejemplo, una formulación previa a la liofilización con una tonicidad de 300 mOsm/l en un volumen X, si se reconstituye en una solución con volumen Y que es un 20 % superior al volumen X, los 300 mOsm/l se convierten entonces en 240 mOsm/l en el volumen Y (una disminución del 20 % en la osmolalidad debida a un aumento del 20 % en volumen). Si la solución de volumen Y es una solución de cloruro sódico, entonces la contribución a la tonicidad de la solución de cloruro sódico es el doble de la concentración de cloruro sódico en la solución. Por ejemplo, si la solución de volumen Y es 40 mM, entonces la solución reconstituida tiene una tonicidad de 240 mOsm/l más 80 mOsm/L, que es aproximadamente isotónica, y que tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la agregación de los eritrocitos.

55 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de preparación de una formulación de Factor IX liofilizada para inyección intravenosa, comprendiendo el procedimiento la adición de una solución de cloruro sódico de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 150 mM a la formulación de Factor IX liofilizada, produciendo una formulación preparada para inyección intravenosa, en la que la formulación preparada es aproximadamente isotónica con respecto al plasma o es ligeramente hipotónica o ligeramente hipertónica con respecto al plasma, y en la que la formulación preparada tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos. En un aspecto, la formulación de Factor IX liofilizada, cuando se mide como si se reconstituye en agua, comprende (a)

5 histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM; (b) glicina de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 0,3 M; (c) sacarosa de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 por ciento; (d) polisorbato de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,05 por ciento; y (e) de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de Factor IX, o de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml o alguna  
 10 otra cantidad soluble de Factor IX, o de aproximadamente 10 UI/ml a aproximadamente 500 UI/ml de Factor IX, o de aproximadamente 10 UI/ml a aproximadamente 5.000 UI/ml de Factor IX. En un aspecto, se añade una solución de cloruro sódico aproximadamente 40 mM a la formulación de Factor IX liofilizada. En un aspecto, se añaden aproximadamente 5 ml de la solución de cloruro sódico aproximadamente 40 mM a la formulación de Factor IX liofilizada. En un aspecto, la formulación de Factor IX liofilizada, si se mide como si se reconstituyera en agua, comprende histidina aproximadamente 10 mM, glicina aproximadamente 0,26 M, sacarosa al aproximadamente 1 % y polisorbato al aproximadamente 0,005 %.

15 En un aspecto, la invención proporciona un kit farmacéutico que comprende: (a) un vial que contiene una torta liofilizada, en el que si la torta liofilizada se reconstituye en aproximadamente 5 ml de agua, la solución comprendería: (i) histidina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM; (ii) glicina de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 0,3 M; (iii) sacarosa del aproximadamente 0,5 al aproximadamente 2 por ciento; (iv) polisorbato del aproximadamente 0,001 al aproximadamente 0,05 por ciento; y (v) de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de Factor IX, o de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml o alguna  
 20 otra cantidad soluble de Factor IX, o de aproximadamente 50 UI/ml a aproximadamente 500 UI/ml de Factor IX, o de aproximadamente 10 UI/ml a aproximadamente 5.000 UI/ml de Factor IX; (b) una solución de cloruro sódico de 25 mM a aproximadamente 150 mM; y (c) instrucciones para reconstituir la torta liofilizada con la solución de cloruro sódico, de manera que, después de la reconstitución, la solución resultante sea aproximadamente isotónica y tenga una fuerza iónica suficiente para prevenir la agregación de los eritrocitos tras la inyección intravenosa.

25 En un aspecto, la invención proporciona un kit farmacéutico que comprende: (a) un vial que contiene una torta liofilizada, en el que si la torta liofilizada se reconstituye en 4 ml de agua, la solución comprendería: (i) histidina aproximadamente 10 mM; (ii) glicina aproximadamente 0,26 M; (iii) sacarosa al aproximadamente 1 por ciento; (iv) polisorbato 80 al aproximadamente 0,005 por ciento; y (v) de aproximadamente 50 UI/ml a aproximadamente 5.000 UI/ml de Factor IX; (b) una solución de cloruro sódico aproximadamente 40 mM; y (c) instrucciones para reconstituir la torta liofilizada en el vial con aproximadamente 5 ml de una solución de cloruro sódico aproximadamente 40 mM, de manera que, después de la reconstitución, la solución resultante comprenda: (i) histidina de aproximadamente 7 u  
 30 8 a aproximadamente 10 mM; (ii) glicina de aproximadamente 200 a aproximadamente 210 mM; (iii) sacarosa del aproximadamente 0,7 % al aproximadamente 0,9 %; (v) polisorbato 80 al aproximadamente 0,004 %; (v) de aproximadamente 50 UI/ml a aproximadamente 5.000 UI/ml de Factor IX y (vi) NaCl aproximadamente 40 mM.

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

35 La **Figura 1** muestra los resultados de sedimentación de los eritrocitos de los experimentos descritos en el Ejemplo 3. La sedimentación de los eritrocitos se midió a los 60 minutos usando una adaptación del procedimiento de Westergren modificado (véase el Ejemplo 2), en el que la sangre humana recogida en EDTA se mezcló 1:4 con soluciones de ensayo. Tras 60 minutos, se midió la distancia en mm entre la marca cero y la superficie de contacto de los eritrocitos y el plasma. Las barras horizontales representan la media, y los corchetes verticales la desviación típica de un total de 12 donantes. Los resultados se combinaron a partir de 4  
 40 experimentos independientes, cada uno de los cuales evaluó la sangre de 3 donantes.

La **Figura 2** muestra una evaluación de la sedimentación de los eritrocitos en formulaciones BeneFIX® reconstituidas con soluciones de NaCl. Una solución de NaCl 40 mM es suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos cuando se usa para reconstituir el producto BeneFIX® comercializado actualmente o una nueva formulación de BeneFIX® (BeneFIX®-R, en el que, antes de la liofilización, la solución de relleno estaba compuesta de 4 ml y tenía concentraciones de histidina 10 mM, glicina 260 mM, sacarosa al 1 %, polisorbato 80  
 45 al 0,005 % y, tras la liofilización, se reconstituyó en 5 ml de cloruro sódico 40 mM, de modo que, después de la reconstitución, BeneFIX®-R comprende NaCl 40 mM, histidina 8 mM, glicina 208 mM, sacarosa al 0,8 % y polisorbato al 0,004 %).

### **Descripción detallada de la invención**

50 La invención proporciona procedimientos de preparación de formulaciones farmacéuticas para inyección (en particular, preparados listos para inyección intravenosa) que no producen la aglutinación de los eritrocitos, hemólisis ni/o retracción celular. Para evitar la aglutinación, una formulación farmacéutica lista para inyección necesita tener suficiente fuerza iónica. Para evitar la hemólisis o la retracción celular, una formulación farmacéutica lista para inyección necesita ser aproximadamente isotónica con respecto al plasma. La invención proporciona procedimientos  
 55 que preparan formulaciones farmacéuticas para inyección que tienen tanto la fuerza iónica suficiente para evitar la aglutinación como la tonicidad necesaria para prevenir la hemólisis significativa o la deshidratación o retracción celular. Los presentes procedimientos implican el uso de soluciones de cloruro sódico que son de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 150 mM para reconstituir las tortas liofilizadas (u otras formulaciones farmacéuticas no líquidas) en solución o para diluir soluciones de formulación farmacéutica. Independientemente de si se usan las soluciones de cloruro sódico para la reconstitución o para la dilución, la adición de determinadas soluciones de  
 60

cloruro sódico produce un preparado farmacéutico para inyección que es aproximadamente isotónico con respecto al plasma o a la sangre, y tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la agregación de los eritrocitos tras la inyección, en particular, tras la inyección intravenosa.

#### Términos y expresiones

5 Como se usa en el presente documento, la "molalidad" de una solución es el número de moles de un soluto por kilogramo de disolvente.

Como se usa en el presente documento, la "molaridad" de una solución es el número de moles de soluto por litro de solución.

10 Como se usa en el presente documento, un "osmol" es la cantidad de una sustancia que produce, en solución ideal, el número de partículas (número de Avogadro) que deprimiría el punto de congelación del disolvente en 1,86 K.

15 Como se usa en el presente documento, la "osmolalidad" de una solución es el número de osmoles de soluto por kilogramo de disolvente. La osmolalidad es una medida del número de partículas presentes en solución, y es independiente del tamaño o del peso de las partículas. Solo se puede medir mediante el uso de una propiedad de la solución que depende solo de la concentración de partículas. Estas propiedades son la depresión de la presión de vapor, la depresión del punto de congelación, la elevación del punto de ebullición y la presión osmótica, y se denominan colectivamente propiedades coligativas.

Como se usa en el presente documento, la "osmolaridad" de una solución es el número de osmoles de soluto por litro de solución.

20 Como se usa en el presente documento, una "formulación farmacéutica" que está lista o preparada para inyección puede ser cualquier fármaco destinado a administrarse a un sujeto. Por ejemplo, una formulación farmacéutica puede ser una torta liofilizada, una solución, un polvo o un sólido. La formulación, si no se encuentra en forma líquida, se reconstituye en solución con una solución de NaCl de la invención. Si la formulación está en forma líquida, la formulación se diluye o se mezcla con una solución de NaCl de la invención.

#### Fuerza iónica

25 La fuerza iónica es una característica de una solución electrolítica (un líquido con iones positivos y negativos disueltos en el mismo). Normalmente, se expresa como las interacciones electrostáticas medias entre los iones electrolíticos. La fuerza iónica de un electrolito es la mitad del total obtenido multiplicando la molalidad (la cantidad de sustancia por unidad de masa de disolvente) de cada ion por su valencia al cuadrado.

30 La fuerza iónica está estrechamente relacionada con la concentración de electrolitos, e indica cuánto está protegida o estabilizada la carga de un determinado ion por otros iones (la denominada atmósfera iónica) en un electrolito. La diferencia principal entre la fuerza iónica y la concentración de electrolitos es que la primera es más alta si algunos de los iones están más cargados. Por ejemplo, una solución de sulfato de magnesio ( $Mg^{2+}SO_4^{2-}$ ) completamente disociado (descompuesto) tiene una fuerza iónica 4 veces superior a una solución de cloruro sódico ( $Na^+Cl^-$ ) de la misma concentración. Otra diferencia entre las dos es que la fuerza iónica refleja la concentración de iones libres, y no solo cuánta sal se añadió a una solución. Algunas veces, se puede disolver una sal, y que los respectivos iones sigan unidos por pares, de manera semejante a las moléculas sin carga en solución. En este caso, la fuerza iónica es mucho menor que la concentración de sal.

