

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 814 157**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2015 PCT/US2015/046173**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16029061**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2015 E 15834421 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3182993**

54 Título: **Formulaciones liofilizadas para antídoto del factor Xa**

30 Prioridad:

20.08.2014 US 201462039809 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2021

73 Titular/es:

**PORTOLA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
270 East Grand Avenue Suite 22
South San Francisco, California 94080, US**

72 Inventor/es:

**WANG, JUAN;
SACHA, GREGORY A. y
NGUYEN, PHUONG M.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 814 157 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones liofilizadas para antídoto del factor Xa

ANTECEDENTES

5 Los anticoagulantes satisfacen una necesidad en el mercado en el tratamiento o prevención de trombosis no deseada en pacientes con tendencia a formar coágulos sanguíneos, tales como, por ejemplo, aquellos pacientes que tienen trastornos de coagulación, confinados a períodos de inmovilidad o sometidos a cirugías médicas. Sin embargo, una de las principales limitaciones de la terapia anticoagulante es el riesgo de hemorragia asociado con los tratamientos, y las limitaciones en la capacidad de revertir rápidamente la actividad anticoagulante en caso de sobredosis o si se requiere un procedimiento quirúrgico urgente. De este modo, los antídotos específicos y eficaces para todas las formas de terapia anticoagulante son altamente deseables.

10 La administración de proteínas biológicamente activas mediante inyección es generalmente la vía de administración de elección cuando la administración oral no es práctica o se requiere una actividad terapéutica inmediata. Sin embargo, las barreras biológicas, químicas y físicas, tales como el almacenamiento a largo plazo deficiente, la osmolalidad, la solubilidad, y la estabilidad, hacen que el suministro de agentes biológicamente activos mediante inyección a mamíferos sea problemático. La liofilización puede resolver problemas de almacenamiento a largo plazo. Sin embargo, también existen problemas con la liofilización, tales como la escasa solubilidad y estabilidad del liofilato. Por lo tanto, existe la necesidad de preparaciones inyectables mejoradas de antídotos para anticoagulantes, que sean estables y solubles. La descripción satisface estas y otras necesidades.

15 El documento WO 2013/049804 describe composiciones y métodos para modular la hemostasia. El documento US 2010/255000 describe antídotos para inhibidores del Factor Xa y métodos para usar los mismos.

SUMARIO

20 La presente descripción proporciona formulaciones liofilizadas para un derivado de la proteína del factor Xa (fXa), denominado "antídoto r". En comparación con la proteína de fXa de tipo salvaje, el antídoto r tiene modificaciones en el dominio Gla y el sitio activo, conserva la capacidad de fXa para unirse a un inhibidor de fXa, pero no se ensambla en un complejo de protrombinasa. El antídoto r es un polipéptido bicatenario (véase la SEQ ID NO. 3 en la Tabla 3, que incluye una cadena ligera (SEQ ID NO. 4) y una cadena pesada (SEQ ID NO. 5) conectadas con un único enlace de disulfuro entre la cisteína 98 (Cys98) de la cadena ligera y la cisteína 108 (Cys108) de la cadena pesada.

25 También como el fXa de tipo salvaje, el antídoto r sufre modificaciones post-traduccionales que dan como resultado la glicosilación en ciertos restos de aminoácidos, por ejemplo Ser56, Ser72, Ser76 y Thr82 de la cadena ligera, y Thr249 de la cadena pesada, y un resto modificado, (3R)-3-hidroxiAsp en Asp29 de la cadena ligera. Adicionalmente, además del enlace de disulfuro entre cadenas, hay enlaces de disulfuro intracatenarios formados entre las cisteínas 16 y 27, 21 y 36, 38 y 47, 55 y 66, 62 y 75, y 77 y 90 de la cadena ligera, y entre las cisteínas 7 y 12, 27 y 43, 156 y 170, y 181 y 209 de la cadena pesada.

30 Dada la estructura bicatenaria y las diversas modificaciones post-traduccionales del antídoto r, se muestra aquí que el desarrollo de una formulación liofilizada estable que proporciona una disolución estable y soluble con una osmolalidad aceptable presenta un gran desafío. Sin embargo, inesperadamente, los presentes inventores pudieron llegar a una disolución que equilibra la solubilidad proteica, la estabilidad, la estructura de la torta, y la osmolalidad.

35 En una realización, la presente descripción proporciona una formulación acuosa. En una realización, la formulación comprende de 10 mM a 55 mM de arginina, de 1% a 3% de sacarosa (p/v), de 2% a 8% de manitol (p/v), y al menos 5 mg/ml de un polipéptido bicatenario que comprende una primera cadena de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4, una segunda cadena que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 5, y un enlace de disulfuro entre un primer resto de cisteína en la posición 98 (Cys98) de SEQ ID NO. 4 y un segundo resto de cisteína en la posición 108 (Cys108) de SEQ ID NO. 5, en la que la formulación tiene un pH de 7,5 a 8.

40 En algunos aspectos, la formulación comprende de 40 mM a 50 mM de arginina, de 1,5% a 2,5% de sacarosa (p/v), de 4,5% a 5,5% de manitol (p/v), y al menos 10 mg/ml del polipéptido. La formulación puede comprender de 10 mM a 30 mM de citrato, de 1,5% a 2,5% de sacarosa (p/v), de 4,5% a 5,5% de manitol (p/v), y al menos 10 mg/ml del polipéptido.

45 En algunos aspectos, la formulación comprende de 40 mM a 50 mM de arginina, de 1,5% a 2,5% de sacarosa (p/v), de 4,5% a 5,5% de manitol (p/v), y al menos 18, 19 o 20 mg/ml del polipéptido. En algunos aspectos, la formulación comprende de 10 mM a 30 mM de citrato, de 1,5% a 2,5% de sacarosa (p/v), de 4,5% a 5,5% de manitol (p/v), y al menos 10 mg/ml del polipéptido.

50 En algunos aspectos, la formulación comprende alrededor de 45 mM de arginina, alrededor de 2% de sacarosa (p/v), alrededor de 5% de manitol (p/v), y alrededor de 10 mg/ml de un polipéptido bicatenario que comprende una primera cadena que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4, una segunda cadena que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 5, y un enlace de disulfuro entre un primer resto de cisteína en la posición 98 (Cys98) de SEQ ID NO. 4 y un segundo resto de cisteína en la posición 108 (Cys108) de SEQ ID NO. 5, en la que la formulación tiene un pH de alrededor de 7,8. En un aspecto, la formulación incluye además polisorbato 80 (0,01% p/v a 0,02% p/v) y/o un amortiguador.

- 5 En algunos aspectos, la formulación comprende alrededor de 45 mM de arginina, alrededor de 2% de sacarosa (p/v), alrededor de 5% de manitol (p/v), y alrededor de 20 mg/ml de un polipéptido bicatenario que comprende una primera cadena que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4, una segunda cadena que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 5, y un enlace de disulfuro entre un primer resto de cisteína en la posición 98 (Cys98) de SEQ ID NO. 4 y un segundo resto de cisteína en la posición 108 (Cys108) de SEQ ID NO. 5, en la que
10 la formulación tiene un pH de alrededor de 7,8. En un aspecto, la formulación incluye además polisorbato 80 (0,01% p/v a 0,02% p/v) y/o un amortiguador.

- En algunos aspectos, el polipéptido comprende un resto de aminoácido que se modifica para ser diferente de los aminoácidos naturales. En algunos aspectos, el resto Asp29 de la primera cadena se modifica a (3*R*)-3-hidroxiAsp en Asp29. En algunos aspectos, el polipéptido comprende al menos un enlace de disulfuro intracatenario para cada una
15 de las cadenas primera y segunda.

- También se proporciona, en una realización, un método para preparar una formulación liofilizada de un polipéptido bicatenario que comprende una primera cadena de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4, una segunda cadena de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 5, y un enlace de disulfuro entre un primer resto de cisteína en la posición 98 (Cys98) de SEQ ID NO. 4 y un segundo resto de cisteína en la posición 108 (Cys108) de SEQ ID
20 NO. 5, que comprende liofilizar la formulación acuosa como se describe anteriormente.

Otra realización proporciona una composición liofilizada preparada liofilizando la formulación acuosa de la presente descripción.

- En una realización, la presente descripción proporciona una composición liofilizada que comprende al menos 10% (p/p) de un polipéptido bicatenario que comprende una primera cadena de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4, una segunda cadena de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 5, y un enlace de disulfuro entre un primer resto de cisteína en la posición 98 (Cys98) de SEQ ID NO. 4 y un segundo resto de cisteína en la posición 108 (Cys108) de SEQ ID NO. 5, y L-arginina HCl:sacarosa:manitol en una relación en peso del intervalo (0,5-1,4):(1-3):(2-
25 8).

- En algunos aspectos, la composición liofilizada comprende al menos 15%, 16%, 17%, 18% o 19% (p/p) del polipéptido bicatenario. En algunos aspectos, la relación en peso de L-arginina HCl:sacarosa:manitol está en el intervalo de (0,9-1):(1,5-2,5):(4,5-5,5).

- También se describe una composición liofilizada que comprende al menos 10% (p/p) de un polipéptido bicatenario que comprende una primera cadena de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4, una segunda cadena de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 5, y un enlace de disulfuro entre un primer resto de cisteína en la posición 98 (Cys98) de SEQ ID NO. 4 y un segundo resto de cisteína en la posición 108 (Cys108) de SEQ ID NO. 5, y citrato:sacarosa:manitol en una relación en peso del intervalo (0,15-0,66):(1-3):(2-8). La composición liofilizada puede comprender al menos 10%, 15%, 16%, 17%, 18% o 19% (p/p) del polipéptido bicatenario. La relación en peso de citrato:sacarosa:manitol puede estar en el intervalo de (0,19-0,57):(1,5-2,5):(4,5-5,5).

- La presente descripción también proporciona una disolución preparada disolviendo la composición liofilizada de la descripción. El disolvente puede ser agua o disolución salina.

Aún otra realización proporciona una formulación acuosa o composición liofilizada de la invención para uso en un método para reducir la hemorragia en un sujeto que se somete a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una disolución de la descripción. En algunos aspectos, el inhibidor del factor Xa es apixaban, rivaroxaban o betrixaban.

- 45 Aún, también se describe una formulación acuosa, que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 3, un agente solubilizante, un estabilizador, y un componente cristalino, en el que la formulación no colapsa durante la liofilización.

- El componente cristalino puede ser manitol. En algunos aspectos, el manitol está presente en una concentración de 2% a 8% (p/v). El agente solubilizante puede ser arginina o citrato, y el estabilizador es sacarosa. La formulación acuosa puede comprender además un tensioactivo y un amortiguador. También se describe una composición liofilizada preparada liofilizando la formulación acuosa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las FIG. 1A-F son gráficos que muestran la solubilidad del antídoto r en diferentes condiciones (pH, agente solubilizante, fuerza iónica). Las barras sombreadas indican que se observó precipitación de proteínas, y las barras vacías indican que no se observó precipitación de proteínas.

5 La FIG. 2 es un termograma de flujo de calor DSC para disolución tris 10 mm que muestra enfriamiento a 1°C/min y la exotermia de cristalización para tris a -32°C.

La FIG. 3 es un termograma de DSC durante el enfriamiento de tris 10 mm con arginina 95 mm. Sin cristalización exotérmica para tris.

10 La FIG. 4 es un termograma de DSC para una disolución que contiene tris 10 mm, 2% de sacarosa, y 2% de manitol, que muestra la cristalización de manitol a aproximadamente -18°C.

La FIG. 5 es un termograma de DSC para una disolución de tris 10 mm, arginina 95 mm, 2% de sacarosa y 2% de manitol, que muestra la tg' para sacarosa a -42°C. La disolución se recoció durante 5 horas a -20°C.

15 La FIG. 6 es un termograma de DSC para una disolución de tris 10 mm, arginina 95 mm, 2% de sacarosa y 2% de manitol, que muestra la etapa de recocción a -20°C durante 5 horas sin evidencia de una exotermia de cristalización.

La FIG. 7 es un termograma de DSC para una disolución de fosfato de sodio 10 mm, que muestra una exotermia de cristalización para fosfato de sodio a aproximadamente -10°C.

La FIG. 8 es un termograma de flujo de calor no reversible de DSC para fosfato de sodio 10 mm con 2% de sacarosa y 2% manitol, que muestra una exotermia de cristalización con un inicio a aproximadamente -33°C.

20 La FIG. 9 es un termograma de flujo de calor de DSC para fosfato de sodio 10 mm, arginina 95 mm, 2% de sacarosa y 2% de manitol, que no presenta sucesos térmicos aparte de la endotermia de fusión del hielo.

La FIG. 10 es un termograma de flujo de calor de DSC para tris 10 mm, citrato 10 mm, 2% de sacarosa y 5% manitol, que muestra una exotermia de cristalización con un inicio de aproximadamente 24 minutos a -25°C.

25 La FIG. 11 es un termograma de flujo de calor de DSC para tris 10 mm, citrato 20 mm, 2% de sacarosa y 5% de manitol, que muestra una exotermia de cristalización con un inicio de aproximadamente 30 minutos a -25°C.

La FIG. 12 es un dato de concentración UV para formulaciones de disolución de tris y fosfato almacenadas a 5°C durante hasta 2 semanas en comparación con las formulaciones liofilizadas a T0.

La FIG. 13 es un dato de concentración UV para formulaciones de disolución de tris y fosfato almacenadas a 25°C durante hasta 2 semanas en comparación con las formulaciones liofilizadas a T0.

30 La FIG. 14 es un dato de concentración UV para formulaciones liofilizadas de tris y fosfato almacenadas a 25°C en comparación con las formulaciones en disolución a T0.

La FIG. 15 es un termograma de DSC para la formulación de tris 10 mm, arginina 9,5 mm, 2% de sacarosa, 2% de manitol, y 0,01% de PS80, que muestra el inicio de la cristalización del manitol a los 70 minutos (tiempo de inicio de la recocción) a -22°C.

35 La FIG. 16 es un termograma de DSC para la formulación de tris 10 mm, arginina 47,5 mm, 2% de sacarosa, 4% de manitol, y 0,01% de PS80, que muestra el inicio de la cristalización del manitol a los 30 minutos a -25°C.

La FIG. 17 es una exotermia de cristalización de DSC para manitol cuando la disolución de tris 10 mm, arginina 47,5 mm, 2% de sacarosa, 5% de manitol y 0,01% de PS80 se enfría a 1°C/min hasta -40°C.

40 La FIG. 18 muestra la exotermia de cristalización de DSC para manitol cuando la disolución de tris 10 mm, arginina 47,5 mm, 2% de sacarosa, 5% de manitol y 0,01% de PS80 se recuece a -25°C. El inicio de la cristalización es aproximadamente 23 minutos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Definiciones

45 Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye una pluralidad de vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo mezclas de los mismos.

5 Como se usa aquí, la expresión “que comprende” pretende significar que las composiciones y métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. “Que consiste esencialmente en”, cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará excluir otros elementos de cualquier significado esencial para la combinación para el uso previsto. De este modo, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se define aquí no excluiría contaminantes en trazas del método de aislamiento y purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como disolución salina amortiguada con fosfato, conservantes, y similares. “Que consiste en” significará excluir más que oligoelementos de otros ingredientes y etapas sustanciales del método para administrar las composiciones de esta descripción. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta descripción.

10 El término “proteína” y “polipéptido” se usan indistintamente y en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos, o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede estar unida por otros enlaces, por ejemplo éster, éter, etc. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se limita el número máximo de aminoácidos que puede comprender una secuencia proteica o peptídica. Como se usa aquí, el término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y los isómeros ópticos D y L, análogos de aminoácidos, y peptidomiméticos. Las abreviaturas de una letra y tres letras de los aminoácidos naturales se enumeran a continuación.

20 “Factor Xa” o “fXa” o “proteína de fXa” es una serina proteasa en la ruta de coagulación de la sangre, que se produce a partir del factor X inactivo (fX, SEC ID NO. 1, Tabla 1). La secuencia nucleotídica que codifica el factor humano X (“fX”) se puede encontrar en GenBank con el número de acceso “NM_000504”. Tras la escisión catalítica de los primeros 52 restos de la cadena pesada, fX se activa a fXa. fXa contiene una cadena ligera y una cadena pesada. Los primeros 45 restos de aminoácidos (restos 1-45 de SEQ ID NO. 1) de la cadena ligera se denominan dominio Gla, debido a que contienen 11 restos de ácido γ -carboxiglutámico (Gla) modificados post-traduccionalmente. También contiene una secuencia de apilamiento aromática corta (6 restos de aminoácidos) (restos 40-45 de SEQ ID NO. 1). La digestión con quimotripsina elimina selectivamente los 1-44 restos que da como resultado fXa sin el dominio Gla. El dominio catalítico de serina proteasa de fXa se localiza en la cadena pesada C-terminal. La cadena pesada de fXa es altamente homóloga a otras serina proteasas tales como trombina, tripsina, y proteína C activada.

25 “fXa nativo” o “fXa de tipo salvaje” se refiere a fXa presente de forma natural en plasma o aislado en su forma original, no modificada, que procesa la actividad biológica de protrombina activante, promoviendo por lo tanto la formación de coágulos sanguíneos. La expresión incluye polipéptidos naturales aislados de muestras de tejido, así como fXa producido de forma recombinante. “fXa activo” se refiere a fXa que tiene la actividad procoagulante de protrombina activante. “fXa activo” puede ser un fXa nativo o un fXa modificado que retiene la actividad procoagulante.

30 Como se usa aquí, “derivados de fXa” se refieren a proteínas de fXa modificadas que no compiten con fXa en el ensamblaje en el complejo de protrombinasa y tienen actividades procoagulantes o catalíticas reducidas o nulas, y aun así se unen y/o neutralizan sustancialmente los anticoagulantes, tales como los inhibidores de fXa. La “actividad procoagulante” de una proteína de fXa o derivado de fXa, en algunos aspectos, se refiere a la actividad enzimática que porta el polipéptido de fXa activo de tipo salvaje. En la patente US nº 8.153.590, y en las publicaciones PCT WO2009/042962 y WO2010/056765 se proporcionan ejemplos de derivados de fXa, y además se proporcionan aquí, tal como SEQ ID NO: 2 y 3, y sus equivalentes biológicos.