35 Para la divulgación, los preparados farmacéuticos se preparan para inyección de modo que no sean solo isotónicos, sino que también tengan una fuerza iónica suficiente para evitar la aglutinación de los glóbulos rojos. Una fuerza iónica suficiente de un preparado listo para la inyección (es decir, una torta liofilizada que se reconstituye con una solución de NaCl de la invención o una solución de fármaco que se diluye con una solución de NaCl de la invención) puede tener, por ejemplo, al menos aproximadamente 25 miliequivalentes por litro (mEq/l) de iones  $Na^+$  y  $Cl^-$ . En una realización, una fuerza iónica suficiente es al menos de aproximadamente 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o al menos aproximadamente 40 mEq/l de iones  $Na^+$  y  $Cl^-$ .

40 La fuerza iónica también se puede describir en términos de la conductividad de una solución. La conductividad es la capacidad de un material o de una solución para conducir la corriente eléctrica. El principio por el cual los instrumentos miden la conductividad es simple: se colocan dos placas en la muestra, se aplica un potencial a través de las placas (normalmente una tensión de onda sinusoidal) y se mide la corriente. La conductividad (G), la inversa de la resistividad (R), se determina a partir de los valores de tensión y corriente según la ley de Ohm.  $G = I/R = I$   
 45 (amperios)/E (voltios).

50 Dado que la carga de iones en solución facilita la conductancia de la corriente eléctrica, la conductividad de una solución es proporcional a su concentración de iones. En algunas situaciones, sin embargo, la conductividad puede no correlacionarse directamente con la concentración. Sin embargo, para soluciones de cloruro sódico, la conductividad es directamente proporcional a la concentración de iones. La unidad básica de conductividad es el Siemens (S), anteriormente denominado mho. Dado que la geometría de una muestra de ensayo afecta a los  
 55

valores de conductividad, las mediciones estandarizadas se expresan en unidades de conductividad específicas (S/cm) para compensar las variaciones en las dimensiones del electrodo. La conductividad específica (C) es simplemente el producto de la conductividad medida (G) y la constante de la celda de electrodo (L/A), donde L es la longitud de la columna de líquido entre el electrodo y A es el área de los electrodos.  $C = G \times (L/A)$ . Si la constante de la celda es de  $1 \text{ cm}^{-1}$ , la conductividad específica es la misma que la conductividad medida de la solución. Aunque la forma del electrodo varía, un electrodo siempre puede estar representado por una celda teórica equivalente.

Por lo tanto, en una realización, una fuerza iónica suficiente de un preparado listo para inyección puede tener, por ejemplo, al menos aproximadamente una conductividad de aproximadamente 4 mS/cm o superior. En otra realización, la fuerza iónica suficiente de una solución lista para inyección es de al menos aproximadamente 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8 o al menos aproximadamente 3,9 mS/cm.

También se puede usar una definición operativa de si una solución tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos para explicar la expresión "fuerza iónica suficiente". Por ejemplo, esto se puede basar en un experimento de adición de una solución de ensayo a sangre completa y la observación de la distancia de sedimentación de los eritrocitos (véase el Ejemplo 2, procedimiento de Westergren modificado adaptado). En una realización, si una solución de ensayo, cuando se mezcla con sangre entra a una proporción de 4:1 proporciona una sedimentación de los eritrocitos a 60 minutos que es inferior a aproximadamente 10 mm (véase el Ejemplo 2, Figuras 1 y 2, por ejemplo), entonces la solución de ensayo tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos. En otra realización, si una solución de ensayo, cuando se mezcla con sangre completa a una proporción de 4:1, proporciona una sedimentación de los eritrocitos a 60 minutos que es inferior a aproximadamente 5 mm, entonces la solución de ensayo tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos.

#### Osmolaridad de la solución

Los procedimientos de la invención proporcionan preparados farmacéuticos para inyección que son aproximadamente isotónicos con respecto a la sangre. Para determinar si una preparación farmacéutica es aproximadamente isotónica con respecto a la sangre, se calcula la osmolaridad para todos los componentes químicos de una solución que incluye el diluyente. La concentración osmolar de los preparados farmacéuticos para inyección (soluciones parenterales) puede ejercer efectos adversos sobre las células sanguíneas y los vasos del cuerpo humano. Se puede calcular la tonicidad para líquidos y medicamentos disueltos o diluidos, que se expresa en un valor numérico de miliosmoles por litro de líquido (mOsm/l). Este valor también se conoce como osmolaridad. La osmolaridad de la sangre varía entre 285 y 310 mOsm/l. Cuando se inyectan en la sangre las soluciones hipotónicas o hipertónicas, el fluido se desplaza hacia dentro o hacia fuera de las células, lo que puede causar una variedad de efectos negativos.

La osmolaridad de la solución se basa, en parte, en los conceptos de osmosis y presión osmótica. La osmosis es la difusión de solutos (partículas disueltas) o la transferencia de fluido a través de membranas semipermeables tales como vasos sanguíneos o membranas celulares. La presión osmótica, que facilita el transporte de moléculas a través de las membranas, se expresa en concentraciones osmolares y se denomina hiposmótica (hipotónica), isosmótica (isotónica) o hiperosmótica (hipertónica) en comparación con fluidos biológicos tales como la sangre o el plasma. El término "tonicidad" y la expresión "presión osmótica" se suelen considerar sinónimos.

La presión osmótica es la presión hidrostática (o hidráulica) requerida para oponerse al movimiento del agua a través de una membrana semipermeable en respuesta a un "gradiente osmótico" (es decir, concentraciones de partículas diferentes en los dos lados de la membrana). La osmolalidad sérica se puede medir mediante el uso de un osmómetro o se puede calcular como la suma de las concentraciones de los solutos presentes en la solución. El valor medido en el laboratorio normalmente se denomina osmolalidad. El valor calculado a partir de las concentraciones de soluto es informado por el laboratorio como la osmolaridad. La diferencia osmolar es la diferencia entre estos dos valores.

En el presente documento, la tonicidad y la presión osmótica deben considerarse sinónimos, y deben entenderse en su sentido amplio. La tonicidad puede significar la osmolalidad eficaz, y es igual a la suma de las concentraciones de los solutos en una solución que tienen la capacidad de ejercer una fuerza osmótica a través de una membrana, incluida una membrana celular. En sentido estricto, la osmolalidad es una propiedad de una solución particular y es independiente de cualquier membrana. La tonicidad es una propiedad de una solución en referencia a una membrana particular. Sin embargo, la invención se referirá a soluciones isotónicas con respecto a soluciones biológicas tales como la sangre o el plasma, y esta referencia incluirá el significado de que la solución particular es isotónica con sangre o plasma con respecto a una membrana celular de una célula en la sangre o en el plasma u otra solución biológica.

Se puede usar una definición operativa de tonicidad para explicar el término. Esto puede basarse en un experimento de adición de una solución de ensayo a la sangre completa y en la observación del resultado. Si los glóbulos rojos de la sangre completa se hinchan y se rompen, se dice que la solución de ensayo es hipotónica en comparación con el plasma normal. Si los glóbulos rojos se encogen y se someten a crenación, se dice que la solución de ensayo es hipertónica en comparación con el plasma normal. Si los glóbulos rojos permanecen invariables, se dice que la

solución de ensayo es isotónica con el plasma. La membrana celular de los glóbulos rojos es la membrana de referencia. Por ejemplo, la sangre completa colocada en solución salina normal (es decir, cloruro sódico al 0,9 %) no se hinchará, y por lo tanto, se dice que la solución salina normal es isotónica.

#### Características de las soluciones isotónicas

- 5 La invención proporciona procedimientos de preparación o disposición de formulaciones farmacéuticas para inyección en un sujeto, en los que las formulaciones se preparan en soluciones que son (1) aproximadamente isotónicas con respecto a la sangre (o plasma u otro fluido biológico) o no son tan hipertónicas o hipotónicas como para causar una hemólisis, trombosis o irritación vascular significativas; y (2) tienen fuerza iónica suficiente para prevenir la agregación de los eritrocitos.
- 10 En una realización, las formulaciones farmacéuticas isotónicas (con respecto a la sangre) listas para inyección tienen una tonicidad u osmolaridad que es superior a aproximadamente 270 mOsm/l e inferior de aproximadamente 330 mOsm/l. En una realización, las formulaciones farmacéuticas isotónicas listas para inyección tienen una tonicidad u osmolaridad que es superior a aproximadamente 270 mOsm/l e inferior a aproximadamente 328 mOsm/l.

15 Aunque las soluciones isotónicas tales como el cloruro sódico al 0,9 % y la dextrosa al 5 % son isotónicas, cuando se usan para reconstituir o diluir muchas formulaciones farmacéuticas, la solución resultante puede no tener suficiente fuerza iónica para prevenir la aglutinación de los eritrocitos (como para la dextrosa al 5 %) o puede tener demasiada fuerza iónica de manera que la solución resultante sea hipertónica. Por lo tanto, los procedimientos de la invención usan soluciones para dilución o reconstitución que contienen una concentración mínima de cloruro sódico para proporcionar (a) una fuerza iónica suficiente para mitigar la agregación de los eritrocitos; y (b) una tonicidad suficiente para prevenir la hemólisis y una concentración máxima de cloruro sódico para proporcionar (c) una tonicidad resultante que no sea tan elevada como para ser soluciones hipertónicas. Además, los procedimientos de la invención usan soluciones para dilución o reconstitución que pueden proporcionar una fuerza iónica y isotonicidad suficientes con respecto a la sangre, manteniendo a la vez un volumen de inyección práctico para la preparación farmacéutica.

#### Características de las soluciones hipotónicas

La invención proporciona procedimientos de preparación de formulaciones farmacéuticas para inyección en un sujeto, en el que las formulaciones se preparan en soluciones que no son hipotónicas con respecto a la sangre o no son hipotónicas (es decir, ligeramente hipotónicas con respecto a la sangre) para causar una hemólisis significativa. En una realización, las formulaciones farmacéuticas listas para inyección que se consideran ligeramente hipotónicas con respecto a la sangre pueden tener una tonicidad u osmolaridad que sea inferior a aproximadamente 270 mOsm/l y superior a aproximadamente 240 mOsm/l. En una realización, las formulaciones farmacéuticas listas para inyección que se consideran ligeramente hipotónicas con respecto a la sangre pueden tener una tonicidad u osmolaridad que sea inferior a aproximadamente 270 mOsm/l y superior a aproximadamente 220 mOsm/l.

Los ejemplos de soluciones hipotónicas incluyen muchos preparados farmacéuticos listos para inyección con agua estéril. Cuando se inyectan soluciones hipotónicas, se produce un cambio de fluido y el agua se traslada a las células endoteliales de la vena y de las células sanguíneas. Las células que absorben demasiada agua pueden estallar, y por lo tanto, la inyección de soluciones hipotónicas puede causar irritación las venas, flebitis y hemólisis.

#### Características de las soluciones hipertónicas

La invención proporciona procedimientos de preparación de preparados farmacéuticos para inyección en un sujeto, en los que los preparados se preparan en soluciones que no son hipertónicas con respecto a la sangre o que no son hipertónicas (es decir, ligeramente hipertónicas) para causar trombosis significativa y/o irritación vascular. En una realización, las formulaciones farmacéuticas listas para la inyección que se consideran ligeramente hipertónicas pueden tener una tonicidad u osmolaridad que es superior a aproximadamente 340 mOsm/l e inferior a aproximadamente 600 mOsm/l. En una realización, las formulaciones farmacéuticas listas para la inyección que se consideran ligeramente hipertónicas pueden tener una tonicidad u osmolaridad que es superior a aproximadamente 340 e inferior a aproximadamente 375, 400, 425, 450, 475, 500 o aproximadamente 575 mOsm/l. En general, las soluciones hipertónicas presentan una tonicidad que es superior a aproximadamente 340 mOsm/l. Las soluciones con una osmolaridad que es superior a 600 mOsm/l se deben usar con cuidado en las inyecciones.

Los ejemplos de soluciones hipertónicas no deseadas incluyen muchas formulaciones farmacéuticas que están listas para inyección con dextrosa al 10 %, o preparados farmacéuticos que tienen múltiples aditivos que afectan a la osmolaridad. Cuando se inyectan soluciones hipertónicas, se produce un desplazamiento de fluido y se extrae agua de las células endoteliales de la vena y de las células sanguíneas. Las células que pierden demasiada agua pueden encogerse, y por lo tanto, la inyección de soluciones hipertónicas puede causar irritación de la vena, flebitis y trombosis.

#### pH

El pH de la sangre varía de aproximadamente 7,35 a aproximadamente 7,45, que se considera neutro. Los

preparados farmacéuticos con un valor de pH inferior a 7 se consideran fármacos ácidos, y aquellos con un valor de pH inferior a 4,1 se consideran muy ácidos. Los fármacos con un valor de pH superior a 7,5 se consideran fármacos básicos o alcalinos, y aquellos con un valor de pH superior a 9,0 se consideran muy básicos o alcalinos. Las soluciones muy ácidas o muy alcalinas pueden producir flebitis y trombosis. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona soluciones de cloruro sódico para reconstituir formulaciones de fármacos liofilizadas o para diluir formulaciones de fármacos líquidas para preparar estas formulaciones para inyección intravenosa, en las que los preparados listos para inyección (1) no tienen un pH inferior a 4,1 ni superior a 9,0; (2) tienen una fuerza iónica suficiente para prevenir la agregación de los eritrocitos; y (3) son aproximadamente isotónicos (o ligeramente hipertónicos o hipotónicos) con respecto a la sangre, de manera que no se produzca hemólisis ni crenación en los glóbulos rojos. Sin embargo, el pH de una solución no es una consideración con respecto a si la solución tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la agregación de los eritrocitos. En otras palabras, si una formulación liofilizada cuando se reconstituye con agua tiene un pH que está por debajo de 4,1 o por encima de 9,0, esto no impide el uso de una solución de cloruro sódico para la reconstitución con el fin de prevenir la aglutinación de los eritrocitos.

#### Cálculo de la osmolaridad

La osmolaridad de cualquier preparado farmacéutico se puede calcular usando la siguiente fórmula: Osmolaridad = (peso de la sustancia (g) dividido entre el peso molecular de la sustancia (g/l) multiplicado por el número de especies multiplicado por 1.000 para la miliosmolaridad. El término "especie" se refiere al número de iones o especies químicas que se forman cuando se produce la disolución.

#### Formulaciones farmacéuticas listas o preparadas para inyección

La invención proporciona procedimientos de reconstitución de productos farmacológicos liofilizados en solución con el fin de preparar el producto farmacológico para inyección en un sujeto. El producto farmacéutico reconstituido está listo para la inyección por tener una fuerza iónica suficiente y una tonicidad que es aproximadamente isotónica con respecto a la sangre.

Los procedimientos de la invención también se refieren a la dilución de soluciones farmacológicas con el fin de preparar la solución farmacológica para inyección en un sujeto. La solución farmacológica diluida está lista para la inyección por tener una fuerza iónica suficiente y por ser aproximadamente isotónica con respecto a la sangre.

En una realización, el producto/la formulación farmacológico liofilizado o seco, si se reconstituye en agua, tiene una osmolaridad de aproximadamente 100 mOsm/l a aproximadamente 360 mOsm/l. Debido a que la invención proporciona procedimientos para la reconstitución usando soluciones de cloruro sódico de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 150 mM, el profesional debe usar una solución particular de cloruro sódico basada en la osmolaridad combinada esperada del producto farmacológico liofilizado reconstituido en la solución de cloruro sódico. Así pues, por ejemplo, si un producto farmacológico liofilizado reconstituido en agua tiene una osmolaridad de aproximadamente 300 mOsm/l, entonces la solución de NaCl para la reconstitución debe ser de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 30 mM. En otro ejemplo, si un producto farmacológico liofilizado reconstituido en agua tiene una osmolaridad de aproximadamente 100 mOsm/l, entonces la solución de NaCl para reconstitución debe ser de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 130 mM.

En una realización, un producto farmacológico (ya sea liofilizado o en solución) que se prepara para inyección mediante los presentes procedimientos no contiene HES (hidroxietilalmidón). Las formulaciones que contienen HES, a pesar de la reconstitución o la dilución con soluciones de NaCl para la fuerza iónica, pueden causar sedimentación y aglutinación de los eritrocitos en los experimentos *in vitro*. En otra realización, un producto farmacológico que se prepara para inyección mediante los presentes procedimientos no contiene dextranos, porque los procedimientos de Westergren modificados adaptados (véase el Ejemplo 2) muestran que la adición de NaCl no contrarrestarían el efecto de sedimentación potenciada que pueden causar los dextranos.

En una realización, la invención proporciona procedimientos de preparación de un preparado farmacéutico para inyección intravenosa en los que el preparado farmacéutico es una torta liofilizada que comprende un agente formador de volumen primario. El agente formador de volumen primario puede ser, por ejemplo, principalmente no ionizante. Los agentes formadores de volumen no ionizantes incluyen, pero sin limitación, manitol, glicina, sacarosa, lactosa, otros disacáridos, proteínas terapéuticas o el ingrediente activo de la propia formulación, u otros agentes formadores de volumen conocidos por los expertos en la materia. Las concentraciones de los agentes formadores de volumen no ionizantes no afectan significativamente si una solución tiene una fuerza iónica suficiente para evitar la aglutinación. Sin embargo, sus concentraciones tienen un efecto sobre la osmolaridad y, por lo tanto, sus concentraciones pueden tener un efecto sobre la tonicidad. La concentración de glicina, por ejemplo, es equivalente a su contribución a la osmolaridad, por lo que la glicina 10 mM es equivalente a 10 mOsm/l.

Los ingredientes proteicos de una formulación farmacológica, incluyendo los principios activos, no afectan significativamente a la fuerza iónica de una solución o a la osmolaridad de una solución. Por ejemplo, se supone un peso molecular de 50.000 para una proteína y se supone que se van a inyectar 2,5 mg de la proteína en una solución de 1-2 ml. Esto equivale a 0,05 mM, por lo tanto, la proteína no contribuye de forma apreciable a la osmolaridad.

Los preparados farmacéuticos también suelen contener tensioactivos, tales como polisorbato-80. El polisorbato-80 y otros tensioactivos son moléculas de gran peso molecular, de modo que las cantidades que normalmente están presentes en los preparados, tales como del 0,001 % al 0,01 %, son demasiado pequeñas para contribuir de manera apreciable a la osmolaridad o fuerza iónica. Otros tensioactivos incluyen Brij® 35, Brij® 30, Lubrol-px™, Triton X-10, Pluronic® F127 y dodecilsulfato sódico (SDS).

Otras moléculas de gran peso molecular que pueden estar presentes en pequeñas cantidades en formulaciones farmacéuticas que no afectan de manera apreciable a la osmolaridad o ionicidad son los polímeros, con la calificación de que no son sales como el sulfato de dextrano. Los polímeros ilustrativos incluyen dextrano, alcohol polivinílico (PVA), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), gelatina, polietilenglicol (PEG) y polivinilpirrolidona (PVP).

Las formulaciones farmacéuticas también suelen contener sacarosa u otros azúcares o polioles, a menudo en una cantidad del 0-2, 0-5 o 0-10 % o superior. Por ejemplo, se puede usar sacarosa al 5-10 % cuando la formulación no comprende un agente formador de volumen. En general, cuando se liofiliza una formulación y se identifican cantidades de la formulación en el presente documento como porcentajes o cantidades de molaridad, esto se refiere a los porcentajes y la molaridad de una solución antes de la liofilización (es decir, las cantidades de relleno). Así pues, cuando una solución tiene sacarosa al 1 %, esto es equivalente a 29,2 mM. Debido a que la sacarosa no se ioniza de manera apreciable ni se disocia en solución, 29 mM de sacarosa equivalen a 29 mOsm/l. Otros azúcares o polioles que no se ionizan ni disocian de manera apreciable en solución incluyen glicerol, xilitol, sorbitol, manitol (también se puede usar como agente formador de volumen), glucosa, inositol, rafinosa, maltotriosa, lactosa y trehalosa.

Las formulaciones farmacéuticas también pueden contener agentes tampón. Los agentes tampón incluyen, por ejemplo, acetato, citrato, glicina, histidina, fosfato (sodio o potasio), dietanolamina y Tris. Los agentes tampón incluyen aquellos agentes que mantienen el pH de la solución en un intervalo aceptable. Los agentes tampón tales como glicina, histidina y dietanolamina son, en su mayor parte, no ionizantes y, por tanto, sus concentraciones son equivalentes a la osmolaridad y deben tenerse en cuenta al considerar si una formulación lista para inyección es aproximadamente isotónica. Los agentes tampón tales como el acetato y el citrato normalmente son sales y, por lo tanto, son ionizantes, y sus concentraciones se multiplican con respecto al cálculo de su contribución a la osmolaridad de una solución.