35 La “actividad enzimática” de un polipéptido fXa o derivados del mismo se refiere a la capacidad del polipéptido para catalizar una reacción bioquímica con un sustrato a través de la interacción directa con el sustrato.

40 La SEQ ID NO: 2 contiene 3 mutaciones con respecto a la fXa de tipo salvaje. La primera mutación es la eliminación de 6-39 aa en el dominio Gla de fX. La segunda mutación es el reemplazo de la secuencia del péptido de activación de aa 143-194 por -RKR-. Esto produce un conector -RKR- (SEQ ID NO: 6) que conecta la cadena ligera (SEQ ID NO: 4) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 5). Tras la secreción, este conector se escinde dando como resultado un polipéptido bicatenario, SEQ ID NO: 3 (antídoto r). La tercera mutación es la mutación del resto del sitio activo S379 a un resto Ala. Esta sustitución de aminoácidos corresponde al aminoácido 296 y 290 de SEQ ID NOS: 1 y 3, respectivamente.

45 La expresión “antídoto r” se refiere a un producto procesado de polipéptido bicatenario de SEQ ID NO: 2, después de la escisión del conector. Esto está representado por la SEQ ID NO: 3. El antídoto r se describe en, por ejemplo, el documento US 8.153.590. El antídoto r incluye una cadena ligera (SEQ ID NO. 4) y una cadena pesada (SEQ ID NO. 5) conectadas con un único enlace de disulfuro entre la Cisteína 98 (Cys98) de la cadena ligera y la Cisteína 108 (Cys108) de la cadena pesada. Al igual que el fXa de tipo salvaje, en ciertos lotes de producción, el antídoto r sufre modificaciones post-traduccionales que dan como resultado la glicosilación en ciertos restos de aminoácidos, por ejemplo Ser56, Ser72, Ser76 y Thr82 de la cadena ligera, y Thr249 de la cadena pesada, y un resto modificado, (3R)-3-hidroxiAsp en Asp29 de la cadena ligera. Adicionalmente, además del enlace de disulfuro entre cadenas, puede haber enlaces de disulfuro intracatenarios formados entre las cisteínas 16 y 27, 21 y 36, 38 y 47, 55 y 66, 62 y 75, y 77 y 90 de la cadena ligera, y entre las cisteínas 7 y 12, 27 y 43, 156 y 170, y 181 y 209 de la cadena pesada.

ES 2 814 157 T3

Tabla 1. Secuencia polipeptídica de factor X humano inactivo (SEQ ID NO: 1)

1	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKGDGQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFLLDF
181	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRRLKT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVPYVDRNSC	KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDSG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

Tabla 2. Secuencia polipeptídica del antídoto r antes de la eliminación del conector -RKRKR-(SEQ ID NO: 6) (SEQ ID NO: 2)

Cadena ligera (SEQ ID NO: 4)					
1	ANSFL		F	WNKYKGDQQC	ETSPCQNGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRK LCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSV VCS
121	GKACIPTG PY	PCGKQTLER			CARGYTLADN
Conector (SEQ ID NO: 6)					
	RKRKR				
Cadena pesada (SEQ ID NO: 5)					
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEE NEGF	CGGTILSEFY
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVWIK	HNRFKETYD	FDIAVLRLKT
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GROSTR LKML	EPYVDRNSC
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		IYTKVTAFLK

Tabla 3. Secuencia polipeptídica de un mutante triple del factor Xa humano después de la eliminación del conector -RKRKR-(SEQ ID NO. 6) (SEQ ID NO: 3)

Cadena ligera (SEQ ID NO: 4)					
1	ANSFL		F	WNKYKGDQQC	ETSPCQNGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRK LCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVCS
121	GKACIPTGYPY	PCGKOTLER			
Cadena pesada (SEQ ID NO: 5)					
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVIK	HNRFKETYD	FDIAVLR LKT
301	AGLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GROSTR LKML	EVYVDRNSC
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		IYTKVTAFLK

La presente descripción también proporciona una variedad de equivalentes biológicos de antídoto r (o sus precursores, representados por SEQ ID NO: 2), o alternativamente polipéptidos que tienen cierta identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3. Tales equivalentes biológicos pueden retener las características estructurales de SEQ ID NO: 3, es decir, un sitio activo modificado y un dominio Gla eliminado o modificado. Dichos equivalentes biológicos pueden retener las características funcionales de SEQ ID NO: 3, es decir, no competir con fXa en el ensamblaje en el complejo de protrombina y tener actividades (por ejemplo, enzimáticas o catalíticas) procoagulantes reducidas o nulas.

La expresión "sitio activo" se refiere a la parte de una enzima o anticuerpo en la que ocurre una reacción química. Un "sitio activo modificado" es un sitio activo que se ha modificado estructuralmente para proporcionar al sitio activo mayor o menor reactividad química o especificidad. Los ejemplos de sitios activos incluyen, pero no se limitan a, el dominio catalítico del factor X humano que comprende los restos de aminoácidos 235-488, y el dominio catalítico del factor Xa humano que comprende los restos de aminoácidos 195-448. Los ejemplos de sitio activo modificado incluyen, pero no se limitan a, el dominio catalítico del factor Xa humano que comprende los restos de aminoácidos 195-448 en SEQ ID NO: 1 con al menos una sustitución de aminoácidos en la posición Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 o Arg424.

Se pretende que una "composición" signifique una combinación de agente activo y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo, tal como un adyuvante.

Se pretende que una "composición farmacéutica" incluya la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, haciendo que la composición sea adecuada para uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

La expresión "formulación liofilizada" se refiere a una formulación o composición farmacéutica que comprende un polipéptido de interés que se liofiliza.

Como se usa aquí, la expresión "agente de carga" se refiere a un ingrediente que proporciona volumen a la formulación liofilizada. Los ejemplos de agentes de carga incluyen, sin limitación, manitol, trehalosa, lactosa, sacarosa, polivinilpirrolidona, sacarosa, glucosa, glicina, ciclodextrinas, dextrano, PEGs sólidos, y derivados y mezclas de los mismos. En una realización, una formulación de la presente descripción incluye opcionalmente un agente de carga.

Como se usa aquí, una "torta farmacéuticamente aceptable" se refiere a un producto farmacológico sólido no colapsado que queda después de la liofilización que tiene ciertas características deseables, por ejemplo farmacéuticamente aceptable, estabilidad a largo plazo, tiempo de reconstitución corto, aspecto elegante, y mantenimiento de las características de la disolución original tras la reconstitución. La torta farmacéuticamente aceptable puede ser material sólido, en polvo o granular. La torta farmacéuticamente aceptable también puede contener hasta cinco por ciento de agua en peso de la torta.

Como se usa aquí, el término "liofilización" o secado por congelación se refiere a un procedimiento en el que el agua se elimina de un producto después de congelarlo y colocarlo a vacío, permitiendo que el hielo cambie directamente de sólido a vapor sin pasar por una fase líquida. El procedimiento consta de tres procedimientos separados, únicos e interdependientes; congelación, secado primario (sublimación), y secado secundario (desorción). Los métodos para liofilizar polipéptidos usados en esta descripción se describen aquí y son bien conocidos en la técnica.

El término "amortiguador", como se usa aquí, denota un excipiente farmacéuticamente aceptable, que estabiliza el pH de una preparación farmacéutica. Los amortiguadores adecuados son bien conocidos en la técnica, y se pueden encontrar en la bibliografía. Los amortiguadores farmacéuticamente aceptables comprenden, pero no se limitan a, amortiguadores tris, amortiguadores de arginina, amortiguadores de histidina, amortiguadores de citrato, amortiguadores de succinato, y amortiguadores de fosfato. Independientemente del amortiguador usado, el pH puede ajustarse con un ácido o una base conocida en la técnica, por ejemplo ácido succínico, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, y ácido cítrico, succinato, citrato, base de tris, histidina, histidina HCl, hidróxido de sodio, e hidróxido de potasio. Los amortiguadores adecuados incluyen, sin limitación, amortiguador de histidina, ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES), cacodilato, fosfato, acetato, succinato, y citrato. La concentración del amortiguador puede estar entre alrededor de 4 mM y alrededor de 60 mM, o alternativamente alrededor de 4 mM a alrededor de 40 mM, o alternativamente alrededor de 5 mM a alrededor de 25 mM.

Los "crioprotectores" son conocidos en la técnica, e incluyen, sin limitación, por ejemplo, sacarosa, trehalosa y glicerol. Generalmente se usa un crioprotector que exhibe baja toxicidad en sistemas biológicos.

La expresión "agente de tonicidad", como se usa aquí, denota agentes farmacéuticamente aceptables usados para modular la tonicidad de la formulación. La isotonicidad generalmente se refiere a la presión osmótica con respecto a una disolución, generalmente con respecto a la del suero sanguíneo humano. Una formulación puede ser hipotónica, isotónica o hipertónica. En un aspecto, la formulación es isotónica. Una formulación isotónica es líquida o líquida reconstituida a partir de una forma sólida, por ejemplo de una forma liofilizada, y denota una disolución que tiene la misma tonicidad que alguna otra disolución con la que se compara, tal como la disolución salina fisiológica y el suero sanguíneo. Los agentes de isotonicidad adecuados incluyen, pero sin limitación, cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerina, y cualquier componente del grupo de aminoácidos, azúcares, como se define aquí, así como combinaciones de los mismos.

Como se usa aquí, el término “tensioactivo” se refiere a una sustancia orgánica farmacéuticamente aceptable que tiene estructuras anfipáticas; a saber, se compone de grupos de tendencias de solubilidad opuestas, típicamente una cadena de hidrocarburos solubles en aceite y un grupo iónico soluble en agua. Los tensioactivos se pueden clasificar, dependiendo de la carga del resto tensioactivo, en tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Los tensioactivos se usan a menudo como agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes, y dispersantes para diversas composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos. En algunas realizaciones de las formulaciones farmacéuticas descritas aquí, la cantidad de tensioactivo se describe como un porcentaje expresado en porcentaje en peso/volumen (% p/v). Los tensioactivos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, el grupo de ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán (Tween), polioxietileno alquil éteres (Brij), éteres de alquilfenilpolioxietileno (Triton-X), copolímero de polioxietileno-polioxipropileno (Poloxamer, Pluronic), o dodecilsulfato de sodio (SDS). Los ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán incluyen polisorbato 20 (vendido bajo la marca comercial Tween 20™) y polisorbato 80 (vendido bajo la marca comercial Tween 80™). Los copolímeros de polietileno-polipropileno incluyen los vendidos bajo los nombres Pluronic® F68 o Poloxamer 188™. Los polioxietileno alquil éteres incluyen los vendidos bajo la marca registrada Brij™. Los éteres de alquilfenilpolioxietileno incluyen los vendidos bajo el nombre comercial Triton-X.

Un “lioprotector” se refiere a una sustancia farmacéuticamente aceptable que estabiliza una proteína durante la liofilización (el procedimiento de congelación y secado rápidos a alto vacío). Los ejemplos de lioprotectores incluyen, sin limitación, sacarosa, trehalosa, o manitol.

Un “antioxidante” se refiere a una molécula capaz de ralentizar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química que transfiere electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres, que inician reacciones en cadena que desestabilizan las sustancias terapéuticas proteínicas y, finalmente, afectan a la actividad del producto. Los antioxidantes terminan estas reacciones en cadena al eliminar los intermedios de los radicales libres, e inhiben otras reacciones de oxidación al oxidarse ellos mismos. Como resultado, los antioxidantes a menudo son agentes reductores, agentes quelantes, y eliminadores de oxígeno tales como citrato, EDTA, DPTA, tioles, ácido ascórbico, o polifenoles. Ejemplos no limitativos de antioxidantes incluyen ácido ascórbico (AA, E300), tiosulfato, metionina, tocoferoles (E306), galato de propilo (PG, E310), terc-butilhidroquinona (TBHQ), hidroxianisol butilado (BHA, E320), e hidroxitolueno butilado (BHT, E321).

Un “conservante” es una sustancia química natural o sintética que se añade a productos tales como alimentos, productos farmacéuticos, pinturas, muestras biológicas, madera, etc., para evitar la descomposición por crecimiento microbiano o por cambios químicos indeseables. Los aditivos conservantes se pueden usar solos o en combinación con otros métodos de conservación. Los conservantes pueden ser conservantes antimicrobianos, que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos, o antioxidantes tales como los absorbentes de oxígeno, que inhiben la oxidación de los componentes. Los conservantes antimicrobianos comunes incluyen cloruro de benzalconio, ácido benzoico, clorohexidina, glicerina, fenol, sorbato de potasio, timerosal, sulfitos (dióxido de azufre, bisulfito de sodio, hidrogenosulfito de potasio, etc.), y EDTA disódico. Otros conservantes incluyen aquellos comúnmente usados en proteínas patentadas tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol, o metilparabeno.

El término “tensioactivo”, como se usa aquí, significa compuestos que disminuyen la tensión superficial (o tensión interfacial) entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Los tensioactivos pueden actuar como detergentes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes espumantes, y dispersantes.

Los ejemplos de tensioactivos incluyen polisorbato 80, ácido graso y alquilsulfonatos; cloruro de bencetanio, por ejemplo, HY AMINE 1622 de Lonza, Inc. (Fairlawn, N.J.); ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, por ejemplo la serie TWEEN de Uniqema (Wilmington, Del); y tensioactivos naturales, tales como ácido taurocólico de sodio, 1-palmitoil-2-Sn-glicero-3-fosfolina, lecitina, y otros fosfolípidos. Tales tensioactivos, por ejemplo, minimizan la agregación de partículas liofilizadas durante la reconstitución del producto. Estos tensioactivos pueden comprender de alrededor de 0,001% a alrededor de 5% p/v.

II Formulaciones

Según se proporciona, el fXa de tipo salvaje es un polipéptido bicatenario. También lo son muchas formas de antídotos de fXa, incluyendo el antídoto r (SEQ ID NO: 3), que incluye una cadena ligera (SEQ ID NO: 4) y una cadena pesada (SEQ ID NO: 5) conectadas con un solo enlace de disulfuro entre la cisteína 98 (Cys98) de la cadena ligera y la cisteína 108 (Cys108) de la cadena pesada. También como el fXa de tipo salvaje, el antídoto r expresado en las células sufre modificaciones post-traduccionales que dan como resultado la glicosilación en ciertos restos de aminoácidos, por ejemplo Ser56, Ser72, Ser76 y Thr82 de la cadena ligera, y Thr249 de la cadena pesada, y un resto modificado, (3R)-3-hidroxiAsp en Asp29 de la cadena ligera. Adicionalmente, además del enlace de disulfuro entre cadenas, puede haber uno o más enlaces de disulfuro intracatenarios formados entre las cisteínas 16 y 27, 21 y 36, 38 y 47, 55 y 66, 62 y 75, y 77 y 90 de la cadena ligera, y entre las cisteínas 7 y 12, 27 y 43, 156 y 170, y 181 y 209 de la cadena pesada.

Dada la estructura bicatenaria y las diversas modificaciones post-traduccionales de los antídotos de fXa, se muestra aquí que el desarrollo de una formulación liofilizada estable que proporciona una disolución estable y soluble con una osmolalidad aceptable presenta un gran desafío.

5 Usando el antídoto r como ejemplo, los datos experimentales mostraron que se requiere una alta concentración de un agente solubilizante para mantener una solubilidad razonable para el antídoto r. En particular, los estudios de solubilidad en el Ejemplo 4 muestran que tanto el citrato como la arginina aumentan significativamente la solubilidad del antídoto r. Además, los ejemplos mostraron que el antídoto r podía permanecer soluble en la disolución cuando la concentración de arginina era 95 mM, o al menos 10 mM.

10 Además, durante el procedimiento de liofilización, se determinó que la temperatura de la proteína necesitaba mantenerse por debajo de la temperatura de colapso determinada (alrededor de -40°C) para obtener muestras liofilizadas aceptables (Ejemplo 6). Sin embargo, mantener una temperatura tan baja del producto no es factible en la práctica. Por lo tanto, los datos demuestran que se requiere un componente de cristalización (por ejemplo, manitol) para que sirva como un andamio que pueda mantener el material proteico amorfo en su lugar durante y después de la liofilización.

15 Sin embargo, se descubrió adicionalmente que la presencia de una alta concentración de arginina (por ejemplo, 95 mM) evitó la cristalización del manitol (Ejemplo 7). Mientras tanto, la presencia de manitol aumenta la concentración total de azúcar en la formulación, lo que conduce a una osmolalidad inaceptable de la disolución (Ejemplo 7).

20 El desarrollo de una formulación liofilizada adecuada para el antídoto r, por lo tanto, tenía requisitos contradictorios para la concentración de arginina como agente solubilizante, manitol como agente cristalizante, y sacarosa como agente estabilizante. Era, en el mejor de los casos, impredecible si tales requisitos podrían equilibrarse para generar una formulación liofilizada aceptable.

25 Sin embargo, de manera sorprendente e inesperada, los presentes inventores pudieron llegar a una disolución que equilibra la solubilidad de la proteína, la estabilidad, la estructura de la torta, y la osmolalidad. Más específicamente, para generar una formulación liofilizada adecuada, una disolución de antídoto de ejemplo incluye alrededor de 45 mM de arginina (10-55 mM), alrededor de 2% de sacarosa (1-3%), y alrededor de 5% de manitol (2-8%). Además, la disolución incluye alrededor de 10 mM de tris y 0,01%-0,02% de PS80 junto con una cantidad deseada de antídoto r (por ejemplo, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml o 50 mg/ml), y tiene un pH de alrededor de 7,8.