Las formulaciones farmacéuticas pueden incluir esencialmente cualquier principio activo, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos, virus y compuestos químicos. Estas moléculas, en su mayoría, no afectan de manera apreciable a la fuerza iónica ni a la osmolaridad de una solución que se vaya a inyectar. Si estas moléculas son sales, como a menudo los compuestos de moléculas pequeñas son sales farmacéuticas, entonces pueden afectar de manera apreciable a la fuerza iónica y/o a la osmolaridad.

Ciertos aminoácidos también se encuentran en algunas formulaciones farmacéuticas y se usan como crioprotectores, lioprotectores y/o agentes formadores de volumen. Algunos aminoácidos tales como la histidina son, en su mayoría, no ionizantes y, por tanto, la concentración de un aminoácido en una formulación solo debe tenerse en cuenta al calcular la osmolaridad de una solución de modo que una formulación lista para inyección sea aproximadamente isotónica con respecto a la sangre.

#### BeneFIX®

BeneFIX® es producido por una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) genéticamente modificada que se caracteriza extensamente y se muestra que está libre de agentes infecciosos. Los bancos de células almacenados están libres de productos sanguíneos o plasmáticos. La línea celular CHO secreta factor IX recombinante (rFIX) en un medio de cultivo celular definido que no contiene ninguna proteína derivada de fuentes animales ni humanas, y el Factor IX recombinante se purifica mediante un procedimiento de purificación por cromatografía que no requiere una etapa de anticuerpo monoclonal y produce un producto activo de alta pureza. Se incluye una etapa de filtración por membrana que tiene la capacidad de retener moléculas con pesos moleculares aparentes > 70.000 (tales como proteínas grandes y partículas virales) para una seguridad viral adicional. BeneFIX® es predominantemente un componente único según la evaluación por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. La potencia (en unidades internacionales, UI) se determina usando un ensayo de coagulación *in vitro* en una etapa frente al patrón internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el concentrado de Factor IX. Una unidad internacional es la cantidad de actividad del factor IX presente en 1 ml de plasma humano normal agrupado. La actividad específica de BeneFIX® es mayor o igual a 180 UI por miligramo de proteína. BeneFIX® no está derivado de sangre humana ni contiene conservantes ni componentes animales o humanos añadidos.

BeneFIX® se formula como un preparado en polvo estéril, no pirogénico, liofilizado. BeneFIX® está destinado a la inyección intravenosa (IV). Está disponible en viales de un solo uso que contienen la cantidad marcada de actividad del Factor IX, expresada en unidades internacionales (UI). Cada vial contiene, por ejemplo, nominalmente 250, 500 o 1000 UI (o más, incluyendo 2.000 UI) de factor de coagulación IX (Recombinante). Tras la reconstitución del producto farmacológico liofilizado con agua estéril, las concentraciones de excipientes en las dosis de 500 y 1.000 UI son L-histidina 10 mM, sacarosa al 1 %, glicina 260 mM, polisorbato 80 al 0,005 %. Las concentraciones tras la reconstitución a la concentración de dosis de 250 UI son la mitad de las de las otras dos concentraciones de dosis.

Las concentraciones de dosis de 500 y 1.000 UI son isotónicas tras la reconstitución, y la concentración de dosis de 250 UI tiene la mitad de la tonicidad de las otras dos concentraciones de dosis tras la reconstitución. Todas las concentraciones de dosis producen una solución clara e incolora después de la reconstitución.

- 5 En una realización, la invención proporciona procedimientos de preparación de BeneFIX® para inyectar en un sujeto, en los que BeneFIX® se reconstituye en una solución de cloruro sódico, en los que la solución de cloruro sódico es superior a aproximadamente 25 mM e inferior a aproximadamente 150 mM. En una realización, la solución de cloruro sódico usada para reconstituir BeneFIX® es de aproximadamente 40 mM. En una realización, un vial de BeneFIX® liofilizado se reconstituye en aproximadamente 4-5 ml de una solución de cloruro sódico 25 mM-150 mM.

#### BeneFIX® reformulado (BeneFIX®-R)

- 10 Debido a la baja fuerza iónica de BeneFIX® reconstituido en agua, se hicieron diversas reformulaciones (BeneFIX® reformulado (BeneFIX®-R). El objetivo era añadir suficiente fuerza iónica a la formulación de BeneFIX® con el fin de mitigar el potencial de aglutinación de los glóbulos rojos. Para aumentar la fuerza iónica de BeneFIX®, el cloruro sódico se puede incorporar al producto reconstituido reemplazando sWFI como solución reconstituyente. Como alternativa, BeneFIX® se puede reformular añadiendo NaCl a la formulación previa a la liofilización, de modo que la reconstitución se puede conseguir todavía con agua, pero las soluciones de liofilización de sales son más difíciles y es más práctico simplemente reconstituir tortas liofilizadas con soluciones de NaCl. Esto también es cierto para otros preparados farmacéuticos liofilizados que no tienen una fuerza iónica suficiente cuando se reconstituyen con sWFI para prevenir la aglutinación.

- 20 En una realización, BeneFIX®-R se puede liofilizar en la misma formulación que BeneFIX® (L-histidina 10 mM, glicina 260 mM, sacarosa al 1 %, polisorbato 80 al 0,005 %) y solo la concentración de rFIX será diferente. A continuación, se puede usar el producto farmacéutico a granel BeneFIX®-R para rellenar, por ejemplo, a 4 ml por vial con L-histidina 10 mM, glicina 260 mM, sacarosa al 1 %, polisorbato 80 al 0,005 % y liofilizarse. Cuando se reconstituye BeneFIX®-R a 5 ml por vial con una solución de NaCl 25-150 mM, tal como con NaCl 40 mM, la concentración de los excipientes se reduce en un 20 % en comparación con la formulación de BeneFIX® actual previa a la liofilización. Esta estrategia produce una formulación que es (1) isotónica; (2) tiene suficiente fuerza iónica para reducir el potencial de aglutinación de glóbulos rojos; y (3) reduce el volumen de inyección para dosis más altas de rFIX. BeneFIX®-R se puede proporcionar, por ejemplo, con 250, 500, 1.000 y 2.000 UI de rFIX por concentración de dosis de vial. Así pues, después de la reconstitución con 5 ml de una solución de NaCl 25-150 mM, la solución de formulación de BeneFIX®-R resultante puede ser histidina de aproximadamente 7 a aproximadamente 9 mM; glicina de aproximadamente 188 a aproximadamente 220 mM; sacarosa del aproximadamente 0,7 % al aproximadamente 0,9 %; y polisorbato 80 al aproximadamente 0,004 %. Dependiendo de la cantidad de rFIX en un vial, por ejemplo, la reconstitución de 250, 500, 1.000 o 2.000 UI en 5 ml de una solución de NaCl daría lugar a una concentración de rFIX de aproximadamente 50, 100, 200 o 400 UI/ml, respectivamente. La osmolaridad de la formulación de BeneFIX®-R reconstituida en 5 ml de una solución de NaCl 40 mM es de aproximadamente 320 mOsm/l.

#### 35 Formulaciones ilustrativas para su preparación para inyección

- El Factor Recombinante IX también puede liofilizarse en las formulaciones descritas en patente de EE.UU. n.º 6.372.716. Las formulaciones descritas en la patente pueden usarse con la presente invención, donde las formulaciones no se limitan a tener rFIX como el principio activo. Así pues, por ejemplo, las formulaciones liofilizadas que se pueden reconstituir con soluciones de cloruro sódico 25 mM-150 mM para prepararlas para inyección, incluyen formulaciones que comprenden glicina, polisorbato, sacarosa, histidina y un principio activo. El principio activo puede ser esencialmente cualquier proteína, virus, ácido nucleico o compuesto químico, por ejemplo. La glicina puede tener una concentración, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 M a 0,3 M. El polisorbato puede tener una concentración, por ejemplo, del aproximadamente 0,001 al aproximadamente 0,05 %. La sacarosa puede tener una concentración, por ejemplo, del aproximadamente 0,5 % al aproximadamente 2 %. La histidina puede tener una concentración, por ejemplo, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM.

- 50 En una realización, una formulación liofilizada que se va a reconstituir con solución de cloruro sódico 25-150 mM comprende glicina de aproximadamente 0,1 a 0,3 M, sacarosa del aproximadamente 0,5 al 2 %, polisorbato del 0,001 al aproximadamente 0,05 %, histidina de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mM y de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/ml de un principio activo. El principio activo puede ser, por ejemplo, rFIX. En otra realización, una formulación liofilizada de rFIX que se va a reconstituir con solución de cloruro sódico 25-150 mM comprende de aproximadamente 0,13 a aproximadamente 3 mg/ml de rFIX o de aproximadamente 50 a aproximadamente 600 UI/ml de rFIX, glicina aproximadamente 0,26 M, histidina aproximadamente 10 mM, sacarosa al aproximadamente 1 % y polisorbato al aproximadamente 0,005 %.

#### Ejemplos de la invención

- 55 Los ejemplos descritos a continuación se proporcionan para ilustrar aspectos de la presente invención, y no se incluyen con el fin de limitar la invención.

Ejemplo 1. Efectos de los anticoagulantes y componentes de formulación sobre la aglutinación de los glóbulos rojos asociada con BeneFIX®

5 Existen informes ocasionales de la aglutinación de los glóbulos rojos asociada con BeneFIX® en las líneas de catéter de mariposa y jeringas. Estudios recientes realizados en sangre de perros hemofílicos demuestran que la aglutinación se produce en ausencia de FIX humano recombinante en el tampón de formulación. Por lo tanto, el presente estudio investigó si los anticoagulantes convencionales, varios componentes de BeneFIX® y la fuerza iónica afecta al fenómeno de aglutinación asociado a BeneFIX®.

10 Se obtuvo sangre de un grupo de voluntarios humanos anónimos y se recogió en tubos Vacutainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) que contenían un anticoagulante convencional, tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), citrato sódico o heparina.