30 Además, a pesar de ser conocido como un buen agente solubilizante para proteínas terapéuticas, se ha demostrado que el citrato tiene actividades anticoagulantes. Véase, por ejemplo, Wright et al., *Nephrology* (Carlton). Mayo de 2011; 16(4):396-402. Por lo tanto, dado que el antídoto r está destinado a ser un antídoto para los agentes anticoagulantes (inhibidores de fXa), el citrato se consideró no adecuado para uso con el antídoto r. Inesperadamente, se descubre aquí que el citrato en realidad no interfiere con la actividad del antídoto r *in vivo*. Se encuentra que una concentración adecuada de citrato es de alrededor de 10 mM a alrededor de 25 mM, además de alrededor de 2% de sacarosa (1-3%), y alrededor de 5% de manitol (2-8%) en una disolución adecuada para liofilización.

35 En consecuencia, cuando la disolución se liofiliza, formará una composición seca que incluye una relación en peso de L-arginina HCl:sacarosa:manitol en el intervalo de (0,5-1,4):(1-3):(2-8). Si se usa entre 5 mg/ml y 50 mg/ml de antídoto r en la disolución, por ejemplo, entonces la relación en peso de L-arginina HCl:sacarosa:manitol:antídoto r está en el intervalo de (0,5-1,4):(1-3):(2-8):(0,5-5).

40 Por el contrario, cuando dicha formulación liofilizada se disuelve en agua, disolución salina u otro disolvente similar, puede proporcionar una disolución que tiene alrededor de 10-55 mM de arginina, alrededor de 1-3% de sacarosa, y alrededor de 2-8% de manitol.

45 Del mismo modo, cuando una disolución que usa citrato como agente solubilizante se liofiliza, formará una composición seca que incluye una relación en peso de citrato:sacarosa:manitol en el intervalo de (0,15-0,66):(1-3):(2-8). Si se usa entre 5 mg/ml y 50 mg/ml de antídoto r en la disolución, por ejemplo, entonces la relación en peso de L-arginina HCl:sacarosa:manitol:antídoto r está en el intervalo de (0,15-0,66):(1-3):(2-8):(0,5-5). Por el contrario, cuando dicha formulación liofilizada se disuelve en agua, disolución salina u otro disolvente similar, puede proporcionar una disolución que tiene alrededor de 8-35 mM de citrato, alrededor de 1-3% de sacarosa, y alrededor de 2-8% de manitol.

50 El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas. También describimos que los resultados observados con el antídoto r pueden extrapolarse fácilmente a otros antídotos de fXa que tienen estructuras similares, incluyendo los equivalentes biológicos del antídoto r (o sus precursores, representados por la SEQ ID NO: 2). Dichos equivalentes biológicos pueden tener al menos 80%, 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3. Dichos equivalentes biológicos pueden incluir dos cadenas peptídicas, cada una con al menos 80%, 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5, respectivamente. Dichos equivalentes biológicos pueden retener las características estructurales de la SEQ ID NO: 3, es decir, un sitio activo modificado y un dominio Gla eliminado o modificado. Dichos equivalentes biológicos pueden retener las características funcionales de SEQ ID NO: 3, es decir, no competir con fXa en el ensamblaje en el complejo de protrombina y tener actividades (por ejemplo, enzimáticas o catalíticas) procoagulantes reducidas o nulas.

A. Disolución de polipéptido adecuada para liofilización

La presente descripción proporciona una formulación acuosa adecuada para liofilización, cuya formulación incluye un antídoto de fXa como se describe aquí o sus equivalentes biológicos, junto con un agente solubilizante, un agente estabilizador (o estabilizador) y un agente cristalino. La formulación puede incluir además un tensioactivo y/o un amortiguador. La presencia de cada uno de estos agentes puede evitar que el antídoto de fXa se colapse durante la liofilización, por ejemplo, cuando la temperatura de liofilización es mayor que -40°C, -30°C, -20°C, -10°C, 0°C, 5°C, 10°C o 15°C, tan alta como 20°C o 25°C.

La descripción proporciona una formulación acuosa que puede usarse para liofilización. La formulación acuosa incluye un polipéptido derivado de fXa, por ejemplo un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 3. Además del polipéptido, la formulación incluye además un agente solubilizante, un estabilizador y un componente cristalino. Dicha formulación no colapsa durante la liofilización en las condiciones deseadas. La condición deseada puede ser la liofilización a una temperatura mayor que -40°C, o alternativamente mayor que -40°C, -30°C, -20°C, -10°C, 0°C, 5°C, 10°C o 15°C. La condición deseada puede ser la liofilización a una temperatura inferior a 25°C, o alternativamente inferior a 20°C, 15°C, 10°C o 5°C.

El polipéptido derivado de fXa tiene modificaciones en el dominio Gla y el sitio activo en comparación con la proteína de fXa de tipo salvaje. El polipéptido derivado de fXa retiene la capacidad de fXa para unirse a un inhibidor de fXa, pero no se ensambla en un complejo de protrombinasa. El polipéptido derivado de fXa es un polipéptido bicatenario que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 3, que incluye una cadena ligera (SEQ ID NO. 4) y una cadena pesada (SEQ ID NO. 5) conectadas con un único enlace de disulfuro entre la Cisteína 98 (Cys98) de la cadena ligera y la Cisteína 108 (Cys108) de la cadena pesada. En un aspecto, la formulación acuosa incluye al menos 5 mg/ml del polipéptido. En un aspecto, la formulación acuosa incluye al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 mg/ml del polipéptido.

Se incluye un componente cristalino en la formulación a una concentración adecuada para formar una matriz cristalina durante el procedimiento de liofilización. La formulación de la matriz cristalina es útil para prevenir el colapso, como se demuestra en los ejemplos.

Un "componente cristalino" se refiere a una molécula que forma una matriz cristalina en una formulación que incluye un polipéptido, durante un procedimiento de liofilización. Ejemplos no limitantes de componentes cristalinos incluyen manitol y glicina.

El componente cristalino es manitol (por ejemplo, manitol cristalino). En un aspecto, la concentración del componente cristalino en la formulación acuosa es al menos 1% (p/v). La concentración del componente cristalino en la formulación acuosa es al menos 2%, 2,5%, 3%, 3,5% o 4% (p/v). La concentración del componente cristalino en la formulación acuosa no es mayor que el 8%, o alternativamente no es mayor que el 7%, 6,5%, 6%, 5,5%, 5%, 4,5% o 4% (p/v). La concentración del componente cristalino en la formulación acuosa es de alrededor de 2% a alrededor de 8%, o de alrededor de 2% a alrededor de 6%, o de alrededor de 3% a alrededor de 5,5%, o de alrededor de 4,5% a alrededor de 5,5%, o de alrededor de 4,6% a alrededor de 5,4%, o de alrededor de 4,7% a alrededor de 5,3%, o de alrededor de 4,8% a alrededor de 5,2%, o de alrededor de 4,9% a alrededor de 5,1%, o de alrededor de 4%, 4,5%, o 5% (p/v).

Se incluye un agente solubilizante en la formulación acuosa. La expresión "agente solubilizante" se refiere a sales, iones, hidratos de carbono, agente complejante, polímeros, y otros compuestos que, cuando están presentes en disolución, aumentan la solubilidad de otra molécula (por ejemplo, un ingrediente activo) en la disolución. Ejemplos no limitantes de agentes solubilizantes incluyen arginina y citrato. El agente solubilizante es la arginina.

La presencia del agente solubilizante se demuestra aquí como útil para mantener el polipéptido de fXa soluble y estable en la formulación. La concentración del agente solubilizante (por ejemplo, arginina) es al menos 10 mM, o alternativamente al menos 20 mM, 25 mM, 30 mM, 36 mM, o 40 mM. La concentración del agente solubilizante (por ejemplo, arginina) no es mayor que 55 mM o 50 mM. La concentración del agente solubilizante es de alrededor de 10 mM o 20 mM a alrededor de 55 mM, de alrededor de 35 mM a alrededor de 55 mM, de alrededor de 40 mM a alrededor de 50 mM, de alrededor de 41 mM a alrededor de 49 mM, de alrededor de 42 mM a alrededor de 48 mM, desde alrededor de 43 mM a alrededor de 47 mM, desde alrededor de 44 mM a alrededor de 46 mM, o alrededor de 40 mM, 45 mM o 50 mM. Se observa que, como se usa aquí, el término arginina se refiere al aminoácido así como a las sales (por ejemplo, arginina HCl) del mismo. La arginina tiene un peso molecular de alrededor de 174,2 Dalton, y la arginina HCl (por ejemplo, L-arginina HCl) tiene un peso molecular de alrededor de 210,7 Dalton.

En una descripción, el agente solubilizante es citrato o una sal del mismo. La sal de citrato es citrato de sodio. El citrato puede comprender una concentración de alrededor de 1,0 mM a alrededor de 200,0 mM. La concentración del citrato puede ser alrededor de 25 mM. La concentración del citrato puede ser alrededor de 50 mM. La concentración del citrato puede ser alrededor de 5 mM, 10 mM o 20 mM. El citrato puede comprender una concentración de alrededor de 0,05 M a alrededor de 0,2 M.

Se incluye un estabilizador en la formulación acuosa. El término “estabilizador” denota un excipiente farmacéuticamente aceptable, que protege el ingrediente activo (por ejemplo, los polipéptidos derivados de fXa) y/o la formulación de la degradación química y/o física durante la fabricación, almacenamiento y aplicación. Los ejemplos de estabilizadores pueden incluir sacarosa, arginina, citrato, manitol, trehalosa, glicina, cloruro de sodio, dextrano, y glucosa. El estabilizador es sacarosa.

En una descripción, la concentración del estabilizador en la formulación acuosa (por ejemplo, sacarosa) es al menos alrededor de 0,5% (p/v). La concentración del estabilizador en la formulación acuosa (por ejemplo, sacarosa) es al menos alrededor de 1%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, o 2% (p/v). La concentración del estabilizador en la formulación acuosa (por ejemplo, sacarosa) no es mayor que alrededor de 3%, 2,5% o 2% (p/v). La concentración del estabilizador en la formulación acuosa (por ejemplo, sacarosa) es de alrededor de 1% a alrededor de 3%, o de alrededor de 1,5% a alrededor de 2,5%, o de alrededor de 1,6% a alrededor de 2,4%, o de alrededor de 1,7% a alrededor de 2,3%, o de alrededor de 1,7% a alrededor de 2,2%, o de alrededor de 1,9% a alrededor de 2,1%, o alrededor de 1%, 1,5%, 2%, 2,5% o 3% (p/v).

En algunos aspectos, la formulación acuosa puede incluir además un tensioactivo, un amortiguador, un agente de tonicidad, un crioprotector, un tensioactivo, un lioprotector, un conservante, o combinaciones de los mismos.

La formulación acuosa tiene un pH que es 7,5 o mayor. El pH no es mayor que 8. En algunos aspectos, el pH está entre 7,5 y 8,2, entre 7,6 y 8,1, entre 7,7 y 7,9, o alrededor de 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8.

En un aspecto, la formulación acuosa incluye alrededor de 45 mM de arginina, alrededor de 2% de sacarosa (p/v), alrededor de 5% de manitol (p/v), y alrededor de 10 mg/ml de un antídoto r bicatenario, en la que la formulación tiene un pH de alrededor de 7,8. En un aspecto, la formulación acuosa incluye alrededor de 45 mM de arginina, alrededor de 2% de sacarosa (p/v), alrededor de 5% de manitol (p/v), y alrededor de 20 mg/ml de un antídoto r bicatenario, en la que la formulación tiene un pH de alrededor de 7,8. En un aspecto, la formulación acuosa incluye alrededor de 45 mM de arginina, alrededor de 2% de sacarosa (p/v), alrededor de 5% de manitol (p/v), y alrededor de 40 mg/ml de un antídoto r bicatenario, en la que la formulación tiene un pH de alrededor de 7,8. En un aspecto, la formulación acuosa incluye además 0,01%-0,02% (p/v) de Polisorbato 80 y un amortiguador.

B. Liofilización y composiciones liofilizadas

También se proporcionan, en algunas realizaciones, métodos para liofilizar las formulaciones acuosas de la presente descripción. En un aspecto, la descripción proporciona un ciclo de liofilización conservativo como se ejemplifica en la Tabla 8.2, que incluye una etapa de congelación, una etapa isotérmica, una etapa de recocción, una etapa de secado primario, y una etapa de secado secundario.

En otro aspecto, el ciclo de liofilización incluye las etapas que se describen en la Tabla 6. Se observa además que, una vez que se identifica una disolución acuosa adecuada para la liofilización, el método de liofilización de la disolución puede derivarse en consecuencia, con métodos conocidos en la técnica. En un aspecto, una, o más o todas las etapas de secado se llevan a cabo a una temperatura de -40°C o mayor. En un aspecto, las etapas de secado se llevan a cabo a una temperatura de -35°C, -30°C, -25°C, -20°C, -10°C o 0°C o mayor, pero no mayor que 10°C, 15°C, 20°C o 25°C.

En algunos aspectos, también se proporcionan composiciones liofilizadas preparadas liofilizando la formulación acuosa de la presente descripción. En base a las concentraciones de cada agente en la formulación acuosa, se puede determinar fácilmente el contenido relativo del agente en la composición liofilizada.

En un aspecto, la composición liofilizada incluye al menos 5%, o alternativamente al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o 35% (p/p) del polipéptido derivado de fXa. Después, entre los otros ingredientes principales, por ejemplo, puede haber una relación en peso para L-arginina HCl:sacarosa:manitol en el intervalo de (0,5-1,4):(1-3):(2-6). En algunos aspectos, la relación en peso de L-arginina HCl:sacarosa:manitol está en el intervalo de (0,9-1):(1,5-2,5):(4,5-5,5), o (0,91-0,99):(1,6-2,4):(4,6-5,4), o (0,92-0,98):(1,7-2,3):(4,7-5,3), (0,93-0,97):(1,8-2,2):(4,8-5,2), o (0,94-0,96):(1,9-2,1):(4,9-5,1). En algunos aspectos, la composición liofilizada incluye además un tensioactivo y/o la porción sólida de un amortiguador.

Todavía se describe una disolución preparada disolviendo la composición liofilizada de la presente descripción en un disolvente. El disolvente puede ser agua o disolución salina. El disolvente puede ser agua. En un aspecto, la disolución incluye al menos 5 mg/ml, o alternativamente al menos 10 mg/ml del polipéptido diana.

En una realización, la presente descripción proporciona una composición liofilizada que comprende al menos 10% (p/p) del antídoto r, y L-arginina HCl:sacarosa:manitol en una relación en peso de alrededor de 0,95:2:5. En una realización, la presente descripción proporciona una composición liofilizada que comprende al menos 20% (p/p) del antídoto r, y L-arginina HCl:sacarosa:manitol en una relación en peso de alrededor de 0,95:2:5. En una realización, la presente descripción proporciona una composición liofilizada que comprende al menos 40% (p/p) del antídoto r, y L-arginina HCl:sacarosa:manitol en una relación en peso de alrededor de 0,95:2:5.

III. Métodos de uso de las formulaciones

La presente descripción también se refiere a una formulación acuosa o composición liofilizada para uso en métodos terapéuticos de tratamiento, prevención o reducción de hemorragias en un sujeto sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor de fXa, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de la formulación liofilizada al disolverse en un disolvente adecuado. Se contempla que los antídotos o derivados de la presente descripción pueden ser fármacos de corta duración para usarse en situaciones electivas o de emergencia, que pueden neutralizar de forma segura y específica las propiedades anticoagulantes convencionales de un inhibidor de fXa sin causar efectos secundarios hemodinámicos perjudiciales o exacerbación de la respuesta vascular proliferativa a la lesión.

Como se usa aquí, los términos “tratar”, “tratamiento”, y similares, significan obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente un trastorno o signo o síntoma del mismo, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de un trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno.

“Tratar” también cubre cualquier tratamiento de un trastorno en un mamífero, e incluye: (a) prevenir que ocurra un trastorno en un sujeto que pueda estar predispuesto a un trastorno, pero que aún no se haya diagnosticado que lo tiene, por ejemplo prevenir la hemorragia en un paciente con sobredosis de anticoagulante; (b) inhibir un trastorno, es decir, detener su desarrollo, por ejemplo inhibir la hemorragia; o (c) aliviar o mejorar el trastorno, por ejemplo reducir la hemorragia.

Como se usa aquí, “tratar” incluye además una mejora sistémica de los síntomas asociados con la patología y/o un retraso en la aparición de los síntomas. La evidencia clínica y subclínica de “tratamiento” variará con la patología, el individuo, y el tratamiento.

La “administración” se puede efectuar en una dosis, de forma continua o intermitente durante el curso del tratamiento. Los expertos en la técnica conocen los métodos para determinar los medios y la dosificación de administración más eficaces, y variarán con la composición usada para la terapia, el fin de la terapia, la célula diana que se está tratando, y el sujeto que se está tratando. Las administraciones únicas o múltiples se pueden llevar a cabo con el nivel de dosis y el patrón seleccionados por el médico tratante. Las formulaciones de dosificación adecuadas y los métodos de administración de los agentes son conocidos en la técnica. Un “sujeto” de diagnóstico o tratamiento es una célula o un mamífero, incluyendo un ser humano. Los animales no humanos sujetos a diagnóstico o tratamiento incluyen, por ejemplo, muridos, tales como ratas, ratones, cánidos, tales como perros, lepóridos, tales como conejos, ganado, animales deportivos, y mascotas.

Los agentes y composiciones de la presente descripción pueden usarse en la fabricación de medicamentos y para el tratamiento de seres humanos y otros animales mediante administración de acuerdo con procedimientos convencionales, tales como un ingrediente activo en composiciones farmacéuticas.

Un agente de la presente descripción puede administrarse para terapia por cualquier vía adecuada, específicamente por administración parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, e intradérmica). También se apreciará que la vía preferida variará con la condición y edad del receptor, y la enfermedad que se está tratando.