15 Para ensayar la aglutinación, se mezclaron primero las muestras de sangre en los tubos Vacutainer de manera continua en un nutator. Se diluyó sangre, 12,5 µl en 87,5 µl de una solución de ensayo en una placa de cultivo celular de 48 pocillos y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos antes de la observación bajo un microscopio de contraste de fase invertida con un aumento de 400. Se grabó cada pocillo en video para capturar imágenes fijas con el fin de anotar la aglutinación de los glóbulos rojos de acuerdo con los siguientes criterios enumerados a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: Leyenda de las puntuaciones de aglutinación de glóbulos rojos

Puntuación	Fenotipo de aglutinación
0	Sin aglutinación, la mayoría son células individuales, pocos dobletes u ocasionales
1	La mayoría de las células individuales, agregados pequeños dispersados
2	Muchos agregados pequeños, todavía algunas células individuales en el fondo.
3	Agregados principalmente de pequeños a medianos con células individuales ocasionales
4	Agregados celulares masivos

20 *Efectos de los anticoagulantes convencionales sobre la aglutinación de los glóbulos rojos:* el primer estudio incluyó el ensayo de muestras de sangre de tres donantes. Se recogió sangre en tubos Vacutainer con EDTA, heparina y citrato de sodio para cada donante. Los artículos de ensayo incluían BeneFIX®, 100 UI/ml, reconstituido en cada una de las siguientes concentraciones de NaCl: NaCl 0 mM (sWFI), 20 mM, 40 mM, 60 mM y 77 mM. Además, se incluyó dextrosa al 5 % en agua (D5W) como control positivo. Se diluyeron las muestras en una proporción de sangre con respecto a BeneFIX® o de sangre con respecto a D5W de 1:8. Las imágenes se capturaron, se almacenaron digitalmente, se enmascararon y se registraron en cuanto a la aglutinación. Dos minutos después de la adición de sangre al BeneFIX® reconstituido con sWFI, se observó aglutinación en las muestras de los tres donantes independientemente del tipo de anticoagulante usado. Al ir aumentando las concentraciones de NaCl, se fue atenuando la respuesta de aglutinación. Se observó una notable aglutinación cuando se añadió sangre a D5W.

30 *Efectos del NaCl sobre la aglutinación de los glóbulos rojos en donantes previamente seleccionados:* se recogieron muestras de donantes en tubos Vacutainer heparinizados. Debido a la aglutinación espontánea que se ha observado en algunas muestras anteriores, todos los donantes fueron inicialmente seleccionados usando NaCl 154 mM. Si se observó aglutinación, la muestra fue descalificada de ensayos adicionales. Las muestras restantes de cada donante se diluyeron a 1:8 en una de las dos formulaciones: (1) 100 UI/ml de BeneFIX® reconstituido con sWFI; y (2) 100 UI/ml de BeneFIX® reconstituido con NaCl 154 mM. Las imágenes se capturaron, se almacenaron digitalmente, se enmascararon y se registraron en cuanto a la aglutinación. Se observó aglutinación con BeneFIX® reconstituido con SFWI, mientras que la reconstitución con NaCl 154 mM redujo o eliminó la reacción de aglutinación (véase la Tabla 2 para las puntuaciones).

Tabla 2: Puntuaciones de aglutinación

Donante	Control previo a la exploración con NaCl 154 mM	BeneFIX® + sWFI	BeneFIX® + NaCl 154 mM
7	0	2	1
11	0	3	0
8	0	3	0
28	0	3	0
41	0	3	1

5 Efecto de los componentes de formulación y de la concentración de BeneFIX®: se evaluaron varias formulaciones de BeneFIX® para determinar el impacto de diferentes componentes en la aglutinación de los glóbulos rojos. Se prepararon ocho mezclas diferentes, con y sin NaCl 154 mM, para un total de 16 mezclas (Tabla 3). Se examinaron doce donantes para la aglutinación espontánea y dos fueron descalificados de estudio adicional. Se usaron muestras de sangre de cinco de los diez donantes restantes para las 8 primeras formulaciones (muestras 1-A a 1-H) y las otras cinco muestras de donantes para las segundas 8 formulaciones (muestras 2-I a 2-P). Se diluyeron las muestras a 1:8 como antes, y las imágenes se capturaron y se registraron como se ha descrito anteriormente.

Tabla 3: Matriz de diseño de la formulación

( +/- indica la presencia/ausencia de un ingrediente)						
ID del conjunto/muestra	Concentración de BeneFIX® (UI/ml)	Glicina (GLY) 260 mM	Sacarosa a 10 mg/ml	Tween-80 (Polisorbato-80) al 0,005 %	Histidina (HIS) 10 mM	NaCl 154 mM
1-A, BeneFIX®	100	+	+	+	+	-
1-B, BeneFIX®	100	+	+	+	+	+
1-C, BeneFIX®	300	+	+	+	+	-
1-D, BeneFIX®	600	+	+	+	+	+
1-E, BeneFIX®	600	+	+	+	+	-
1-F, BeneFIX®	-	+	+	+	+	+
1-G, Sin BeneFIX®	-	+	+	+		-
1-H, Sin BeneFIX®	100	-	+	+	+	+
2-I, BeneFIX®, sin GLY	100	-	+	+	+	-
2-J, BeneFIX®, sin GLY	100	+	+	+	+	+

(continuación)

(±/- indica la presencia/ausencia de un ingrediente)						
ID del conjunto/muestra	Concentración de BeneFIX® (UI/ml)	Glicina (GLY) 260 mM	Sacarosa a 10 mg/ml	Tween-80 (Polisorbato-80) al 0,005 %	Histidina (HIS) 10 mM	NaCl 154 mM
2-K, sin sacarosa	100	+	-	+	+	-
2-L, sin sacarosa	100	+	-	+	+	+
2-M, BeneFIX®, sin Tween-80	100	+	+	-	+	-
2-N, sin Tween-80	100	+	+	-	+	+
2-O, BeneFIX®, sin His	100	+	+	+	-	-
2-P, BeneFIX®, sin His	100	+	+	+	-	+

Las puntuaciones de aglutinación para el experimento expuesto en la Tabla 3 se muestran a continuación en las Tablas 4A y 4B. No se asoció ningún componente particular, ya sea el principio activo o un excipiente, del preparado de BeneFIX® con la aglutinación. Como era de esperar, la eliminación de la glicina causó la lisis de los glóbulos rojos debido a la hipotonicidad de la solución. Sin embargo, la reconstitución con NaCl 154 mM redujo o eliminó la aglutinación *in vitro* y la lisis.

5

Tabla 4A: Puntuaciones de aglutinación – Variando la concentración de BeneFIX®

ID del donante de la muestra	1-A	1-B	1-C	1-D	1-E	1-F	1-G	1-H
6	4	1	2	1	4	1	3	2
14	3	0	2	3	3	1	2	4
19	4	1	3	0	3	1	3	1
40	1	0	2	1	2	2	3	1
43	3	0	3	1	4	0	3	3
<i>Puntuación media</i>	3	0,4	2,4	1,2	3,2	1	2,8	2,2

Tabla 4B: Puntuaciones de aglutinación – Efectos de los excipientes

ID del donante de la muestra	2-I	2-J	2-K	2-L	2-M	2-N	2-O	2-P
1	Lisis	1	2	0	3	1	3	0
11	4	0	4	1	3	1	2	0

(continuación)

ID del donante de la muestra	2-I	2-J	2-K	2-L	2-M	2-N	2-O	2-P
18	Lisis	1	4	1	3	2	3	2
34	Lisis	0	2	0	2	2	3	2
45	Lisis	1	4	1	4	3	2	3
<i>Puntuación media</i>	Lisis	0,6	3,2	0,6	3	1,8	2,6	1,4

5 *Efectos de las concentraciones inferiores de NaCl en la aglutinación de los glóbulos rojos en donantes previamente seleccionados:* las muestras de donantes se recogieron en tubos Vacutainer heparinizados. Debido a que se había observado aglutinación en algunas muestras anteriores, todos los donantes fueron inicialmente seleccionados con NaCl 154 mM. Si se observó aglutinación, la muestra fue descalificada de ensayos adicionales. El resto de muestras de cada donante se diluyeron a 1:8 como antes en una de tres formulaciones: (1) 100 UI/ml de BeneFIX® con sWFI; (2) 100 UI/ml de BeneFIX® con NaCl 40 mM; o (3) 100 UI/ml de BeneFIX® con NaCl 77 mM. Las imágenes fueron capturadas, recogidas y registradas como antes. Los resultados se proporcionan en la siguiente Tabla 5. Se observó aglutinación en las cinco muestras con BeneFIX® reconstituido con agua, mientras que la reconstitución de BeneFIX® con NaCl 40 mM o 77 mM redujo o eliminó la reacción de aglutinación.

Tabla 5: Puntuaciones de aglutinación

Donante n.º	NaCl 154 mM	BeneFIX® + sWFI	BeneFIX® + NaCl 40 mM	BeneFIX® + NaCl 77 mM
8	0	3	1	2
34	0	3	2	1
39	0	4	3	1
40	0	3	0	1
47	0	3	1	1
<i>Puntuación media</i>	0	3,2	1,4	1,2

15 *Análisis:* se produjo la aglutinación de los glóbulos rojos en sangre anticoagulada con heparina, EDTA o citrato de sodio cuando se mezcló con BeneFIX® a una proporción en volumen de sangre con respecto a BeneFIX® reconstituido de 1:8. No se observó ningún efecto del tipo anticoagulante sobre la aglutinación; por lo tanto, la heparina se usó como anticoagulante en evaluaciones posteriores. En algunas muestras, la aglutinación se produjo en presencia de NaCl al 0,9 % solo (control negativo para la aglutinación). Por lo tanto, las evaluaciones posteriores se realizaron solo con muestras que no mostraron aglutinación con el control de NaCl al 0,9 %.

20 Se evaluaron los efectos de tres concentraciones de BeneFIX® (100, 300 o 600 UI/ml) y de cada componente individual de BeneFIX®, reconstituido en solución de sWFI o NaCl para la aglutinación de los glóbulos rojos cuando se mezclaron con sangre anticoagulada con heparina a una proporción en volumen de sangre con respecto a BeneFIX® de 1:8. La eliminación de cualquier componente particular, incluyendo la proteína FIX recombinante humana, no tuvo efecto sobre la respuesta de aglutinación. Esto indica que puede prepararse una amplia selección de diferentes formulaciones farmacéuticas (reconstituidas o diluidas) con soluciones de NaCl para la inyección intravenosa. La eliminación de la glicina dio lugar a la lisis de los glóbulos rojos. Sin embargo, el uso de 40 mM (NaCl al 0,234 %, inyectable), 77 mM (NaCl al 0,45 %, inyectable) o NaCl 154 mM (NaCl al 0,9 %, inyectable) para la reconstitución redujo o eliminó la respuesta de aglutinación y lisis.