La frase “polímero farmacéuticamente aceptable” se refiere al grupo de compuestos que pueden conjugarse con uno o más polipéptidos descritos aquí. Se contempla que la conjugación de un polímero con el polipéptido es capaz de extender la vida media del polipéptido *in vivo* e *in vitro*. Ejemplos no limitativos incluyen polietilenglicoles, polivinilpirrolidonas, alcoholes polivinílicos, derivados de celulosa, poliácridatos, polimetacrilatos, azúcares, polioles, y sus mezclas.

Los “agentes anticoagulantes” o “anticoagulantes” son agentes que inhiben la formación de coágulos sanguíneos. Los ejemplos de agentes anticoagulantes incluyen, pero no se limitan a, inhibidores específicos de trombina, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa, o factor VIIa, heparina y derivados, antagonistas de la vitamina K, y anticuerpos anti-factor tisular. Los ejemplos de inhibidores específicos de la trombina incluyen hirudina, bivalirudina (Angiomax®), argatrobán y lepirudina (Refludan®). Los ejemplos de heparina y derivados incluyen heparina no fraccionada (UFH), heparina de bajo peso molecular (LMWH), tal como enoxaparina (Lovenox®), dalteparina (Fragmin®), y danaparoid (Orgaran®); y pentasacárido sintético, tal como fondaparinux (Arixtra®). Los ejemplos de antagonistas de la vitamina K incluyen warfarina (Coumadin®), fenocumarol, acenocumarol (Sintrom®), clorindiona, dicumarol, difenadiona, biscumacetato de etilo, fenprocumón, fenindiona, y tiocumarol. En una realización, el anticoagulante es un inhibidor del factor Xa. En una realización, el anticoagulante es betrixaban.

La “terapia anticoagulante” se refiere a un régimen terapéutico que se administra a un paciente para prevenir coágulos sanguíneos o trombosis no deseados. Una terapia anticoagulante comprende administrar uno o una combinación de dos o más agentes anticoagulantes u otros agentes a una dosis y un calendario adecuados para tratar o prevenir los coágulos sanguíneos o trombosis no deseados en el paciente.

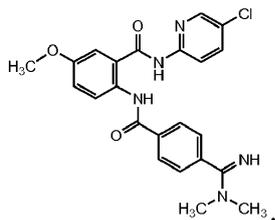
La expresión “inhibidores del factor Xa” o “inhibidores del factor Xa” se refiere a compuestos que pueden inhibir, directa o indirectamente, la actividad del factor de coagulación Xa de catalizar la conversión de protrombina en trombina *in vitro* y/o *in vivo*.

5 Los “inhibidores directos del factor Xa” se unen al fXa directamente, y los ejemplos no limitantes incluyen NAP-5, rNAPc2, inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), DX-DX-9065a (como se describe en, por ejemplo, Herbert, J.M., et al, J Pharmacol Exp Ther. 1996 276(3):1030-8), YM-60828 (como se describe en, por ejemplo, Taniuchi, Y., et al, Thromb Haemost. 1998 79(3):543-8), YM-150 (como se describe en, por ejemplo, Eriksson, B.I. et. al, Blood 2005;106(11), Abstract 1865), apixaban, rivaroxaban, TAK-442, PD-348292 (como se describe en, por ejemplo, Pipeline Insight: Antithrombotics - Reaching the Untreated Prophylaxis Market, 2007), otamixaban, edoxaban (como se describe en, por ejemplo, Hylek EM, Curr Opin Invest Drugs 2007 8(9):778-783), LY517717 (como se describe en, por ejemplo, Agnelli, G., et al, J. Thromb. Haemost. 2007 5(4):746-53), GSK913893, razaxaban, betrixaban, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y combinaciones de los mismos. En un aspecto particular, el inhibidor directo del factor Xa es rivaroxaban. En algunos aspectos, un inhibidor directo de fXa es un compuesto químico de molécula pequeña.

15 La inhibición de la actividad fXa por “inhibidores indirectos del factor Xa” está mediada por uno o más factores. Los ejemplos no limitantes de inhibidores indirectos del factor Xa incluyen fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmina, tinzaparina, heparina de bajo peso molecular (“LMWH”), y combinaciones de los mismos. En un aspecto particular, el inhibidor indirecto del factor Xa es enoxaparina.

20 En una realización, el inhibidor del factor Xa se selecciona de betrixaban, rivaroxaban, LMWH, DX-9065a, YM-60828, YM-150, PD-348292, otamixaban, edoxaban, LY517717, GSK913893, razaxaban, apixaban, y combinaciones de los mismos.

25 El término “betrixaban” se refiere al compuesto “[2-({4-[(dimetilamino)iminometil]fenil}carbonilamino)-5-metoxifenil]-N-(5-cloro(2-piridil)carboxamida” o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. “[2-({4-[(dimetilamino)iminometil]fenil}carbonilamino)-5-metoxifenil]-N-(5-cloro(2-piridil)carboxamida” se refiere al compuesto que tiene la siguiente estructura:



o un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 Betrixaban se describe en las patentes U.S. nºs 6.376.515 y 6.835.739 y en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 2007/0112039, presentada el 7 de noviembre de 2006. Se sabe que betrixaban es un inhibidor específico del factor Xa.

“Neutralizar”, “revertir” o “contrarrestar” la actividad de un inhibidor de fXa, o frases similares, se refieren a inhibir o bloquear la función inhibidora o anticoagulante del factor Xa de un inhibidor de fXa. Dichas frases se refieren a la inhibición parcial o al bloqueo de la función, así como a la inhibición o bloqueo de la mayoría o la totalidad de la actividad del inhibidor de fXa, *in vitro* y/o *in vivo*.

35 “Una cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de derivado suficiente para inducir un resultado biológico y/o terapéutico deseado. Ese resultado puede ser el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En la presente descripción, el resultado típicamente implicará uno o más de los siguientes: neutralización de un inhibidor de fXa que se ha administrado a un paciente, reversión de la actividad anticoagulante del inhibidor de fXa, eliminación del inhibidor de fXa del plasma, restauración de la hemostasia, y reducción o cese de la hemorragia. La cantidad eficaz variará dependiendo del agente antídoto específico usado, el inhibidor de fXa específico que se ha administrado al sujeto, el régimen de dosificación del inhibidor de fXa, el momento de la administración del antídoto, el sujeto y la condición de la enfermedad a tratar, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la forma de administración, y similares, todo lo cual puede ser determinado fácilmente por un experto normal en la técnica.

45 En ciertos aspectos, la disolución se administra para administrar una cantidad del derivado de fXa (por ejemplo, el antídoto r) de alrededor de 10 miligramos (mg) a alrededor de 2 gramos (g). Otras cantidades del antídoto r usadas incluyen de alrededor de 100 mg a alrededor de 1,5 g; de alrededor de 200 mg a alrededor de 1 g; y de alrededor de 400 mg a alrededor de 900 mg. En algunos aspectos, la cantidad del antídoto r usada es alrededor de 400 mg o 960 mg. En algunos aspectos, la cantidad del antídoto r usada es de alrededor de 10 mg a alrededor de 100 mg; de
50 alrededor de 15 mg a alrededor de 95 mg; y de alrededor de 20 mg a alrededor de 80 mg.

En otra realización, la disolución se administra en una cantidad neutralizante que es al menos alrededor de una relación molar de 1:1 veces la concentración circulante de antídoto r con respecto a la concentración circulante del inhibidor del factor Xa durante un período de al menos alrededor de 30 minutos. En otras realizaciones, la relación molar es alrededor de 1:1 o alrededor de 2:1 o alrededor de 4:1.

- 5 La formulación cuando se administra neutraliza el inhibidor del factor Xa en al menos alrededor de 20%, o en al menos alrededor de 50%, o en al menos alrededor de 75%, o en al menos alrededor de 90%, o en al menos alrededor de 95%.

10 Se puede determinar si el método, es decir, la inhibición o reversión de un inhibidor del factor Xa se logra, mediante una serie de ensayos *in vitro*, tal como el ensayo de generación de trombina, y ensayos de coagulación clínicos tales como aPTT, PT y ACT.

15 La presente descripción también se refiere a métodos de unión selectiva e inhibición de un inhibidor de fXa administrado de manera exógena en un sujeto sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor de fXa, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de una disolución de la formulación liofilizada. Los pacientes adecuados para esta terapia se han sometido a una terapia anticoagulante previa, por ejemplo se les ha administrado uno o más de un anticoagulante, tal como un inhibidor directo o indirecto de fXa.

En algunas realizaciones, la disolución se administra después de la administración de una sobredosis de un inhibidor de fXa o antes de una cirugía, lo que puede exponer a los sujetos al riesgo de hemorragia. El sujeto puede ser una célula o un mamífero, tal como un ser humano.

20 El método descrito aquí puede unir e inhibir selectivamente un inhibidor del factor Xa administrado exógenamente en un sujeto sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa, que comprende administrar una disolución de la formulación liofilizada al sujeto. El sujeto puede ser una célula o un mamífero, tal como un ser humano.

25 Los sujetos que se beneficiarán de la administración de la formulación liofilizada disuelta descrita aquí y los métodos que se acompañan incluyen aquellos que están experimentando, o predispuestos a un suceso de hemorragia mayor clínica o un suceso de hemorragia no mayor clínicamente significativo. Se seleccionan ejemplos de sucesos de hemorragia mayor clínica del grupo que consiste en hemorragia, hemorragia en órganos vitales, hemorragia que requiere reoperación o un nuevo procedimiento terapéutico, y un índice de hemorragia $\geq 2,0$ con una hemorragia manifiesta asociada. (Turpie AGG, et al, NEJM, 2001, 344: 619-625). Además, el sujeto puede estar experimentando o predispuesto a un suceso hemorrágico no mayor seleccionado del grupo que consiste en epistaxis que es persistente o recurrente y en una cantidad sustancial o que no se detendrá sin intervención, hemorragia rectal o del aparato urinario que no aumenta a un nivel que requiera un procedimiento terapéutico, hematomas sustanciales en los sitios de inyección o en cualquier otro lugar que sean espontáneos o que ocurran con un trauma trivial, pérdida de sangre sustancial más de lo que generalmente se asocia con un procedimiento quirúrgico que no requiere drenaje, y hemorragia que requiere una transfusión no planificada.

35 En algunas realizaciones, la formulación liofilizada disuelta se administra después de la administración de una sobredosis de un inhibidor de fXa o antes de una cirugía, lo que puede exponer a los sujetos al riesgo de hemorragia.

40 En cualquiera de los métodos descritos aquí, debe entenderse, incluso si no siempre se señala explícitamente, que una cantidad eficaz de la formulación liofilizada disuelta se administra al sujeto. La cantidad puede ser determinada empíricamente por el médico tratante, y variará con la edad, el sexo, el peso y la salud del sujeto. Los factores adicionales que debe considerar el médico tratante incluyen, pero no se limitan a, la identidad y/o la cantidad de inhibidor del factor Xa, que puede haber sido administrado, el método o modo en que la formulación liofilizada se administrará al sujeto, y el criterio de evaluación terapéutico para el paciente. Con estas variables en mente, un experto administrará una cantidad terapéuticamente eficaz al sujeto a tratar.

EJEMPLOS

45 La descripción se entiende además con referencia a los siguientes ejemplos, que están destinados a ser puramente ejemplares de la descripción. La presente descripción no está limitada en su alcance por las realizaciones ejemplificadas, que pretenden ser ilustraciones de aspectos únicos de la descripción solamente. Cualquier método que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de la descripción. Diversas modificaciones de la descripción, además de las descritas aquí, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

50 A menos que se indique lo contrario, todas las temperaturas están en grados Celsius. Además, en estos ejemplos y en otros lugares, las abreviaturas tienen los siguientes significados:

h = hora

INR = índice internacional normalizado

IV = intravenoso

kg = kilogramo

M = molar

mg = miligramo

5 mg/kg = miligramo/kilogramo

mg/ml = miligramo/mililitro

min = minuto

ml = mililitro

PPP = plasma pobre en plaquetas

10 PRP = plasma rico en plaquetas

PT = tiempo de protrombina

U/ml = unidades/mililitro

μ l o ul = microlitro

μ M = Micromolar

15 **Ejemplo 1. Preparación de antídoto r**

Se prepararon amortiguadores de citrato-fosfato (20 mM) con una fuerza iónica de 0,15 (ajustada con NaCl) usando monohidrato de ácido cítrico (Fisher, Pittsburgh, PA) y fosfato de sodio dibásico, anhidro (Sigma, St. Louis, MO), y el pH se ajustó usando HCl 6 M o NaOH 6 M. El amortiguador de fosfato (20 mM) sin sal adicional se preparó disolviendo 6,61 g de fosfato sódico dibásico anhidro en 2,0 l de agua Mili-Q, y el pH se ajustó a 7,5. Para el amortiguador de fosfato (20 mM) que contiene sal (1 = 0,15 M), se añadieron 14,8 g de NaCl al amortiguador de fosfato descrito anteriormente. Todos los demás reactivos se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO) a menos que se indique lo contrario.

El polipéptido del antídoto r (SEQ ID NO. 3) se almacenó en una disolución madre de una concentración de aproximadamente 5 mg/ml en Tris 10 mM, pH 8,0 que contenía 2% de arginina. La diálisis del antídoto r se realizó a 4°C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer®, 3000 MWCO (Pierce, Rockford, IL) contra amortiguadores de citrato-fosfato de valores de pH seleccionados. Para evitar la agregación durante la diálisis, la disolución madre de proteína se diluyó hasta 0,5 mg/ml con amortiguador de diálisis filtrado antes de cargarla en los casetes. Después de la diálisis, el antídoto r se diluyó hasta 0,3 mg/ml, y la concentración de proteína se midió con espectroscopía de absorbancia UV (A_{280}) utilizando un coeficiente de extinción de $1,16 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. El antídoto r producido por este método se usó en los siguientes ejemplos.

30 **Ejemplo 2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) para monitorización de la estabilidad**

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizó utilizando un auto-DSC capilar Microcal con una cámara de carga de muestra con temperatura controlada. Se realizaron rampas térmicas de 6 a 100°C con una velocidad de barrido de 60°C/h y un período de equilibrado de barrido previo de 25 minutos. Se usó el amortiguador de correspondencia adecuado en la celda de referencia, mientras que las concentraciones de muestra típicas en el amortiguador de correspondencia fueron $\sim 0,6 \text{ mg/ml}$. Un barrido de referencia de disolución amortiguadora frente a disolución amortiguadora se restó de todos los barridos de muestra, y los termogramas se normalizaron por concentración antes del análisis. Los datos se procesaron utilizando el software suministrado por Microcal. Los picos endotérmicos se ajustaron a un solo pico utilizando una función de ajuste que no es de dos estados, y los valores de temperatura de transición (T_m) se calcularon mediante la función de ajuste. Los valores de temperatura de comienzo (T_{comienzo}) se determinaron por la desviación del pico endotérmico de una línea de base de baja temperatura.

DLS a menudo se emplea para mostrar la presencia de múltiples poblaciones en una muestra heterogénea. Usando un lector de placas Wyatt DLS, se midieron 10-20 μ l de disolución de proteína (0,3 mg/ml) a diferentes condiciones de pH en un solo conjunto de experimentos a 20°C. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 3000 rpm para eliminar las burbujas de aire, y se obtuvieron 5 barridos de 20 segundos cada uno para obtener un radio de muestra promedio. A pH 5,0-7,5, se observó una sola población con un radio hidrodinámico $\sim 3 \text{ nm}$.

Ejemplo 3. Identificación de estabilizadores

5 Los datos del Ejemplo 2 demostraron que el antídoto r era en general estable a pH 7,5. De este modo, los estudios de detección de excipientes se realizaron a pH 7,5 en un amortiguador de fosfato 20 mM. El diámetro hidrodinámico de la proteína se midió utilizando un instrumento lector de placas de dispersión de luz dinámica Dynapro (Wyatt Technology, Santa Bárbara, CA). El diámetro hidrodinámico se calculó a partir del coeficiente de difusión mediante la ecuación de Stokes-Einstein utilizando el método de acumulantes (basado en el número lognormal). Las medidas se utilizaron para evaluar la homogeneidad de la muestra suministrada.

10 Primero se empleó un lector de placas SpectraMax M3 para identificar posibles excipientes estabilizadores mediante la monitorización de la cinética de agregación de proteínas a 60°C, pH 7,5 con 0,3 mg/ml de proteína con o sin excipientes. En total, se analizaron 32 excipientes de una biblioteca de excipientes generalmente considerados seguros (GRAS) como se enumera en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Lista de excipientes y concentraciones evaluados mediante estudio cinético a OD 350 nm

Excipiente	Concentración	Excipiente	Concentración
Sulfato de dextrano	0,0075 mM	Tween 20	0,10%
Dextrano T70	0,0075 mM	Tween 80	0,10%
Ácido ascórbico	0,15 M	Pluronic F-68	0,10%
Ácido aspártico	0,15 M	Albúmina	5,00%
Ácido glutámico	0,15 M	Gelatina	5,00%
Ácido láctico	0,15 M	Lactosa	20,0%
Ácido málico	0,15 M	Trehalosa	10,00%
Arginina	0,3 M	Dextrosa	20,00%
Dietanolamina	0,3 M	Sacarosa	20,0%
Guanidina	0,3 M	Manitol	10,00%
Lisina	0,3 M	Sorbitol	20,00%
Prolina	0,3 M	Glicerol	20,00%
Glicina	0,3 M	α Ciclodextrina	2,50%
Cloruro de calcio	0,015 M	2-OH propil β -CD	10,00%
Citrato de sodio	0,2 M	2-OH propil γ -CD	10,00%
Brij 35	0,10%	EDTA	1 mM y 5 mM

15 Se determinó que de los excipientes evaluados, la sacarosa, el sorbitol y el citrato tuvieron el mayor efecto estabilizador. Los ensayos posteriores del efecto de las combinaciones de excipientes sobre la estabilidad de la proteína se basaron en estos tres excipientes como se resume en la Tabla 4.2. Las fusiones a OD 350 nm se realizaron por duplicado, y los valores de ΔT para cada formulación se calcularon como se describió anteriormente. En base a los valores de ΔT que se muestran en la Tabla 2, se identificó que las formulaciones 3, 4, 5 y 6 tienen el mayor efecto estabilizador.

Tabla 4.2 Lista de combinaciones de excipientes evaluadas y los valores ΔT correspondientes y osmolalidad de la disolución.

Nº	Componentes	ΔT (°C)	Osmolalidad (mOsm/kg)
1	Sacarosa 10% + Sorbitol 5%	3,1	943 \pm 13
2	Sacarosa 5% + Sorbitol 10%	3,8	1066 \pm 8
3	Sacarosa 10% + Sorbitol 5% + Citrato de sodio 0,05 M	> 10,0	1098 \pm 21
4	Sacarosa 5% + Sorbitol 10% + Citrato de sodio 0,05 M	> 10,0	1253 \pm 8
5	Sacarosa 5% + Sorbitol 5% + Citrato de sodio 0,05 M	6,2	863 \pm 10
6	Sacarosa 10% + Citrato de sodio 0,05 M	6,5	755 \pm 9
7	Sorbitol 10% + Citrato de sodio 0,05 M	5,8	1008 \pm 6

ΔT es la diferencia entre las temperaturas de transición de la proteína sola y la proteína con una combinación diferente de excipientes a pH 7,5. La osmolalidad se promedia a partir de medidas por triplicado, y ΔT se promedia a partir de medidas duplicadas.

5 Las propiedades de agregación de la proteína terapéutica en estas formulaciones se estudiaron adicionalmente usando el método de fusión a OD 350 nm en amortiguador de fosfato 20 mM a pH 7,5, sin NaCl, en estas formulaciones de combinación. En general, el grado de agregación es mucho menor sin NaCl. De hecho, la fusión a OD 350 nm se llevó a cabo inicialmente de 35-75°C, y puesto que no se observó agregación obvia, los experimentos de fusión se volvieron a llevar a cabo con las mismas muestras desde 75 hasta 100°C. De este modo, se puede observar una ruptura en la curva de OD 350 nm a 75°C debido a una pausa de ~10 min a esta temperatura. No se observó agregación obvia para las proteínas en las formulaciones 3, 4, 5 y 6, incluso después de aumentar hasta 100°C. Otro beneficio de eliminar NaCl adicional es que la osmolalidad correspondiente de las formulaciones es mucho menor en comparación con las formulaciones con NaCl.

Ejemplo 4. Ensayo de solubilidad

15 Este ejemplo evalúa el efecto del pH, la temperatura, los estabilizadores (por ejemplo, citrato, arginina, glicina y lisina) y la fuerza iónica sobre la solubilidad del antídoto r.

Material y métodos

20 El material usado fue una disolución de antídoto r (4,8 mg/ml) en Tris 10 mM, pH 8,0, y 2% de arginina. Para la solubilidad a temperatura ambiente (RT), el ensayo se realizó mediante observación física durante al menos 1-2 h. Para la solubilidad a 5°C, las muestras se equilibraron a 5°C durante la noche, y se realizó una observación física de las muestras. Además, las muestras se centrifugaron a 5°C durante 15 minutos, y las concentraciones de proteína en el sobrenadante se analizaron por UV A280 nm (dilución duplicada). La disolución madre original se analizó diariamente como control.

25 Cuando se observó precipitación de proteínas, la solubilidad determinada a partir de la concentración de sobrenadante se interpretó como <XX mg/ml (barras sombreadas en las figuras correspondientes). Esto se debe a la cantidad en exceso de presencia de proteína y a la precipitación preferencial de una subpoblación de proteína que tiene PI cerca del pH del amortiguador. Cuando no se observa precipitación de proteína, la solubilidad determinada a partir de la concentración de la disolución se interpretó como >XX mg/ml (barras en blanco en las figuras).

30 El impacto del pH sobre la solubilidad a temperatura ambiente se ensayó con diferentes pH, incluyendo 5,0, 6,0, 7,0 y 8,0. Como se muestra en la FIG. 1A, el antídoto r tenía la mayor solubilidad a pH 8,0 (42,2 mg/ml sin precipitación visible). Por el contrario, la solubilidad fue 3,5 mg/ml (sin precipitación), 12,3 mg/ml (precipitación observada) y 24,4 mg/ml (precipitación observada) a pH 5,0, 6,0 y 7,0, respectivamente.

La Tabla 5.1 enumera las muestras analizadas para la solubilidad a 5°C. Como se muestra, el amortiguador de UF está compuesto de MES 42 mM, fosfato de sodio 4 mM, NaCl 833 mM, Tris 8 mM, y arginina 58 mM concentrada hasta ~5 mg/ml.

Tabla 5.1 Muestras analizadas para la solubilidad del antídoto r a diferentes pH con diferentes solubilizantes (citrato o arginina)

Muestra	Composición	Citrato/Arginina	pH ($\pm 0,02$)	Osmolalidad calculada
Citrato 10 mM	Na phos 10 mM, 9,5% de sacarosa, 0,01% de PS80, Citrato 10 mM	Citrato 10 mM	7,30	353
Citrato 3 mM	Na phos 10 mM, 9,5% de sacarosa, 0,01% de PS80, Citrato 3 mM	Citrato 3 mM	7,30	325
Citrato 0 mM	Na phos 10 mM, 9,5% de sacarosa, 0,01% de PS80	Citrato 0 mM	7,30	313
pH 7,80	Na phos 10 mM, 9,5% de sacarosa, 0,01% de PS80	n/a	7,80	313
pH 7,55	Na phos 10 mM, 9,5% de sacarosa, 0,01% de PS80	n/a	7,55	313
Amortiguador de UF	MES 42 mM, NaPhos 4 mM, NaCl 833 mM, Tris 8 mM, Arg 58 mM	Arg 58 mM	7,48	1942

5 A pH 7,3, citrato 10 mM mejoró ligeramente la solubilidad del antídoto a 5°C. Sin citrato o arginina, la solubilidad a 5°C tenía el siguiente orden de rango: pH 7,55 > pH 7,80 > pH 7,30 (FIG. 1B). El amortiguador de UF (pH 7,48) parecía tener la mejor solubilidad (50 mg/ml), probablemente debido a la presencia de Arg 58 mM + NaCl 833 mM al pH adecuado, 7,5 (FIG. 1B).

10 La Tabla 5.2 enumera las muestras para evaluar el efecto de la arginina frente al citrato a pH 7,55. Como se muestra en la FIG. 1C, a pH 7,55, tanto el citrato como la arginina mejoraron significativamente la solubilidad del antídoto r a 5°C. Además, parecía que el citrato era más eficaz que la arginina con la misma molaridad: - citrato 10 mM ~ arginina 50 mM > arginina 20 mM > arginina 10 mM.

Tabla 5.2 Muestras analizadas para determinar la solubilidad del antídoto r en citrato y arginina a pH 7,55

Muestra	Composición	Citrato/Arginina	pH ($\pm 0,02$)	Osm. calc.
0 mM	Na phos 10 mM, 9,5% de sacarosa, 0,01% de PS80 (conjunto 1)	n/a	7,55	313
Citrato 10 mM	Na phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de PS80, Citrato 10 mM	Citrato 10 mM	7,55	307
Arg 10 mM	Na phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de PS80, Arg 10 mM	Arg 10 mM	7,55	297
Arg 20 mM	Na phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de PS80, Arg 20 mM	Arg 20 mM	7,55	327
Arg 50 mM	Na phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de PS80, Arg 50 mM	Arg 50 mM	7,55	417

15 El efecto de la arginina frente al citrato se ensayó adicionalmente a pH 7,8 y 8,0, utilizando las muestras de la tabla 5.3. La FIG. 1D muestra que el antídoto r era ligeramente más soluble a pH 8,0 que a pH 7,8 a 5°C. Tanto el citrato 10 mM como la arginina 20 mM mejoraron la solubilidad hasta al menos 15 mg/ml a pH 7,8 y 8,0.

Tabla 5.3 Muestras analizadas para determinar la solubilidad del antídoto r en citrato y arginina a pH 7,8 y 8

Muestra	Composición base	Citrato/Arg adicional	pH (± 0,02)	Osm. calc.
pH 7,8	Na phos 10 mM, 9,5% de sacarosa, 0,01% de PS80 (conjunto 1)	n/a	7,80	313
pH 7,8, Citrato 10 mM	Na phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de PS80, Citrato 10 mM	Citrato 10 mM	7,80	307
pH 7,8, Arg 20 mM	Na phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de PS80, 20 mM Arg	Arg 20 mM	7,80	327
pH 8,0	Na phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de PS80	n/a	8,00	267
pH 8,0, Citrato 10 mM	Na phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de PS80, Citrato 10 mM	Citrato 10 mM	8,00	307
pH 8,0, Arg 20 mM	Na phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de PS80, 20 mM Arg	Arg 20 mM	8,00	327
Tris/Arg	Tris 10 mM, 2% de Arg	Arg 114 mM	8,00	352

5 También se comparó el efecto de la arginina con la glicina y la lisina a pH 7,8 (Tabla 5.4), y los resultados se muestran en la FIG. 1E. Como se muestra en la figura, la glicina y la lisina no tuvieron un efecto sobre la solubilidad del antídoto r a 5°C, y se observó un mayor efecto solubilizante para Arg 20 mM a pH 8,0 frente a pH 7,55 a 5°C.

Tabla 5.4 Muestras analizadas para determinar la solubilidad del antídoto r en glicina, lisina y arginina a pH 7,8

Muestra	Composición base	Gly/Lys/Arg adicional	pH (± 0,02)	Osm. calc.
pH 7,80	Na phos 10 mM, 9,5% de sacarosa, 0,01% PS80	n/a	7,80	313
pH 7,8, Glicina 20 mM	Na phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% PS80, Gly 20 mM	Gly 20 mM	7,80	307
pH 7,8, Lisina 20 mM	Na phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% PS80, Lys 20 mM	Lys 20 mM	7,80	327
pH 7,8, Arg 20 mM (conjunto 3)	Na phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% PS80, Arg 20 mM (conjunto 3)	Arg 20 mM	7,80	327
pH 7,55, Arg 20 mM	Na phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% PS80	Arg 20 mM	7,55	327

10 También se ensayó el efecto de la fuerza iónica sobre la solubilidad del antídoto r (Tabla 5.5). Como se muestra en la FIG. 1F, la fuerza iónica (IS) aumentó la solubilidad del antídoto r a 5°C en ausencia de arginina o citrato, y el efecto fue prominente a una fuerza iónica > 0,10 M.

Tabla 5.5 Muestras analizadas para determinar la solubilidad del antídoto r a diferente fuerza iónica a pH 7,8

Muestra	Composición base	Gly/Lys/Arg adicional	pH (± 0,02)	Osm. calc.
pH 7,8, IS 0,03 M (conjunto 1)	phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de Tween 80, 100 ml	n/a	7,80	277
pH 7,8, IS 0,03 M	phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de Tween 80, 100 ml	n/a	7,80	277
pH 7,8, IS 0,10 M	phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de Tween 80, 100 ml	n/a	7,80	417
pH 7,8, IS 0,30 M	phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de Tween 80, 100 ml	n/a	7,80	817
pH 7,8, IS 1,00 M	phos 10 mM, 8% de sacarosa, 0,01% de Tween 80, 100 ml	n/a	7,80	2217

5 En resumen, este ejemplo demuestra que a temperatura ambiente en ausencia de un agente solubilizante tal como arginina y citrato, el antídoto r tiene la solubilidad más alta a pH 8,0. A 5°C, el pH 8,0 fue el mejor para el antídoto r. Además, tanto el citrato como la arginina mejoran significativamente la solubilidad a 5°C del antídoto r. Sin embargo, la glicina y la lisina, que aumentan la T_m para el antídoto r, no tienen efecto sobre la solubilidad. En general, la mayor solubilidad del antídoto r a 5°C se logró a pH 7,8 con arginina 95 mM. No se observó precipitación después de 10 días.

Ejemplo 5. Procedimiento de liofilización inicial

10 El procedimiento de liofilización se desarrolló utilizando un enfoque racional basado en la comprensión de la naturaleza física de los componentes de la formulación en diferentes etapas del ciclo de liofilización. Se utilizaron métodos de caracterización térmica que incluyen DSC y microscopía de liofilización (FDM) para medir T_{g'} (temperatura de transición vítrea del concentrado congelado) y T_c (temperatura de colapso durante el secado primario). El ciclo que se muestra en la Tabla 6 se seleccionó para la liofilización de la formulación liofilizada. La etapa de recocción permite la cristalización del manitol para asegurar que la temperatura del producto no caiga por debajo de la temperatura de colapso durante el secado primario. La temperatura de secado primario se seleccionó para evitar el colapso de la torta con una duración razonable de secado primario. La condición de secado secundario de 2 etapas se desarrolló para producir una formulación liofilizada con un nivel de humedad de <1%.

Tabla 6. Ciclo de liofilización

Etapas n°	Etapas del procedimiento	Descripción
1	Congelación	Enfríe a 1°C/min hasta -40°C
2	Congelación	Mantenga isoterma a -40°C durante al menos 180 min
3	Recocción	Eleve hasta -20°C a 1°C/min, y mantenga durante al menos 180 min
4	Congelación	Enfríe a 1°C/min hasta -40°C, y mantenga durante al menos 180 min
5	Evacuación	Inicie el vacío a 100 mTorr
6	Secado primario	Eleve a 0,5°C/min hasta 10°C. Mantenga durante 40 horas
7	Secado secundario 1	Eleve hasta 30°C a 0,5°C/min, mantenga durante 20 horas a 75 mTorr

20 **Ejemplo 6. Liofilización sin un componente cristalizante**

Experimental/Diseño del estudio

Se prepararon diez formulaciones diferentes para evaluar los efectos de la composición del amortiguador, el pH, el estabilizador, y la concentración del fármaco sobre la solubilidad y la estabilidad del antídoto r (Tabla 7). Las

formulaciones se prepararon usando un amortiguador de Tris o de fosfato a pH 7,8 y 8,2. Las disoluciones se concentraron hasta 10 mg/ml y 25 mg/ml usando filtración centrífuga.

5 Las muestras de las disoluciones concentradas preparadas en amortiguadores de tris o de fosfato se colocaron en estabilidad a corto plazo a 2-8°C y 25°C durante 2 semanas. Al mismo tiempo, se usaron muestras de cada disolución para estudios de congelación/descongelación, y se examinaron para determinar la precipitación y la agregación. Las muestras para estudios de congelación/descongelación consistieron en 0,5 ml de cada formulación en un vial de tubo de vidrio de tipo I de 2 ml. La muestra de 0,5 ml se inspeccionó visualmente antes de la congelación y después de cada ciclo de congelación/descongelación. Cada muestra se colocó a -80°C durante aproximadamente 2 horas, se descongeló durante aproximadamente 15 a 30 minutos a temperatura ambiente, se inspeccionó visualmente durante 10 aproximadamente 1-2 minutos, y se devolvió al congelador a -80°C. Se extrajo una muestra de 250 l de cada formulación después del tercer ciclo de congelación, y se envió al laboratorio para los ensayos. La disolución restante se sometió a 2 ciclos de congelación adicionales, y después se envió al laboratorio para los ensayos.

Toda la disolución restante se liofilizó como muestras de 0,25 ml utilizando un ciclo conservativo, y las muestras se colocaron en una estabilidad acelerada a 25°C y 40°C.

15 Se prepararon dos formulaciones adicionales usando una disolución libre de polisorbato para evaluar los efectos de congelación/descongelación y liofilización en la molécula sin la presencia de agentes protectores (Formulaciones 5 y 6 en la Tabla 7). Las muestras de las disoluciones se reservaron y se usaron para la caracterización térmica usando DSC modulada y microscopía de liofilización.

Tabla 7. Números de formulación, componentes, concentraciones, y valores de pH

Nº	Componentes	Concentración	pH
1A	Tris 10 mM, 4% de Sacarosa, Arginina 95 mM, PS80 0,01%	10 mg/ml	7,8
1B	Tris 10 mM, 4% de Sacarosa, Arginina 95 mM, PS80 0,01%	25 mg/ml	7,8
2A	Tris 10 mM, 4% de Sacarosa, Arginina 95 mM, PS80 0,01%	10 mg/ml	8,2
2B	Tris 10 mM, 4% de Sacarosa, Arginina 95 mM, PS80 0,01%	25 mg/ml	8,2
3A	Phos 10 mM, 4% de Sacarosa, Arginina 95 mM, PS80 0,01%	10 mg/ml	7,8
3B	Phos 10 mM, 4% de Sacarosa, Arginina 95 mM, PS80 0,01%	25 mg/ml	7,8
4A	Phos 10 mM, 4% de Sacarosa, Arginina 95 mM, PS80 0,01%	10 mg/ml	8,2
4B	Phos 10 mM, 4% de Sacarosa, Arginina 95 mM, PS80 0,01%	25 mg/ml	8,2
5	Tris 10 mM, Arginina 95 mM	25 mg/ml	7,8
6	Phos 10 mM, Arginina 95 mM	25 mg/ml	7,8

20 Las formulaciones se prepararon usando la sustancia farmacológica a granel suministrada a 3 mg/ml, 3,3 mg/ml y 4,8 mg/ml, con y sin polisorbato 80 (PS80).