25 Por lo tanto, estos resultados muestran que ningún componente particular de la formulación de BeneFIX® está relacionado con la aglutinación observada. Aunque la eliminación de la glicina de la formulación de BeneFIX® y la

reconstitución con agua da lugar a una solución hipotónica que causa lisis, osmolaridad y tonicidad, esto es un problema distinto de la fuerza iónica y la aglutinación. Los resultados muestran que la aglutinación está asociada con la baja fuerza iónica del Factor IX recombinante reconstituido (rFIX) en sWFI, y la reconstitución con NaCl atenúa o elimina la aglutinación. Por lo tanto, la reconstitución de otras formulaciones farmacéuticas con soluciones de NaCl, incluso soluciones de NaCl que tienen una concentración inferior a 154 mM, pueden prevenir tanto la aglutinación como la lisis tras la inyección intravenosa.

Ejemplo 2: Adaptación del procedimiento de Westergren modificado de medición de la velocidad de sedimentación de los eritrocitos para evaluar la agregación de los eritrocitos inducida por agentes farmacéuticos o formulaciones

La formulación de BeneFIX® comercializada actualmente es una formulación no iónica. Durante la administración de la formulación de BeneFIX® reconstituida en sWFI, ha habido observaciones poco frecuentes de agregación de los eritrocitos (es decir, aglutinación) cuando se mezcla la sangre de un paciente con el BeneFIX® reconstituido, tal como un tubo intravenoso. La invención proporciona el descubrimiento de que la agregación de los eritrocitos está asociada con la formulación, no con rFIX, y se evita usando diluyentes que contienen NaCl al menos aproximadamente 40 mM. Para ayudar en el diseño de diluyentes personalizados que contengan NaCl al menos aproximadamente 40 mM, se diseñó un ensayo cuantificable que se puede usar para medir la sedimentación de los eritrocitos, que es un procedimiento establecido para evaluar la agregación de los eritrocitos *in vitro*. Se adaptó el procedimiento de Westergren modificado, en el que la sangre se diluye a 4:5 en solución salina normal, para evaluar la agregación en sangre que se había diluido a 1:4 o 1:8 con soluciones salinas o soluciones de ensayo (es decir, diluyentes personalizados).

Se obtuvo sangre humana de voluntarios adultos sanos y se recogió en tubos que contenían EDTA. Para demostrar la idoneidad de las muestras de sangre para los experimentos de sedimentación, se midió la velocidad de sedimentación de los eritrocitos definida clínicamente ESR60 mediante el procedimiento de Westergren modificado. En resumen, se diluyó la sangre bien mezclada a 4:5 con NaCl 154 mM, se mezcló bien suavemente, y luego se cargó inmediatamente en un tubo de Westergren de auto-puesta a cero que se había colocado en un estante personalizado de 10 tubos. Se midió y se registró la distancia en mm desde la marca de cero en la parte superior del tubo hasta la superficie de contacto del plasma y los eritrocitos después de 60 minutos. Se compararon los resultados de ESR60 con los valores de referencia normales publicados (Morris, M. W. y col., "Basic examination of blood", in Henry, J. B., ed., *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, Filadelfia, PA, WB Saunders, 2001: 479-519).

Se realizaron dos experimentos para mostrar la idoneidad del procedimiento de Westergren modificado adaptado para evaluar la agregación de los eritrocitos asociada con las formulaciones farmacéuticas. Las muestras de sangre humana eran adecuadas para su uso en estos ensayos, porque todas tenían valores de ESR60 que estaban dentro de los límites normales. Estas muestras se diluyeron a 1:4 en el primer experimento y se diluyeron a 1:8 en el segundo.

En el primer experimento, la sedimentación de los eritrocitos se aumentó mediante dextrano 70 al 5 % o BeneFIX® reconstituido con sWFI o NaCl 10 mM. En 5 minutos, los agregados eran visibles en los tubos que se habían cargado con sangre diluida bien con dextrano 70 al 3 % o con BeneFIX® reconstituido en sWFI. En 60 minutos, la sedimentación de los eritrocitos en estos tubos se mejoró notablemente en comparación con el control salino (Tabla 6). A los 90 minutos, la sangre de un donante que se diluyó en BeneFIX® reconstituido en NaCl 10 mM tenía un patrón de sedimentación bifásico con una superficie de contacto transparente entre los eritrocitos y el plasma situada a 8 mm de la marca de cero y otra superficie de contacto entre los eritrocitos empaquetados densamente y los empaquetados menos densamente situada a 149 mm de la marca de cero.

Tabla 6: Sedimentación eritrocítica de sangre humana diluida a 1:4 en BeneFIX® o dextrano al 3 % (distancia de la sedimentación en mm medida desde la marca de cero)

Donante y tiempo de dilución	Solución salina	NaCl 0 mM	NaCl 10 mM	NaCl 20 mM	NaCl 30 mM	NaCl 40 mM	NaCl 50 mM	NaCl 60 mM	NaCl 77 mM	NaCl 154 mM	Dextrano 70 al 3 %
Donante 5											
60 min	2	135	nd	2	2	2	1	1	2	1	132
90 min	3	145	nd	4	3	3	3	2	2	2	159
120 min	4	150	nd	5	4	4	4	3	4	3	167

(continuación)

Donante y tiempo de dilución	Solución salina	NaCl 0 mM	NaCl 10 mM	NaCl 20 mM	NaCl 30 mM	NaCl 40 mM	NaCl 50 mM	NaCl 60 mM	NaCl 77 mM	NaCl 154 mM	Dextrano 70 al 3 %
Donante 5											
150 min	6	153	nd	7	6	5	5	5	5	5	169
Donante 22											
60 min	0	161	4	3	0	0	0	0	0	nd	145
90 min	3	164	149	3	3	3	2	2	3	nd	166
120 min	4	166	151	6	4	4	4	3	4	nd	171
150 min	7	167	152	8	6	5	5	5	6	nd	172
Las concentraciones de NaCl son las usadas para reconstituir BeneFIX®											

En el segundo experimento, la sedimentación de los eritrocitos se aumentó con dextrosa al 5 %, "MFR-927" (el tampón de formulación para BeneFIX® que carece de rFIX) y BeneFIX® reconstituido con NaCl 10 mM (Tabla 7). A diferencia del primer experimento, la sedimentación en estos tubos fue rápida con una sedimentación máxima o casi máxima alcanzada en 15 a 30 minutos.

5

Tabla 7: Sedimentación eritrocítica de sangre humana diluida a 1:8 en MFR-927, BeneFIX® o dextrosa al 5 % (distancia de la sedimentación en mm medida desde la marca de cero)

Donante y tiempo de dilución	Solución salina	MFR-927	NaCl 10 mM	NaCl 25 mM	NaCl 30 mM	NaCl 40 mM	NaCl 50 mM	NaCl 60 mM	NaCl 77 mM	Dextrosa al 5 %
Donante 56										
15 min	0	>180	~155	1	0	0	0	0	0	175
30 min	0	>180	177	2	1	0	0	0	0	178
45 min	1	>180	180	3	2	1	1	1	1	179
60 min	2	>180	>180	3	2	1	1	1	1	180

(continuación)

Donante y tiempo de dilución	Solución salina	MFR-927	NaCl 10 mM	NaCl 25 mM	NaCl 30 mM	NaCl 40 mM	NaCl 50 mM	NaCl 60 mM	NaCl 77 mM	Dextrosa al 5 %
Donante 57										
15 min	0	>180	180	1	1	0	0	0	0	179
30 min	1	>180	>180	2	2	1	0	1	1	>180
45 min	1	>180	>180	3	3	1	2	1	1	>180
60 min	2	>180	>180	4	3	2	3	2	2	>180

Las concentraciones de NaCl son las usadas para reconstituir BeneFIX®; MFR-927 es el tampón de formulación para BeneFIX® carente de rFIX.

Los resultados de estos experimentos demuestran que el procedimiento de Westergren modificado usado para medir la sedimentación de los eritrocitos puede adaptarse para evaluar la agregación de los eritrocitos inducida por preparados o formulaciones farmacéuticas. Por ejemplo, la medición de la sedimentación de los eritrocitos en tubos de Westergren 60 minutos después de cargar sangre diluida a 1:4 con soluciones de ensayo es suficiente para distinguir entre los agentes que aumentan la agregación (es decir, dextrosa al 5 %, dextrano 70 al 3 %, MFR-927 y BeneFIX® reconstituido en sWFI) de los que no (es decir, solución salina BeneFIX® reconstituido en diluyentes que contienen NaCl aproximadamente 25 mM o superior).

Ejemplo 3: adecuación de NaCl 40 mM en diluyente para BeneFIX® reformulado para mejorar la agregación de los eritrocitos asociada con la formulación

La formulación no iónica de BeneFIX® comercializado en la actualidad se ha asociado con la agregación de los eritrocitos *in vitro*, que puede ocurrir durante la administración cuando se mezcla la sangre del paciente con BeneFIX® en tubos intravenosos. La invención proporciona el descubrimiento de que la agregación de los eritrocitos está asociada con la formulación, no con el Factor IX recombinante, y la agregación puede prevenirse reconstituyendo BeneFIX® con diluyentes que contienen NaCl al menos 40 mM.

Un objetivo de este ejemplo es ensayar la consistencia de un diluyente 40 mM para reconstituir preparados de BeneFIX® reformulados (BeneFIX®-R). En concreto, los experimentos se diseñaron para determinar si las concentraciones de NaCl que se desvían de 40 mM hasta en un 10 % son suficientes para prevenir la agregación de los eritrocitos asociada a la formulación, que se evaluó mediante el procedimiento de Westergren modificado adaptado para medir la velocidad de sedimentación de los eritrocitos (ESR). Además, se evaluó la consistencia de la concentración de NaCl en la sedimentación de los eritrocitos en ambos viales de dosis alta (es decir, 2000 UI) y baja dosis (es decir, 250 UI) de BeneFIX®-R.

Se midió el efecto de las formulaciones de BeneFIX®-R, MFR-927 y dextrano 70 al 3 % sobre la sedimentación de los eritrocitos a temperatura ambiente usando una adaptación del procedimiento de Westergren modificado, como se ha descrito en el Ejemplo 2. El diseño del estudio se describe en la Tabla 8.