25 Las Formulaciones 5 y 6 se prepararon primero usando 19 ml de la disolución de fármaco a granel para cada formulación. El volumen de la carga se colocó en un casete de diálisis que tenía una membrana de 10 K, y el casete se colocó en 2 l de amortiguador Tris 10 mM o fosfato de sodio 10 mM a pH 7,8. Las disoluciones se dializaron durante aproximadamente 2 horas, la disolución de diálisis se reemplazó con otros 2 litros nuevos de disolución de amortiguador, y se dializó durante al menos otras 2 horas. La disolución se retiró de cada casete, y se colocó en tubos de filtro centrífugo Amicon Ultra Ultracel 10K. Las disoluciones se centrifugaron durante aproximadamente 30 minutos a velocidad $\frac{3}{4}$. La disolución restante se retiró de los tubos de centrifuga, y se añadió arginina 95 mM, seguido de un ajuste del pH y del volumen de la disolución concentrada.

30 Se usó el mismo procedimiento para preparar las formulaciones 1A a 4A y 1B a 4B. Las formulaciones preparadas usando una disolución a granel con 3 mg/ml usaron 13,5 ml de carga para preparar las disoluciones de 10 mg/ml, y 33,5 ml de carga para preparar las disoluciones de 25 mg/ml. Las formulaciones que usaron la disolución a granel de 4,8 mg/ml usaron 8,4 ml de carga para preparar la disolución de 10 mg/ml, y 20,9 ml de carga para preparar la disolución de 25 mg/ml.

35 Las concentraciones de sacarosa y arginina necesarias para el volumen final de la disolución de la muestra se añadieron a la disolución a granel tras concentrar la disolución, y después la disolución se ajustó al pH y volumen final

apropiados. Se añadió PS80 a las disoluciones de muestra finales para crear una concentración de 0,01% usando una disolución al 1% de PS80.

Las disoluciones se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,22 μm , y después se dividieron en viales. Viales de 2 ml se llenaron cada uno con 250 μl de disolución, y se liofilizaron usando las siguientes condiciones:

- 5
 1. Enfríese hasta -40°C a $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$
 2. Manténgase a -40°C durante 1 hora, después reinicie el vacío a 100 mTorr
 3. Eleve hasta -35°C a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y mantenga hasta que la medida del medidor Pirani coincida con la medida del manómetro de capacitancia de 100 mTorr y la temperatura del producto alcance la temperatura de la bandeja del liofilizador.
- 10
 4. Eleve hasta 20°C a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y mantenga hasta que la medida del medidor Pirani coincida con la medida del manómetro de capacitancia de 100 mTorr y la temperatura del producto alcance la temperatura de la bandeja del liofilizador.

Los tapones se sellaron, y los viales se taparon tras la liofilización. Las muestras se sometieron a un ensayo de punto de tiempo inicial (T0), y los viales restantes se colocaron en estabilidad.

15 Calorimetría diferencial de barrido modulada (DSC)

El comportamiento térmico de las muestras de disolución se examinó usando DSC modulada y estándar. Las muestras se examinaron colocando 12 μl de disolución en bandejas Tzero, y se sellaron herméticamente. Las disoluciones se enfriaron hasta -40°C a $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y se mantuvieron isotérmicamente durante 5 minutos. La temperatura de las muestras se elevó hasta 10°C a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, con una modulación de 1°C cada 120 segundos. Algunas muestras se examinaron usando una etapa de recocción. Esas muestras se examinaron enfriando hasta -40°C a $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, manteniendo isotérmicamente durante 5 min, elevando la temperatura hasta -15°C o -20°C a 1 a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y manteniendo isotérmicamente durante al menos 60 minutos. La temperatura de las muestras se devolvió hasta -40°C a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, se mantuvo isotérmicamente durante 5 min, y se elevó a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ con una modulación de 1°C cada 120 segundos.

Microscopía de liofilización

25 Las muestras se examinaron usando microscopía de liofilización colocando 2 a 4 μl de disolución entre 2 cubreobjetos de vidrio en una etapa de microscopio de liofilización Linkam. La muestra se enfrió hasta -40°C o menor a $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y se mantuvo isotérmicamente durante 2 min. El vacío se inició a 100 micrómetros, y la muestra se examinó visualmente usando una cámara de vídeo montada sobre un microscopio de luz polarizada. La muestra se liofilizó a esa temperatura hasta que el material seco era visible, y se fotografió. Después, la temperatura de la muestra se incrementó en incrementos de 2°C , y se mantuvo a cada temperatura para observar la muestra liofilizada. La temperatura de la muestra se incrementó hasta que se observó un colapso completo.

Métodos analíticos

A. Concentración mediante UV-Vis

35 La concentración de las disoluciones se midió usando un espectrofotómetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific). Los barridos se realizaron colocando 2 μl de disolución en la plataforma de ensayo, y barriendo en el intervalo de 280 nm.

B. pH

El pH de las disoluciones se midió usando un peachímetro Orion modelo 920A. El medidor/sonda se calibró en el intervalo de pH 7 a pH 10 usando disoluciones de amortiguador prefabricadas adquiridas de Thermo Scientific.

C. SEC-HPLC

40 El análisis de HPLC mediante exclusión por tamaño se llevó a cabo usando un HPLC Agilent Serie 1100. Para la separación, se usó una fase móvil preparada a fosfato de sodio 0,1 M, hidrocloreuro de arginina 0,75 M a pH 7,4. La columna analítica usada fue una YMC-Pack diol-200, 300 x 4,6 mm, tamaño medio de partículas 5 μm . La idoneidad del sistema de HPLC, incluyendo la columna, se verificó usando seis inyecciones replicadas de material de referencia, y se evaluaron para determinar el tiempo de retención, área, y porcentaje de área para el pico principal de proteína.

45 Adicionalmente, se usó un patrón de filtración en gel para evaluar la capacidad de separación de la columna. Las muestras se diluyeron a 1 mg/ml de proteína usando el amortiguador de formulación, y se inyectaron para obtener una carga de columna de 50 μg de proteína por inyección.

D. RP-HPLC

El análisis de HPLC de fase inversa se realizó usando un HPLC Agilent Serie 1100. El método emplea un gradiente para la separación usando fases móviles preparadas a 0,1% de ácido trifluoroacético en agua de grado HPLC y 0,08% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo. La columna analítica usada fue una columna Vydac C18, 150 x 4,6 mm, tamaño medio de partículas 5 μ m. La idoneidad del sistema de HPLC, incluyendo la columna, se verificó usando seis inyecciones de réplica de material de referencia y la evaluación del tiempo de retención, área, y porcentaje de área para el pico principal de proteína. Las muestras se diluyeron hasta 1 mg/ml de proteína usando el amortiguador de formulación, y se inyectaron para obtener una carga de columna de 25 μ g de proteína/inyección.

E. IEX

El análisis de HPLC de intercambio iónico se llevó a cabo usando un HPLC Agilent Serie 1100. El método emplea un gradiente que usa fases móviles preparadas a fosfato de sodio 20 mM a pH 6,5 y fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 1 M a pH 6,5. La columna analítica usada fue Dionex Propac WCX-10, 250 x 4 mm. La idoneidad del sistema de HPLC, incluyendo la columna, se verificó usando seis inyecciones de réplica de material de referencia y la evaluación del tiempo de retención, área, y porcentaje de área para el pico marcado como pico #2. Las muestras se diluyeron hasta 1 mg/ml de proteína usando el amortiguador de formulación, y se inyectaron para obtener una carga de columna de 50 μ g de proteína por inyección.

Resultados:

Se liofilizó un subconjunto de las muestras de disolución usando un ciclo conservativo y se colocó en estabilidad durante 2 meses a 25°C y 40°C. El ciclo de liofilización se completó en aproximadamente 20 horas debido al bajo volumen de llenado. Todas las tortas liofilizadas parecieron aceptables excepto para la formulación 2A, posiblemente debido a que el filtro se rasgó.

En general, los datos obtenidos usando SEC y RP parecieron distinguir diferencias entre las formulaciones. Esto sugiere que los métodos indican estabilidad, y que se pueden usar para comparar muestras. Los datos apoyan el hecho de que la estabilidad del antídoto r se ve afectada por el pH. Los datos demuestran que la estabilidad de las formulaciones preparadas a pH 7,8 es mejor que la estabilidad de las formulaciones preparadas a pH 8,2. Esto es especialmente cierto para las muestras almacenadas a 40°C.

Este estudio incluyó una comparación del tipo de amortiguador sobre la estabilidad del antídoto r. Los amortiguadores incluyeron tris y fosfato preparados a pH 7,8 y 8,2. Los datos sugieren que el tipo de amortiguador no afectó a la estabilidad del antídoto r, y que las diferencias en la estabilidad fueron principalmente una función del pH.

Se prepararon dos formulaciones en el estudio (formulaciones 5 y 6) sin sacarosa ni polisorbato 80. La sacarosa se usa como un lioprotector, y el polisorbato 80 se usa para evitar la agregación de proteínas debido a interacciones con las paredes del vial e interacciones con el hielo durante la etapa de congelación. Las formulaciones preparadas sin los protectores mostraron incrementos en porcentaje de agregados según se determina mediante SEC después de 1 mes de almacenamiento a 40°C. Los datos apoyan la necesidad de los excipientes en las formulaciones para mejorar la estabilidad de la proteína.

El estudio de estabilidad también apoya el hecho de que las muestras liofilizadas son más estables que las formulaciones preparadas como disoluciones. La comparación de las muestras de disolución demuestra que la estabilidad de las muestras de disolución es mejor cuando se almacenan a 5°C que cuando se almacenan a mayores temperaturas.

Las muestras para el estudio de estabilidad se prepararon usando 0,25 ml por vial de 2 ml. Solo se observó colapso cuando no hubo suficientes sólidos presentes para apoyar una torta en la muestra 2A. Todas las otras muestras parecieron aceptables; sin embargo, no fue factible determinar el grado de contracción de la torta cuando se usan tales volúmenes bajos de llenado. Los estudios de caracterización térmica se realizaron concurrentemente con los estudios de estabilidad para determinar la factibilidad de liofilizar las formulaciones a escala completa.

Las formulaciones 5 y 6 se examinaron usando DSC modulada. Ambas formulaciones contienen aproximadamente 25 mg/ml del antídoto r y arginina HCl 95 mM, pero la formulación 5 se preparó con Tris 10 mM, y la formulación 6 se preparó con fosfato 10 mM. No se observaron sucesos térmicos durante el aumento de calentamiento cuando se observó usando flujo de calor total, flujo de calor no reversible, o flujo de calor reversible. Un termograma de flujo de calor total mostrará tanto sucesos cinéticamente relacionados como sucesos no relacionados cinéticamente. Los termogramas de flujo de calor no reversible mostrarán sucesos cinéticamente relacionados tales como la cristalización, y los termogramas de flujo de calor reversible mostrarán sucesos no relacionados cinéticamente, tales como transiciones vítreas. La falta de sucesos observables puede sugerir que las concentraciones de los componentes son demasiado bajas para producir una señal con intensidad suficiente.

Se realizaron experimentos de microscopía de liofilización para determinar si la temperatura de colapso coincidiría con los resultados observados para la Tg' determinada usando MDSC. Se esperaba que el comportamiento térmico de todas las muestras fuese similar debido a que todas tuvieron los mismos excipientes a concentraciones similares.

Las formulaciones 5 y 6 se prepararon con una concentración de antídoto r de aproximadamente 25 mg/ml y ambas contenían arginina 95 mM a pH 7,8. La única diferencia entre las formulaciones fue el amortiguador. La formulación 5 contenía tris 10 mM, y la formulación 6 contenía fosfato 10 mM. La formulación 5 exhibió colapso a -40°C, y la formulación 6 exhibió colapso a -39°C. Los datos respaldan que la temperatura del producto debe mantenerse por debajo de la temperatura de colapso determinada para obtener muestras liofilizadas aceptables. Mantener temperaturas de producto tan bajas no es factible en liofilizadores de laboratorio o a escala completa.

Aunque los datos de estabilidad para las formulaciones liofilizadas parecían aceptables, los datos de caracterización térmica demostraron que la formulación no era susceptible de aumento de escala debido a la baja temperatura de colapso. La caracterización térmica obtenida usando MDSC y microscopía de liofilización sugiere que las formulaciones permanecen amorfas después de la congelación y el secado, y que la combinación de componentes conduce a una temperatura de colapso baja. La única forma de crear una formulación que se pueda aumentar de escala es añadir un componente de cristalización para que sirva como un andamio que pueda mantener el material amorfo en su lugar durante y después de la liofilización. El componente cristalizante más común añadido a las formulaciones farmacéuticas es el manitol. Todo el trabajo adicional de desarrollo de formulación y de procedimiento investigó la adición de manitol a diferentes concentraciones. El desarrollo de una formulación que contiene manitol y los estudios de estabilidad para las formulaciones se describen en un informe de desarrollo separado.

Conclusión

Los efectos del tipo de amortiguador, el pH, el estabilizador, y la concentración de proteína sobre la estabilidad del antídoto r se examinaron como formulaciones en disolución y liofilizadas. Las muestras de disolución se almacenaron a 5°C y 25°C durante hasta 2 semanas, y las muestras liofilizadas se almacenaron a 25°C y 40°C durante hasta 2 meses. Las formulaciones liofilizadas como 0,25 ml en viales de 2 ml exhibieron una estabilidad aceptable después de 2 meses. Sin embargo, los experimentos de caracterización térmica demostraron que todas las formulaciones tenían temperaturas de colapso de -37°C o inferiores y no eran susceptibles de aumento de escala. Los datos sugieren que se necesita un componente cristalizante en la formulación para evitar el colapso y permitir la liofilización a temperaturas más altas.

Ejemplo 7. Efecto del tipo de amortiguador y el manitol sobre el comportamiento térmico y la estabilidad de la formulación.

Los datos del Ejemplo 6 sugirieron que se necesitaba un componente cristalizante en la formulación de antídoto r para evitar el colapso durante la liofilización. Este ejemplo examinó los efectos de las concentraciones de manitol y arginina sobre el comportamiento térmico y el aspecto de la torta liofilizada de las formulaciones. Se investigaron formulaciones que contenían 2% a 4% de manitol junto con la reducción de la concentración de arginina. La arginina evitó la cristalización del manitol a menos que la concentración fuera 47,5 mM o menos. Los estudios encontraron que una formulación que contenía tris 10 mM, 10 mg/ml de antídoto r, arginina 45 mM, 2% de sacarosa, 5% de manitol, y 0,01% de polisorbato 80 dio como resultado tortas liofilizadas con aspecto aceptable, y estabilidad física y química. Los estudios de liofilización proporcionaron datos para respaldar el uso de una temperatura de la bandeja de secado primario de -25°C después de la recocción a -25°C durante 3 horas. Un procedimiento de secado secundario de dos etapas da como resultado tortas con valores de humedad residual inferiores al 1%.

Experimental/diseño de estudio

Los estudios fueron diseñados para examinar simultáneamente el comportamiento térmico de las formulaciones y comparar la estabilidad química de las formulaciones que se liofilizaron usando un ciclo conservativo. Las formulaciones iniciales se prepararon con arginina 95 mM, 2% de sacarosa, 2% de manitol, y amortiguadores tris 10 mM o fosfato 10 mM a pH 7,8. Las formulaciones también contenían el ingrediente activo a 10 o 25 mg/ml (Tabla 8.1).

Tabla 8.1 Formulaciones iniciales preparadas con manitol a pH 7,8.

Formulación ID	Arginina (mM)	Tris (mM)	Fosfato (mM)	Sacarosa (%)	Manitol (%)	Antídoto r (mg/ml)
TM1	95	10		2	2	10
TM2	95	10		2	2	25
PM1	95		10	2	2	10
PM2	95		10	2	2	25

Se colocaron partes alícuotas de la disolución de fármaco descongelada en casetes de diálisis con membranas de corte de peso molecular 3K (MWCO). Los casetes se colocaron en las disoluciones de amortiguador que contenían

5 tris o fosfato con arginina, sacarosa y manitol. Cada casete que contenía la disolución del fármaco se colocó en 2 litros de disolución de amortiguador y se dializó durante 4 horas. La disolución de amortiguador se renovó después de 2 horas, y las disoluciones se dializaron durante otras 4 horas o durante la noche a 2-8°C. Las disoluciones se retiraron de los casetes de diálisis usando jeringas BD con agujas 18G, y se colocaron en tubos de filtración centrífuga con membranas de MWCO de 3K. Los tubos se centrifugaron a aproximadamente 3000 RPM durante 20 a 30 minutos, y las concentraciones de las disoluciones se verificaron usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000. Las disoluciones se concentraron a más de 10 mg/ml o 25 mg/ml y se diluyeron hasta las concentraciones apropiadas usando la disolución de amortiguador apropiada, y la concentración de polisorbato se ajustó a 0,01% usando una disolución de polisorbato 80 al 1%. Las disoluciones se filtraron a través de filtros de jeringa de 0,22 µm, y se introdujeron en viales de vidrio con forma de tubo de 3 ml, a 0,25 ml y 0,8 ml por vial. Las disoluciones se liofilizaron usando un ciclo conservativo (Tabla 8.2), y se colocaron en estabilidad a 25°C y 40°C durante hasta 2 meses.

Tabla 8.2 Ciclo de liofilización conservativo usado para formulaciones que contienen manitol.

Etapa	Detalles
Congelación	Eleve a 1°C/min hasta -40°C
Isotermia	Mantenga a 120 min
Recocción	Eleve a 1°C/min hasta -25°C, mantenga durante 180 min
Secado primario	-30°C, mantenga hasta que Pirani = CM
Secado secundario	Eleve a 0,5°C/min hasta 40°C, mantenga hasta que Pirani = CM

Las muestras de cada disolución antes de la liofilización se reservaron para el análisis térmico usando DSC y FDM.

15 Los análisis térmicos adicionales y los estudios de desarrollo del ciclo de liofilización se completaron usando las disoluciones de amortiguador preparadas sin la proteína. Los experimentos se realizaron para determinar la concentración mínima de arginina necesaria en la formulación para solubilizar la proteína sin interferir con la cristalización del manitol. El cliente realizó estudios de solubilidad para determinar la concentración mínima de arginina necesaria para solubilizar la proteína. Baxter realizó experimentos para evaluar el efecto de la concentración de arginina y manitol sobre el comportamiento térmico, las condiciones del ciclo de liofilización, y el aspecto de la torta. 20 Las disoluciones de amortiguador contenían 10 mM de tris con 2% de sacarosa a pH 7,8. Las concentraciones de arginina variaron de 95 mM a 9,5 mM, y las concentraciones de manitol variaron entre 2% y 5%.

Se identificaron buenos candidatos de formulación basados en el comportamiento térmico, el aspecto de la torta, y los datos de estabilidad acelerada a corto plazo. La formulación propuesta para un mayor desarrollo contiene 10-25 mg/ml de antídoto r, tris 10 mM a pH 7,8, arginina 45 mM, 2% de sacarosa, 5% de manitol y 0,01% de polisorbato 80. Los primeros estudios usaron 0,2 ml a 1 ml por vial de 3 ml. El estudio de estabilidad inicial con una formulación baja en arginina se realizó con una concentración de fármaco de 25 mg/ml, y se liofilizó con un ciclo conservativo. Las muestras se colocaron en estabilidad a 25°C y 40°C durante hasta 3 meses.

30 Los ciclos realizados para confirmar el procedimiento usaron una disolución de fármaco introducida en viales de 10 ml a 5 ml por vial. Se usaron el mismo vial y el mismo volumen de llenado para estudiar el efecto del contenido de humedad durante los estudios de secado secundario. Las formulaciones para estos estudios se prepararon usando una disolución de fármaco que se intercambió en el amortiguador apropiado usando una unidad de filtración de flujo tangencial (TFF) a escala de laboratorio. La unidad de TFF estaba equipada con una vasija de retención para la disolución que estaba conectada al filtro de flujo tangencial con tubos. La vasija se llenó con disolución de fármaco, se intercambió en el amortiguador apropiado, y se concentró hasta 10 a 25 mg/ml mediante filtración a través de una membrana de MWCO de 10 KDa. Se añadió una cantidad suficiente de polisorbato 80 al 1% (PS80) para crear una concentración de PS80 al 0,01%. La disolución final se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm o un sistema de filtración a vacío.

40 Los ciclos de liofilización examinaron parámetros del procedimiento tales como la velocidad de rampa de enfriamiento y la velocidad de rampa entre el secado primario y secundario, así como la temperatura de la bandeja durante la recocción y el secado primario. Se realizó un estudio de humedad residual mediante la extracción de muestras al comienzo del secado secundario y después de 4, 8 y 10 horas a 40°C. Se realizó un segundo estudio retirando muestras después de 8 horas a 40°C y después de 1 y 2 horas a 50°C. Las muestras se analizaron para determinar la humedad residual mediante el análisis de Karl Fischer, y el secado se consideró completo cuando los valores de humedad residual alcanzaron una meseta. El efecto de la humedad residual sobre la estabilidad de la formulación se ensayó retirando muestras a veces durante el secado secundario que correspondía a valores específicos de humedad residual. Las muestras se colocaron en estabilidad a 40°C durante hasta 2 meses y a 50°C durante 1 semana.

Se creó un espacio de diseño del ciclo de liofilización para la formulación propuesta del medicamento que contiene 10 mg/ml de antídoto r, tris 10 mM, arginina 45 mM, 2% de sacarosa, 5% de manitol, y 0,01% de polisorbato 80 a pH 7,8. La formulación se introdujo en viales de vidrio de 10 ml con forma de tubo usando 5 ml de disolución por vial. El desarrollo del espacio de diseño requiere el conocimiento de la capacidad del equipo combinado con la temperatura de colapso de la formulación y el coeficiente de transferencia de calor para el vial. El coeficiente de transferencia de calor para el vial se determinó usando el vial de vidrio exacto con forma de tubo usado para el producto, llenando los viales con agua, y sublimando el hielo usando la temperatura de la bandeja destinada a secar el producto. Los datos de temperatura del producto y flujo másico se recogieron mientras se variaba la presión de la cámara de aproximadamente 25 mTorr a aproximadamente 400 mTorr. Los datos de flujo másico se recogieron a cada presión usando espectroscopía de absorción láser de diodo sintonizable (TDLAS), y el cambio en el caudal másico con presión se usa para calcular el coeficiente de transferencia de calor para el vial.

Resultados:

1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las disoluciones individuales de cada componente del amortiguador se prepararon y ensayaron usando DSC para determinar la influencia de cada componente en el comportamiento térmico de la formulación del amortiguador. Típicamente, el comportamiento térmico de la formulación está dictado por el componente presente a la concentración más alta. Los cambios en el comportamiento térmico pueden ocurrir con la adición de otros excipientes o el fármaco. Por ejemplo, la adición de sales puede disminuir la T_g' de los materiales amorfos en la formulación. La formulación farmacológica propuesta contiene manitol. El manitol se añade como excipiente a las formulaciones liofilizadas para servir como agente de carga cristalizante. El manitol es amorfo cuando se congela inicialmente en una disolución. Por lo general, se incluye una etapa de recocción durante la congelación para alentar la cristalización del manitol para que pueda proporcionar estructura a la torta. Otros excipientes y/o el ingrediente activo en una formulación pueden prevenir o retrasar la cristalización del manitol. Los estudios discutidos en esta sección investigaron los efectos de tris, fosfato y arginina en la cristalización del manitol y el comportamiento térmico de la disolución.

Una disolución de tris 10 mM preparada a pH 7,8 se enfrió a $1^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta -50°C (FIG. 2) usando DSC. El termograma muestra la exotermia de cristalización para hielo comenzando a aproximadamente -20°C , seguido de la exotermia de cristalización para tris a -32°C .

La exotermia de cristalización ya no está presente cuando se incluye arginina 95 mM en la formulación (FIG. 3). No se observaron sucesos térmicos además de la endotermia de fusión del hielo dentro del intervalo de temperatura para este estudio.

Se observa una T_g' con un punto medio de aproximadamente -42°C cuando la formulación de Tris 10 mM y arginina 95 mM contiene 4% de sacarosa. El punto medio de la T_g' para sacarosa sola es típicamente alrededor de -33°C . El estudio demuestra que la mezcla de tris/arginina disminuye la T_g' para sacarosa. Una disolución con una T_g' por debajo de -40°C no es un buen candidato para la liofilización. Es difícil mantener una temperatura tan baja del producto durante el secado primario. La adición de un componente de cristalización, tal como el manitol, puede proporcionar estructura y mejorar las posibilidades de liofilización siempre que el manitol cristalice antes del inicio del secado primario.

Se añadió manitol a la formulación al 2% P/V, y la concentración de sacarosa se redujo al 2%, de modo que el contenido total de azúcar en la formulación se mantuvo al 4%. Una disolución preparada con tris 10 mM, 2% de sacarosa, y 2% de manitol demuestra que el manitol comenzará a cristalizar a aproximadamente -20°C (FIG. 4). La cristalización del manitol se evita cuando se añade arginina 95 mM a la disolución (FIG. 5). El manitol no cristalizó incluso cuando la disolución congelada se recoció a -20°C durante hasta 5 horas (FIG. 6).

Se realizó el mismo conjunto de análisis térmicos para disoluciones preparadas con fosfato de sodio 10 mM para evaluar el efecto del amortiguador sobre el comportamiento térmico de la formulación. El fosfato de sodio cristalizó durante la etapa de enfriamiento (FIG. 7) cuando se preparó como una disolución 10 mM a pH 7,8.

Una mezcla de fosfato de sodio 10 mM con arginina 95 mM y 4% de sacarosa exhibe una T_g' con un punto medio a aproximadamente -38°C .

Similar a las disoluciones de tris, las disoluciones de fosfato que contienen sacarosa y manitol exhiben una exotermia de cristalización para manitol (FIG. 8). La exotermia de cristalización no se observa cuando se añade arginina 95 mM a la mezcla (FIG. 9). Similar a la formulación preparada con tris, no se observó exotermia de cristalización para el manitol, incluso cuando la formulación de fosfato se recoció a -20°C durante 5 horas.

Los estudios demuestran que la adición de arginina 95 mM a las formulaciones que contienen tris o fosfato disminuirá drásticamente la T_g' para la sacarosa, y evitará la cristalización del manitol. Los datos demostraron que era necesario un cambio en la formulación para alentar la cristalización del manitol para una torta liofilizada exitosa. En el momento de este estudio, los datos sugirieron que se necesitaba arginina 95 mM o citrato de 10 mM a 20 mM para mantener la solubilidad de la proteína. Por lo tanto, los estudios se realizaron usando disoluciones que contienen citrato 10 mM o

20 mM en tris 10 mM con 2% de sacarosa y 5% de manitol como alternativa a la arginina en la formulación. Se aumentó la concentración de manitol y se disminuyó la concentración de sacarosa para aumentar la probabilidad de cristalización de manitol. Los estudios que usan 2% de sacarosa con 5% de manitol junto con arginina se describen más adelante en este informe.

- 5 Las disoluciones que contienen citrato se recocieron a -25°C. Se observó una exoterma de cristalización con un inicio de 24 minutos en citrato 10 mM a -25°C (FIG. 10), y un inicio de 30 minutos en citrato 20 mM a -25°C (FIG. 11).

2. Microscopía de liofilización (FDM)

- 10 Las formulaciones preparadas con fosfato 10 mM o tris 10 mM con antídoto r de 10 mg/ml, arginina 95 mM, 2% de sacarosa, y 2% de manitol a pH 7,8 se examinaron usando FDM. Los experimentos realizados con la formulación de tris mostraron un inicio de colapso para la formulación a aproximadamente -34°C cuando se recoció a -25°C durante hasta 3 horas.

La formulación que contenía fosfato 10 mM tenía una temperatura de colapso más alta. Se observó una capa seca consistente a -32°C, y se observó el inicio del colapso a -30°C.

- 15 Los datos de FDM sugieren que ambas formulaciones pueden liofilizarse usando condiciones que son susceptibles a una producción habitual. Esto no se correlaciona con los datos obtenidos mediante DSC. Los experimentos realizados con FDM usan capas delgadas de disolución entre dos cubreobjetos de vidrio en contacto directo con una etapa de temperatura controlada. Estas condiciones sugieren una facilidad de secado y, por lo tanto, no se correlacionaron con los datos de DSC, que se basaron en el ensayo subsiguiente dada su relevancia.

3. Liofilización y estabilidad

- 20 Las formulaciones de fosfato y tris preparadas con 10 mg/ml y 25 mg/ml de antídoto r, con arginina 95 mM, 2% de sacarosa, y 2% de manitol a pH 7,8 se examinaron en estabilidad como disoluciones y muestras liofilizadas. Cada disolución se introdujo en viales de 3 ml, a 0,20 ml por vial. Una porción de las muestras se almacenó a 5°C y 25°C durante hasta 2 semanas, y la otra porción de las muestras se liofilizó usando un ciclo conservativo y se colocó en estabilidad a 25°C durante hasta 3 meses y a 40°C durante hasta 2 meses.

- 25 Las muestras se recocieron a -25°C durante 1 hora antes de liofilizar a -30°C. El secado secundario se realizó también usando condiciones conservativas con una temperatura de la bandeja de 20°C. Se usó un ciclo conservativo no convencional debido a que se sabía poco sobre la sensibilidad de la proteína a la temperatura. El ciclo de liofilización se completó en aproximadamente 21 horas. Los viales se sellaron con tapones antes de retirarlos del liofilizador, se taparon y se colocaron en estabilidad.

- 30 Las tortas liofilizadas parecían aceptables sin evidencia de colapso, y se reconstituyeron rápidamente con agua purificada. Un segundo estudio que usó las mismas formulaciones sin el fármaco se realizó simultáneamente para asegurar que la cristalización del manitol, si ocurrió, no dio como resultado la rotura de los viales. Las formulaciones de placebo se introdujeron en viales de 20 ml con 10 ml de disolución cada uno. Una bandeja llena de viales se enfrió hasta -40°C a 1°C/min, se mantuvo isotérmicamente durante 120 minutos, y después se elevó hasta -25°C a 1°C/min durante 3 horas de recocción. Un segundo conjunto de viales se enfrió hasta -25°C, se mantuvo isotérmicamente durante 3 horas, se enfrió hasta -35°C, y después se transfirió al secador que contenía la bandeja llena de viales. Todos los viales se liofilizaron a -30°C y se secaron a 25°C para un secado secundario. Se observó colapso en viales que contenían ambas formulaciones.

- 40 Esto sugiere que el manitol no cristalizó, y respalda la conclusión hecha durante el análisis térmico usando DSC de que la arginina estaba evitando la cristalización del manitol. Por lo tanto, los datos de DSC y liofilización, dada su relevancia para el desarrollo de la formulación, en lugar de los resultados de FDM, se usaron para futuros experimentos.

- 45 Los estudios descritos en el siguiente ejemplo se centraron en la reducción de la arginina y su efecto sobre la solubilidad de la proteína y la cristalización del manitol. Las formulaciones de fosfato y tris preparadas con arginina 95 mM descritas anteriormente permanecieron en estabilidad para proporcionar datos iniciales.

No se observó pérdida de concentración en las muestras de disolución cuando se almacenaron a 5°C y 25°C durante hasta 2 semanas, y no hubo diferencia en la concentración entre las muestras líquidas y liofilizadas a T0 (FIG. 12 y 13).

- 50 De manera similar, no se observaron pérdidas en la concentración en ninguna de las formulaciones liofilizadas almacenadas a 25°C durante hasta 3 meses (FIG. 14) o a 40°C durante hasta 2 meses.

Los datos de SEC muestran que no hubo pérdidas en el pico principal cuando las formulaciones de la disolución se almacenaron a 5°C durante hasta 2 semanas. El porcentaje del pico principal disminuyó en más de 1% en muestras de 10 mg/ml y en más de 3% en muestras de 25 mg/ml cuando se almacenan a 25°C durante hasta 2 semanas.

5 Por lo tanto, aunque la estabilidad química de las formulaciones parece aceptable, los cambios en la formulación fueron necesarios debido a la pobre estabilidad física durante la liofilización. La pobre estabilidad física fue demostrada por las tortas colapsadas observadas para la formulación de placebo. Los datos de los experimentos de DSC sugieren que disminuir la concentración de arginina y aumentar la concentración de manitol debería alentar la cristalización del manitol y mejorar la estabilidad física de la torta liofilizada.

Ejemplo 8. Efectos de las concentraciones de arginina y manitol sobre el comportamiento térmico y el aspecto de las muestras liofilizadas

10 Este ejemplo se realizó para investigar los efectos de la concentración de arginina y la concentración de manitol sobre el comportamiento térmico y el aspecto de la torta usando formulaciones de placebo. Los estudios se centraron en formulaciones de placebo preparadas con un amortiguador tris. Se escogió el amortiguador tris debido a que es el amortiguador usado para preparar la disolución de fármaco a granel, y debido a que no hubo diferencia en la estabilidad química de las muestras preparadas con tris y fosfato de sodio.

Los siguientes estudios examinaron el uso de un intervalo de concentración de arginina de 9,5 mM a 95 mM y un intervalo de concentración de manitol de 2% a 5%.

15 1. Análisis térmico

El objetivo de los experimentos de análisis térmico era determinar las concentraciones de arginina y manitol que estimulaban la cristalización del manitol sin aumentar sustancialmente la concentración de sólidos en la formulación. Las altas concentraciones de sólidos pueden aumentar la resistencia a la transferencia de masa durante la liofilización y crear ciclos de liofilización excesivamente largos.

20 Las concentraciones de arginina se redujeron en la formulación de tris 10 mM, 2% de sacarosa, 2% de manitol, y 0,01% de PS80, mientras se mantenía constante la concentración de manitol. Las formulaciones se recoció a -15°C hasta -25°C durante hasta 5 horas para estimular la cristalización. La cristalización del manitol solo se observó cuando la concentración de arginina se redujo hasta 9,5 mM y la temperatura de recocción fue -22°C o mayor. La cristalización de manitol comenzó al comienzo de la recocción a -22°C (FIG. 15).

25 El inicio de la cristalización para manitol ocurre después de 30 minutos de recocción a -25°C cuando la concentración se incrementa hasta 4% y la concentración de arginina disminuye de 95 mM hasta 47,5 mM (FIG. 16). Se investigaron las temperaturas de recocción más bajas debido a que se observaron cambios en el aspecto de las tortas liofilizadas cuando la recocción se produjo a temperaturas más altas. Los cambios en el aspecto incluyeron la contracción de la torta cuando la recocción se realizó a -15°C.

30 La cristalización de manitol, cuando se usa una concentración de 2% en la formulación, se retrasa o previene cuando la concentración de arginina es mayor que 47,5 mM. La concentración máxima de arginina que se puede incluir en la formulación sin afectar la cristalización del manitol es 47,5 mM. Esta afirmación se confirmó usando experimentos de liofilización que se realizaron con la formulación de placebo con 2% de manitol y arginina 47,5 mM, 71 mM u 85,5 mM. Las muestras preparadas con arginina 47,5 mM fueron farmacéuticamente aceptables, pero las muestras preparadas con más arginina exhibieron colapso. Aumentar la concentración de manitol puede aumentar la probabilidad de cristalización. La recocción de la disolución congelada es necesaria para promover la cristalización al aumentar la concentración de manitol al 4% y al 5% cuando la concentración de arginina fue mayor de 47,5 mM.

35 El manitol cristalizó fácilmente en formulaciones que contenían 5% de manitol y arginina 47,5 mM. Una formulación que contenía tris 10 mM, arginina 47,5 mM, 2% de sacarosa, 5% de manitol, y 0,01% de PS80 se enfrió lentamente hasta -40°C a 1°C/min (FIG. 17). La exotermia de cristalización para manitol se observó durante la etapa de enfriamiento cuando la formulación se enfrió a 1°C/min.