Tabla 8: Diseño del estudio para el Ejemplo 3

Grupo	Tratamiento	Número de experimentos	Número total de muestras de donantes evaluadas	Dilución de la sangre evaluada
1	Solución salina	4	12	1:4
2	MFR-927	4	12	1:4

(continuación)

Grupo	Tratamiento	Número de experimentos	Número total de muestras de donantes evaluadas	Dilución de la sangre evaluada
3	BeneFIX®-R (55 UI/ml); NaCl 36 mM	4	12	1:4
4	BeneFIX®-R (55 UI/ml); NaCl 40 mM	4	12	1:4
5	BeneFIX®-R (55 UI/ml); NaCl 44 mM	4	12	1:4
6	BeneFIX®-R (440 UI/ml); NaCl 36 mM	4	12	1:4
7	BeneFIX®-R (440 UI/ml); NaCl 40 mM	4	12	1:4
8	BeneFIX®-R (440 UI/ml); NaCl 44 mM	4	12	1:4
9	Dextrano 70 al 3 %	4	12	1:4

- 5 El día de un experimento, se reconstituyeron los viales de BeneFIX®-R tanto de alta dosis (viales de BeneFIX®-R liofilizado que contienen ~2000 UI de rFIX) como de baja dosis (viales de BeneFIX®-R liofilizado que contienen ~250 UI de rFIX) inmediatamente antes de su uso con 5 ml de NaCl 36 mM, 40 mM o 44 mM. La solución de control positivo, dextrano 70 al 3 % (p/v), se preparó en solución salina tamponada con fosfato, exenta de calcio y magnesio, modificada por Dulbecco, estéril, (PBS-CMF, pH 7,4). Se obtuvo sangre humana de donantes y se recogió en tubos Vacutainer que contenían EDTA. Se usaron muestras de sangre para los experimentos de sedimentación de los eritrocitos en las 3 horas siguientes a la recogida.
- 10 Se diluyó sangre completa a 1:4 en las soluciones de ensayo (es decir, se añadieron 400 µl de sangre completa a 1,2 ml de la solución de ensayo), se mezcló bien y luego se cargó en tubos de Westergren de vidrio desechables autoajustables que se sujetaron en sentido absolutamente vertical en un estante personalizado dedicado. Se midió y se registró la sedimentación de los eritrocitos después de 60 minutos, que es la distancia en mm desde la marca de cero en la parte superior del tubo hasta la superficie de contacto del plasma y los eritrocitos.
- 15 Los resultados de los 12 donantes fueron similares. El tampón de formulación de BeneFIX® comercializado en la actualidad que carecía de rFIX (MFR-927) y dextrano 70 al 3 %, una solución de control positivo convencional, mostraron una sedimentación de los eritrocitos mejorada en comparación con la sangre que se había mezclado en soluciones de ensayo de NaCl (véase la Figura 1). Independientemente de la concentración de NaCl en el tampón (36 mM, 40 mM o 44 mM) o la concentración de rFIX en el producto, BeneFIX®-R no mejoró la sedimentación de los eritrocitos, siempre y cuando se reconstituyó con un diluyente de NaCl.
- 20 Los resultados de este estudio demuestran que las concentraciones de NaCl al 10 % superiores o inferiores a 40 mM en los diluyentes BeneFIX®-R son suficientes para prevenir la sedimentación o la agregación mejorada de los eritrocitos (aglutinación). Los resultados también muestran que el efecto mejorador del NaCl en la agregación de los eritrocitos asociada a la formulación no se vio afectado por la concentración del principio activo (es decir, rFIX).
- 25 Ejemplo 4: Papel de la fuerza iónica en el tampón para la reconstitución de BeneFIX® en la generación de aglutinación de glóbulos rojos
- 30 Se recogió sangre humana por punción venosa de cuatro donantes diferentes en tubos colectores heparinizados convencionales. Se ensayó la formación de aglutinantes de glóbulos rojos mediante la extracción de 2,6 ml de tampón o proteína BeneFIX® reconstituida en jeringas, seguidos de 0,6 ml de sangre heparinizada. Se observó el comportamiento de mezcla/sedimentación de los aglutinados en estas jeringas a lo largo del tiempo y se registró fotográficamente usando una cámara digital.

La composición de la formulación BeneFIX® actual previa a la liofilización es rFIX, histidina aproximadamente 10 mM, glicina aproximadamente 260 mM, sacarosa al aproximadamente 1 % y polisorbato-80 al aproximadamente 0,005 %, pH 6,8. Se liofiliza la formulación BeneFIX®, y antes de la inyección, se reconstituye en sWFI. Originalmente, se sospechaba que la sacarosa era la causa de la aglutinación. Por lo tanto, los tampones de ensayo se formulaban con sacarosa al 1 %, 0,5 % o 0 %. Se preparó cada tampón de ensayo de sacarosa en jeringas, seguido de una pequeña cantidad de sangre heparinizada. Se encontró que la aglutinación de glóbulos rojos y la sedimentación rápida posterior eran idénticas para los tres tampones, lo que sugiere que el contenido en sacarosa de la formulación BeneFIX® no explicaba la aglutinación observada. BeneFIX® reconstituido en solución salina normal, en lugar de en agua estéril, no causó aglutinación. Estos datos indican que la fuerza iónica de la formulación BeneFIX® no es suficiente para prevenir la aglutinación cuando BeneFIX® se reconstituye en agua.

Para determinar la fuerza iónica mínima necesaria para eliminar la aglutinación, BeneFIX® se reconstituyó (o se puede variar la formulación previa a la liofilización de BeneFIX® para incluir cloruro sódico, aunque los procedimientos de liofilización de las formulaciones de cloruro sódico son más difíciles en comparación con formulaciones liofilizantes que no tienen cloruro sódico) con soluciones que tienen concentraciones variables de NaCl (0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 y 137 mM). BeneFIX® también se reconstituyó en solución salina normal que contenía NaCl 154 mM. Se examinó el comportamiento de aglutinación y sedimentación de los glóbulos rojos en todas estas soluciones. La Tabla 9 muestra la osmolalidad y las fuerzas iónicas (expresadas como conductividad) de algunas de estas soluciones junto con otras soluciones intravenosas comunes. Tras la adición de cloruro sódico a la formulación de BeneFIX®, ya sea por adición directa antes de la liofilización o por reconstitución de un liofilizado con una solución de cloruro sódico, cabría esperar que el NaCl se disociara completamente a una concentración equivalente de iones de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. Por lo tanto, cabría predecir que la fuerza iónica (expresada en mEq/l (miliequivalentes/l) de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>) de un tampón de formulación más NaCl sería equivalente a la concentración de NaCl si el tampón de formulación no contiene otros iones.

Tabla 9: Caracterización de diversas soluciones

Soluciones	Osmolalidad calculada aproximada (mOsm/l)	Conductividad calculada aproximada (mS/cm)	pH
Formulación de BeneFIX®	300	0 (conductividad observada es < 0,2 mS/cm)	6,8
Formulación de BeneFIX® + NaCl 10 mM	320	1	6,8
Formulación de BeneFIX® + NaCl 20 mM	340	2	6,8
Formulación de BeneFIX® + NaCl 40 mM	380	4	6,8
Formulación de BeneFIX® + NaCl 80 mM	460	7	6,8
Formulación de BeneFIX® + NaCl 137 mM	574	12,8	6,8
Formulación de BeneFIX® + NaCl 154 mM	607	14,4	6,8
Cloruro sódico al 0,9 % (equivalente a NaCl 154 mM; 154 mEq/l de iones de Na <sup>+</sup> y de Cl <sup>-</sup> )	308	14,4	6,0
Inyección de dextrosa al 5 %	250	0	4,5

Tras el contacto de la sangre con las soluciones de la Tabla 9 en jeringas, se observó individualmente la aglutinación de los glóbulos rojos, y después se mezclaron las jeringas suavemente y se invirtieron para observar la sedimentación de la sangre. No se observó la formación de aglutinados en todas las formulaciones de BeneFIX® reconstituido con NaCl al menos 40 mM (cabe señalar que en el ejemplo anterior, NaCl aproximadamente 36 mM también bastó para prevenir la aglutinación). El comportamiento de las células sanguíneas en estas soluciones que contenían NaCl al menos 40 mM era indistinguible de aquél en solución salina normal.

Se ensayó la sedimentación sanguínea en una serie de jeringas que contenían una formulación BeneFIX® diluida (si era previa a la liofilización)/reconstituida (si estaba liofilizada) a concentraciones decrecientes de NaCl (comenzando

5 a 40 mM) 15 minutos después de la inversión. Se produjo una respuesta dependiente de la concentración uniforme en términos de la formación de aglutinantes y la consiguiente velocidad de sedimentación - aglutinación creciente y sedimentación más rápida con una concentración decreciente de NaCl en el tampón. Se observó una aglutinación evidente con una muestra de sangre en tampón que contenía  $\leq 25$  mM de NaCl y con otra muestra de sangre en tampón que contenía NaCl  $\leq 30$  mM. En todos los preparados de tampón con NaCl  $\geq 40$  mM, el comportamiento de las células sanguíneas fue indistinguible de la solución salina normal o de BeneFIX® reconstituido en solución salina normal. BeneFIX® reconstituido con NaCl 40 mM corresponde a una conductividad calculada de 4 mS/cm.

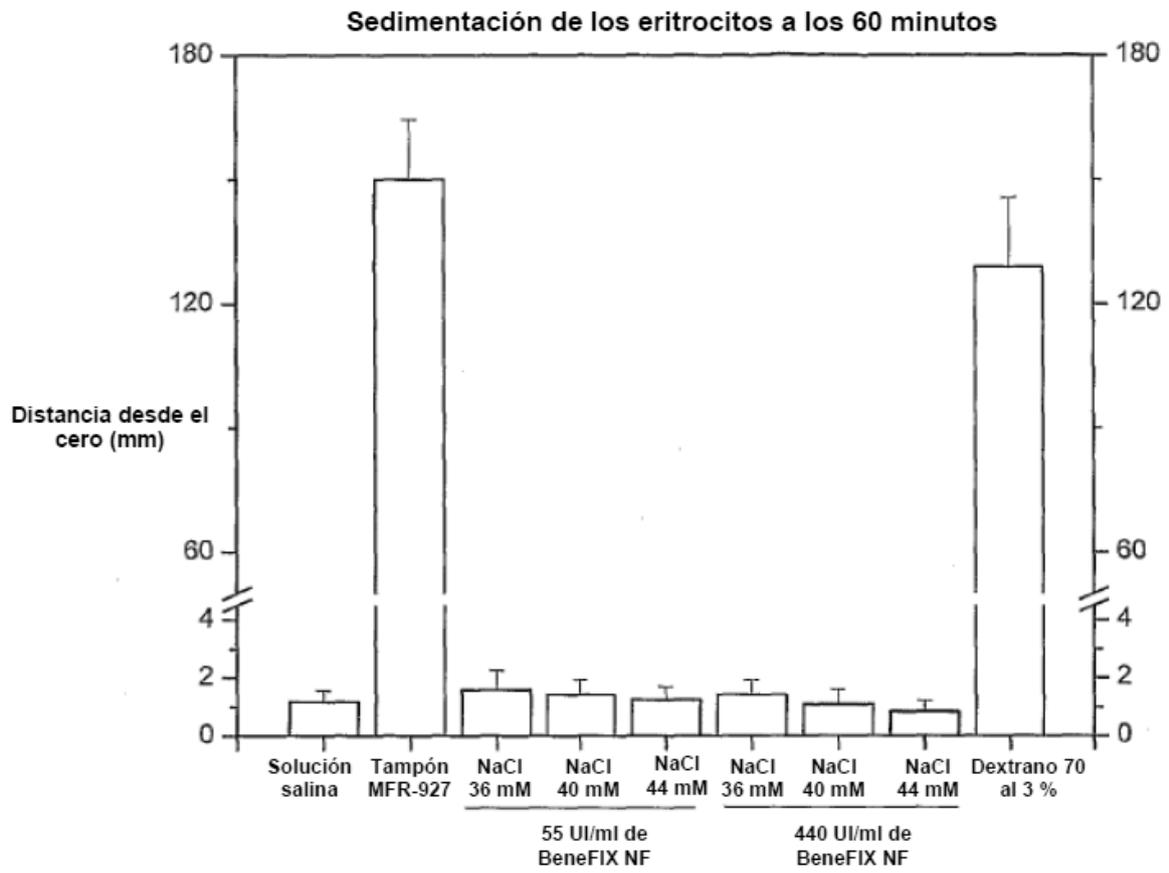
10 La solución de inyección de dextrosa al 5 %, cada ml de la cual contiene 50 mg de dextrosa hidratada USP en agua para inyección - tiene una osmolalidad calculada de 250 mOsm/l y una fuerza iónica calculada de 0 mS/cm. Esta solución, que se administra comúnmente por vía intravenosa, también causó aglutinación de los glóbulos rojos y sedimentación sanguínea muy rápida similar a la observada con la formulación BeneFIX® reconstituida en agua.

15 Por lo tanto, estos resultados indican que la aglutinación de los glóbulos rojos causada por BeneFIX® reconstituido en agua se debe a la baja fuerza iónica de la formulación BeneFIX® (fuerza iónica calculada de 0 mEq/l, conductividad medida  $< 0,2$  mS/cm). Este problema se puede corregir reconstituyendo en soluciones de NaCl que tienen NaCl  $\geq 40$  mM de manera que la solución reconstituida para inyección tenga una fuerza iónica calculada de aproximadamente 40 mEq/l (la fuerza iónica suficiente para evitar la aglutinación también se puede calcular como una conductividad de aproximadamente 4 mS/cm o superior) o superior.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una formulación de Factor IX para inyección intravenosa, procedimiento que comprende la adición de una solución de cloruro sódico de 25 mM a 150 mM a una formulación de Factor IX liofilizada, resultando así una formulación preparada para la inyección intravenosa, en el que la formulación liofilizada, si se reconstituye en agua, no contiene más de 5 mM de una sal ionizante y en el que la formulación preparada es aproximadamente isotónica con respecto al plasma y tiene una osmolaridad que es de 270 mOsm/ml a 330 mOsm/l; o que es ligeramente hipotónica con respecto al plasma y tiene una osmolaridad que es de 220 mOsm/l a 270 mOsm/l; o que es ligeramente hipertónica con respecto al plasma y que tiene una osmolaridad que es de 330 mOsm/l a 600 mOsm/l; y en el que la formulación preparada tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de los eritrocitos tras la inyección intravenosa.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es de al menos 25 mEq/l de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ .
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es de al menos 30 mEq/l de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ .
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es de al menos 36 mEq/l de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ .
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es de al menos 40 mEq/l de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ .
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es de al menos 40 mEq/l de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  e inferior a 150 mEq/l de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ .
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la formulación preparada tiene una fuerza iónica medida en conductividad que es de al menos 2,5 mS/cm.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la formulación preparada tiene una fuerza iónica medida en conductividad que es de al menos 4,0 mS/cm.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la solución de cloruro sódico es de 40 mM a aproximadamente 150 mM.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la solución de cloruro sódico es de 36 mM a 44 mM.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la solución de cloruro sódico es de 40 mM.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la formulación liofilizada, si se reconstituye en agua, no contiene más de 25 mM de una sal ionizante.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que, antes de la adición de la solución de cloruro sódico, la formulación farmacéutica comprende histidina, glicina, sacarosa y polisorbato.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que, antes de la adición de la solución de cloruro sódico, la formulación farmacéutica, si se reconstituye en agua, comprende:
  - (a) histidina de 5 mM a 30 mM;
  - (b) glicina de 0,1 M a 0,3 M;
  - (c) sacarosa del 0,5 al 2 por ciento; y
  - (d) polisorbato del 0,001 al 0,05 por ciento.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que, antes de la adición de la solución de cloruro sódico, la formulación farmacéutica, si se reconstituye en agua, comprende además:
  - (e) de 50 UI/ml a 2.000 UI/ml de Factor IX.
16. Un kit farmacéutico que comprende:
  - (a) un vial que contiene una torta liofilizada, en el que, si la torta liofilizada se reconstituyera en 5 ml de agua, la solución comprendería:
    - (i) histidina de 5 mM a 30 mM;
    - (ii) glicina de 0,1 M a 0,3 M;
    - (iii) sacarosa del 0,5 al 2 por ciento;

- (iv) polisorbato del 0,001 al 0,05 por ciento;
  - (v) de 50 UI/ml a 2.000 UI/ml de Factor IX; y
  - (vi) no más de 5 mM de una sal ionizante;
- 5 (b) una solución de cloruro sódico de 25 mM a 150 mM; y
- (c) instrucciones para reconstituir la torta liofilizada con la solución de cloruro sódico, de manera que, después de la reconstitución, la solución resultante sea isotónica con respecto al plasma y tenga una osmolaridad que sea de 270 mOs/ml a 330 mOsm/l y tenga una fuerza iónica suficiente para prevenir la agregación de los eritrocitos tras la inyección intravenosa.
17. Un kit farmacéutico de acuerdo con la reivindicación 16 que comprende:
- 10 (a) un vial que contiene una torta liofilizada, en el que, si la torta liofilizada se reconstituyera en 4 ml de agua, la solución comprendería:
- (i) histidina 10 mM;
  - (ii) glicina 0,26 M;
  - (iii) sacarosa al 1 por ciento;
- 15 (iv) polisorbato 80 al 0,005 por ciento; y
- (v) de 50 UI/ml a 2.000 UI/ml de Factor IX;
- (b) una solución de cloruro sódico 40 mM; y
- (c) instrucciones para reconstituir la torta liofilizada en el vial con aproximadamente 5 ml de solución de cloruro sódico, de manera que, después de la reconstitución, la solución resultante comprende:
- 20 (i) histidina de 7 a 9 mM;
- (ii) glicina de 200 a 210 mM;
- (iii) sacarosa del 0,7 al 0,9%;
- (iv) polisorbato 80 al 0,004 %;
- (v) de 50 UI/ml a 2.000 UI/ml de Factor IX; y
- 25 (vi) NaCl 40 mM.



**FIG. 1**

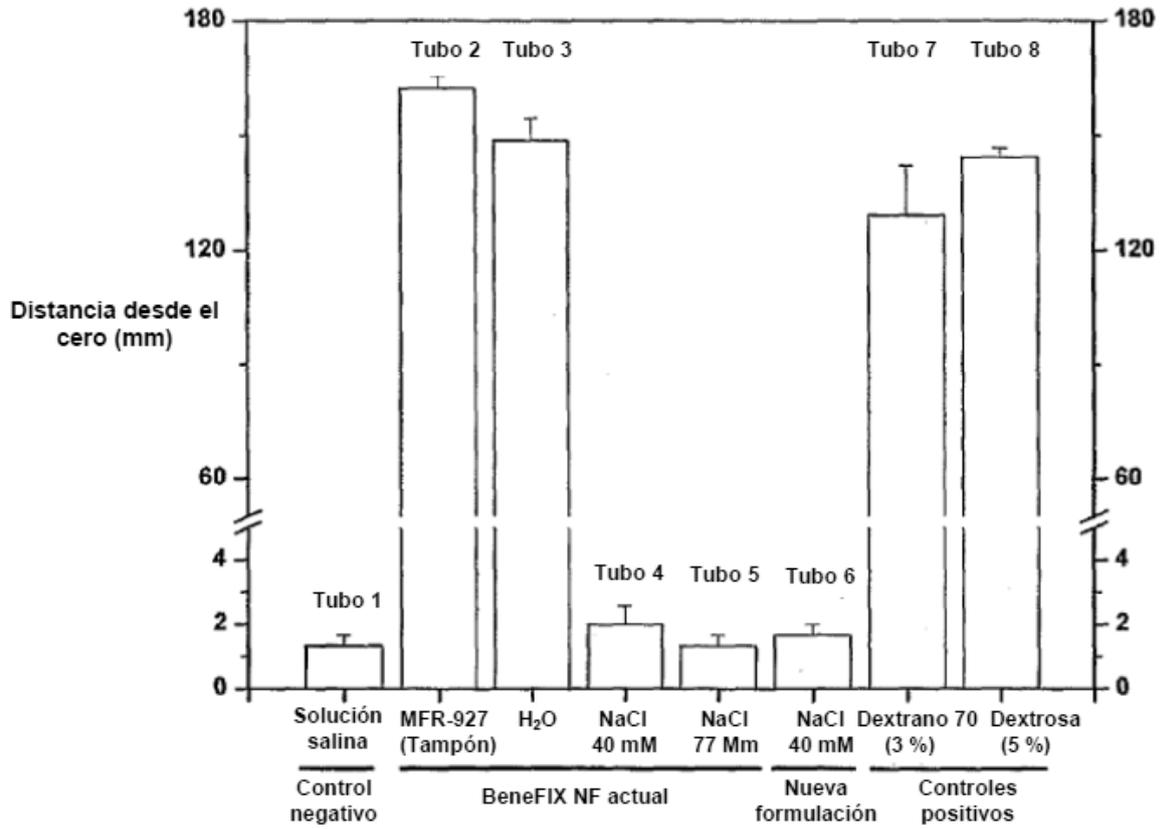


FIG. 2