40 Una muestra de la formulación se enfrió rápidamente (se enfrió a más de 10°C/min) hasta -40°C, y después se recoció a -25°C (FIG. 18). El manitol cristalizó después de 23 minutos cuando la disolución se recoció a -25°C. Los experimentos demuestran que el manitol cristalizará fácilmente en la formulación siempre que la concentración de arginina sea inferior a 47,5 mM.

45 Los datos del análisis térmico respaldan que el manitol a una concentración de 4% o mayor cristalizará fácilmente en un plazo razonable durante un procedimiento de liofilización si la concentración de arginina es 47,5 mM o menos.

2. Liofilización

50 Se realizaron estudios de liofilización simultáneamente con experimentos de análisis térmico. Se prepararon disoluciones de placebo con tris 10 mM, arginina de 9,5 mM a 23,75 mM, 2% de sacarosa, y 2% a 4% de manitol, o tris 10 mM con arginina 47,5 mM con o sin 4% de sacarosa. También se incluyó una formulación que contenía tris 10 mM, arginina 47,5 mM, 2% de sacarosa, y 5% de manitol. Las disoluciones se introdujeron en viales de 20 ml usando 3 ml de disolución por vial. Se usó un ciclo de liofilización no convencional conservativo para determinar si se podían producir tortas aceptables. Las muestras se enfriaron hasta -20°C a 1°C/min, se recoció durante 3 horas, se

enfriaron hasta -40°C a 1°C/min, y se mantuvieron durante 2 horas. El vacío se inició a 100 mTorr, y la temperatura de la bandeja se elevó hasta -30°C a 0,5°C/min. Las muestras se mantuvieron a -30°C hasta que el valor del medidor Pirani coincidió con el valor del manómetro de capacitancia (CM), y después se llevaron al secado secundario a 25°C a 0,5°C/min. El secado secundario se completó cuando el valor del medidor Pirani coincidió con el valor de CM. El secado primario se completó después de aproximadamente 30 horas, y el secado secundario requirió solo un par de horas.

Las muestras preparadas con tris y arginina sola exhibieron colapso completo, y las que incluyeron 4% de sacarosa exhibieron contracción de la torta.

Todas las formulaciones que contenían arginina 47,5 mM o menos y 2% a 5% de manitol parecieron tortas aceptables.

Se incluyeron estudios para evaluar el efecto de la recocción durante la rampa de enfriamiento usando un volumen de llenado de 10 ml. Los estudios usaron muestras preparadas con tris 10 mM, 2% de sacarosa, con arginina 23,75 mM y 47,5 mM, y 2% a 5% de manitol. La disolución se enfrió a 1°C/min hasta -25°C, se mantuvo durante 3 horas, el vacío se inició a 100 mTorr, y la temperatura de la bandeja se aumentó hasta -20°C a 0,5°C/min. Las muestras se secaron a -20°C, y la bandeja se calentó hasta 25°C para un secado secundario. Todas las muestras parecían aceptables sin evidencia de colapso.

Se usaron las mismas formulaciones para examinar el efecto de la velocidad de enfriamiento en el aspecto de las tortas liofilizadas. Un conjunto de muestras se enfrió hasta -25°C a 1°C/min y se recoció durante 3 horas. El segundo conjunto de muestras se enfrió hasta -25°C a 5°C/min y se recoció durante 3 horas. Los conjuntos de muestras se combinaron en un solo secador y se liofilizaron a -30°C para el secado primario, seguido de 25°C para el secado secundario.

Todas las muestras parecían aceptables sin evidencia de colapso. Los datos respaldan que las velocidades de enfriamiento entre 1°C/min y 5°C/min no afectan el aspecto de las muestras.

Los estudios de solubilidad realizados por el cliente respaldaron que la proteína permanecería soluble en la disolución si la concentración de arginina fuera 36 mM o mayor en el intervalo de pH de 7,5 a 8,2. Se decidió usar una disolución que contenía arginina 45 mM debido a que aseguraría la solubilidad completa de la proteína y al mismo tiempo estaría muy por debajo de la concentración que evitaría la cristalización del manitol. La concentración de manitol se escogió como 5% para asegurar que cristalizara fácilmente durante el ciclo. Por lo tanto, el mejor candidato para la formulación fue tris 10 mM, 10 mg/ml o 25 mg/ml de antídoto r, arginina 45 mM, 2% de sacarosa, 5% de manitol, con 0,01% de PS80 preparado a pH 7,8.

Los estudios de liofilización completados con disoluciones de placebo demostraron que se podían producir tortas aceptables cuando la concentración de arginina era 47,5 mM o menos con 2% de manitol o más. Las disoluciones se liofilizaron usando una temperatura de bandeja tan alta como -20°C sin evidencia de colapso. Las muestras se recoció a -20°C durante 3 horas durante la etapa de enfriamiento o después de la etapa de congelación a -40°C sin ningún efecto en el aspecto de las tortas. El enfoque conservativo y convencional es congelar primero las muestras a -40°C seguido de una etapa de recocción con secado primario. Este enfoque se escogió para el ciclo de liofilización. El secado primario se realizó después de la etapa de recocción a -20°C seguido de un aumento de la temperatura de la bandeja a 0,5°C/min hasta 25°C para el secado secundario. Los posteriores estudios de desarrollo de liofilización se centraron en la temperatura de la bandeja y duración del secado secundario apropiadas.

Los objetivos para el desarrollo de la formulación liofilizada incluyeron (1) concentración de proteína de al menos 10 mg/ml; (2) estabilidad mejorada a 2-8°C; (3) tiempo de reconstitución de ≤ 5 min; y (4) procedimiento robusto de liofilización.

Se realizaron varias rondas de cribado de formulación para evaluar el efecto de las variables individuales sobre la estabilidad de la proteína (tanto en forma de torta liofilizada como en disolución) y la solubilidad a 5°C. Se usó un ciclo de liofilización conservativo durante el cribado de la formulación. El desarrollo del procedimiento de liofilización se realizó en paralelo.

Los ensayos demostraron que, en términos de concentración de proteína, las disoluciones de mayor concentración (por ejemplo, 25 mg/ml) eran menos estables que las más bajas (por ejemplo, 10 mg/ml) después de 2 días a temperatura ambiente (es decir, un mayor aumento en los agregados totales por SEC y en % de pico beta mediante RP-HPLC). Se confirmó que el pH óptimo para la estabilidad del antídoto r (producto liofilizado y en disolución) era pH $7,80 \pm 0,3$.

No se observaron diferencias significativas en la estabilidad entre el amortiguador de tris y de fosfato en presencia de otros componentes estabilizantes (es decir, sacarosa y arginina).

En términos de tipo de estabilizador y concentración, tanto el 2% como el 4% p/p de sacarosa proporcionaron un buen efecto estabilizador. Se requiere una concentración de arginina de ≥ 36 mM para mantener la solubilidad del antídoto r a ≥ 50 mg/ml a 5°C, pH $7,80 \pm 0,3$.

Un componente cristalino (agente de carga), manitol, a una concentración de $\geq 4\%$ p/p (en presencia de tris 10 mM, 2% p/p de sacarosa, arginina 45 mM) fue importante para evitar el colapso de la torta durante el secado primario. Además, la presencia de una pequeña cantidad de polisorbato 80 es crítica para asegurar la estabilidad del antídoto r en disolución bajo condiciones de cizallamiento (agitación a temperatura ambiente).

- 5 La composición que se muestra a continuación ejemplifica una disolución adecuada para la liofilización.

Tabla 8.3 Composición de antídoto r para inyección 50 mg/vial ²

Ingredientes	Función	Cantidad por unidad	Concentración después de la reconstitución
Antídoto r	Ingrediente activo	50 mg	10 mg/ml
Tris (Trometamina)	Amortiguador	6,1 mg	10 mM
Sacarosa	Estabilizador	100 mg	2%
Manitol	Agente de carga	250 mg	5%
Hidrocloruro de L-arginina	Estabilizador	47,4 mg	45 mM
Ácido clorhídrico	Para ajustar el pH	c.s. hasta pH 7,80 \pm 0,1	
Polisorbato 80	Tensioactivo y estabilizador	0,5 mg	0,01% p/v
Agua para inyección ¹	Vehículo	c.s. hasta 5 ml 1	
pH			7,8

¹ Eliminada durante la liofilización.

² A reconstituir con 4,70 ml de agua estéril para inyección (SWFI).

- 10 La formulación liofilizada mejora la estabilidad del producto farmacéutica de antídoto r, y puede almacenarse a 2-8°C. La siguiente tabla compara las composiciones del producto farmacéutico líquido congelado y el producto farmacéutico liofilizado reconstituido. Se presentan ejemplos de la composición de un producto farmacéutico liofilizado de 100 mg/vial y 400 mg/vial y ejemplos de composiciones reconstituídas.

Tabla 8.4 Formulación del producto farmacéutico líquido congelado de antídoto r, para inyección, 3 mg/ml

Ingredientes	Cantidad por vial	Cantidad (mg/ml)
Antídoto r	30 mg	3 mg/ml
Tris	12,1 mg	1,21 mg/ml (10 mM)
Hidrocloruro de L-arginina	200 mg	20,0 mg/ml (95 mM)
Sacarosa	400 mg	40,0 mg/ml (4% p/p)
Polisorbato 80	1,0 mg	0,1 mg/ml (0,01% p/p)
Agua para inyección	c.s. hasta 10 g	
Disolución de ácido clorhídrico, 1N	c.s. hasta pH = 7,8	
Disolución de hidróxido de sodio, 1N	c.s. hasta pH = 7,8	
pH	7,8 \pm 0,3	7,8 \pm 0,3

ES 2 814 157 T3

Tabla 8.5 Formulación del producto farmacéutico liofilizado de antídoto r, para inyección, 50 mg/vial

Ingredientes	Cantidad por vial	Cantidad (mg/ml) después de reconstitución
Antídoto r	50 mg	10 mg/ml
Tris	6,1 mg	1,22 mg/ml (10 mM)
Hidrocloruro de L-arginina	47,4 mg	9,48 mg/ml (45 mM)
Sacarosa	100 mg	20 mg/ml (2% p/p)
Manitol	250 mg	50 mg/ml (5% p/p)
Polisorbato 80	0,5 mg	0,1 mg/ml (0,01% p/p)
Agua estéril para inyección	c.s. hasta 5 ml, eliminada durante el procedimiento de liofilización	
Ácido clorhídrico	c.s. hasta pH = 7,8	
pH	7,8 ± 0,3	7,8 ± 0,3

Tabla 8.6 Formulación del producto farmacéutico liofilizado de antídoto r, para inyección, 100 mg/vial

Ingredientes	Cantidad por vial	Cantidad (mg/ml) después de reconstitución
Antídoto r	100 mg	10 mg/ml
Tris	12,1 mg	1,22 mg/ml (10 mM)
Hidrocloruro de L-arginina	94,8 mg	9,48 mg/ml (45 mM)
Sacarosa	200 mg	20 mg/ml (2% p/v)
Manitol	500 mg	50 mg/ml (5% p/v)
Polisorbato 80	1,0 mg	0,1 mg/ml (0,01% p/v)
Agua estéril para inyección	c.s. hasta 10 ml, eliminada durante el procedimiento de liofilización	
Ácido clorhídrico	c.s. hasta pH = 7,8	
pH	7,8 ± 0,3	7,8 ± 0,3

Tabla 8.7 Formulación del producto farmacéutico liofilizado de antídoto r, para inyección, 400 mg/vial

Ingredientes	Cantidad por vial	Cantidad (mg/ml) después de reconstitución (40 ml total)
Antídoto r	400 mg	10 mg/ml
Tris	12,1 mg	0,30 mg/ml (2,5 mM)
Tris HCl	15,8 mg	0,39 mg/ml (2,5 mM)
Hidrocloruro de L-arginina	189,6 mg	4,7 mg/ml (22,5 mM)
Sacarosa	400 mg	10 mg/ml (1% p/v)

Ingredientes	Cantidad por vial	Cantidad (mg/ml) después de reconstitución (40 ml total)
Manitol	1000 mg	25 mg/ml (2,5% p/v)
Polisorbato 80	2,0 mg	0,1 mg/ml (0,01% p/v)
Agua estéril para inyección	c.s. hasta 20 ml, eliminada durante el procedimiento de liofilización	
pH	7,8 ± 0,3	7,8 ± 0,3

5 La microscopía de liofilización se realizó en dos formulaciones diferentes. Se dispensaron aproximadamente 0,15 ml de disolución en una celda de vidrio que se colocó en una etapa de liofilización a temperatura controlada. Se colocaron termopares en el fondo y el centro de la celda para monitorizar las temperaturas de la muestra. El líquido se enfrió a una velocidad de 0,5°C/min hasta -50°C, se recoció a -20°C durante 1 hora, y se volvió a congelar hasta -50°C. La cámara se vació y se calentó a una velocidad de 0,5°C/min. En base a esta temperatura de colapso, las combinaciones de temperaturas de liofilización y presiones que dan como resultado temperaturas del producto por debajo de la temperatura de colapso producirán una torta sin colapso. Por ejemplo, se podrían usar temperaturas de producto de hasta 20°C con 100 mTorr para producir una torta sin colapso.

Formulación	Temperatura de colapso (°C)
Antídoto r 10 mg/ml, Tris 10 mM, L-Arginina HCl 45 mM, 2% p/v de sacarosa, 5% p/v de manitol, 0,01% de polisorbato 80, pH 7,8	-15
Antídoto r 20 mg/ml, Tris 10 mM, L-Arginina HCl 45 mM, 2% p/v de sacarosa, 5% p/v de manitol, 0,01% de polisorbato 80, pH 7,8	-14

10 Después de la reconstitución, el antídoto r para inyección con SWFI, 50 mg/vial, tiene un pH de 7,8, con una osmolalidad de ~ 480 mOsm/kg. Por lo tanto, el DP reconstituido es aceptable para la administración intravenosa.

15 El antídoto r BDS se formula a 3,0 mg/ml en Tris 10 mM, pH 7,8 ± 0,3, 4% de sacarosa, arginina 95 mM, y se almacena congelado a -60°C o más frío. La fabricación de antídoto r para inyección consiste en la descongelación y reunión del antídoto r BDS 3 mg/ml, ultrafiltración/diafiltración contra el amortiguador de formulación (tris 10 mM, 2% de sacarosa, 5% de manitol, 45 ml de arginina HCl, pH 7,8) hasta una concentración final de 10 mg/ml, la adición de polisorbato 80 hasta 0,01% p/p, llenado aséptico, liofilización, taponado, tapado y etiquetado en el sistema de cierre del contenedor de antídoto r para inyección.

20 El procedimiento de fabricación de antídoto r para inyección usa procedimientos que se desarrollaron para la producción de otros productos farmacéuticos líquidos estériles. El método de esterilización usado para producir antídoto r para inyección es una filtración de 0,2 µm. El antídoto r es lábil al calor; por lo tanto, la filtración de 0,2 µm es el medio más apropiado para producir antídoto r estéril para inyección.

25 El procedimiento de liofilización se desarrolló usando un enfoque racional basado en la comprensión de la naturaleza física de los componentes de la formulación en diferentes etapas del ciclo de liofilización. Se usaron métodos de caracterización térmica que incluyen calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía de liofilización (FDM) para medir Tg' (temperatura de transición vítrea del concentrado congelado) y Tc (temperatura de colapso durante el secado primario). El ciclo que se muestra en la tabla a continuación se seleccionó para la liofilización del lote prototipo J7128. La etapa de recocción permite la cristalización del manitol para asegurar que la temperatura del producto no caiga por debajo de la temperatura de colapso durante el secado primario. La temperatura de secado primario se seleccionó para evitar el colapso de la torta con una duración razonable de secado primario. La condición de secado secundario de 2 etapas se desarrolló para producir un DP liofilizado con un nivel de humedad de <1% (véase, por ejemplo, la Tabla 6).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación acuosa, que comprende de 10 mM a 55 mM de arginina, de 1% a 3% de sacarosa (p/v), de 2% a 8% de manitol (p/v), y al menos 5 mg/ml de un polipéptido bicatenario que comprende una primera cadena que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4, una segunda cadena que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 5, y un enlace de disulfuro entre un primer resto de cisteína en la posición 98 (Cys98) de SEQ ID NO. 4 y un segundo resto de cisteína en la posición 108 (Cys108) de SEQ ID NO. 5, en la que la formulación tiene un pH de 7,5 a 8.
2. La formulación acuosa de la reivindicación 1, que comprende al menos 10 mg/ml del polipéptido bicatenario, de 40 mM a 50 mM de arginina, de 1,5% a 2,5% de sacarosa (p/v), y de 4,5% a 5,5% de manitol (p/v).
- 10 3. La formulación acuosa de la reivindicación 2, que comprende al menos 18 mg/ml del polipéptido bicatenario.
4. La formulación acuosa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el polipéptido bicatenario comprende un resto de aminoácido que se modifica para ser diferente de los aminoácidos naturales.
5. La formulación acuosa de la reivindicación 4, en la que la modificación es el resto Asp29 de la primera cadena modificado a (3R)-3-hidroxiAsp en Asp29.
- 15 6. La formulación acuosa de la reivindicación 1, que comprende alrededor de 45 mM de arginina, alrededor de 2% de sacarosa (p/v), alrededor de 5% de manitol (p/v), y alrededor de 10 mg/ml o 20 mg/ml del polipéptido bicatenario, en la que la formulación tiene un pH de aproximadamente 7,8.
7. Un método para preparar una formulación liofilizada, que comprende liofilizar la formulación acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 20 8. Una composición liofilizada:
- (i) obtenible liofilizando la formulación acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7; o
- (ii) que comprende al menos 10% (p/p) de un polipéptido bicatenario que comprende una primera cadena de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4, una segunda cadena de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 5, y un enlace de disulfuro entre un primer resto de cisteína en la posición 98 (Cys98) de SEQ ID NO. 4 y un segundo resto de cisteína en la posición 108 (Cys108) de SEQ ID NO. 5, y L-arginina HCl:sacarosa:manitol en una relación en peso del intervalo (0,5-1,4):(1-3):(2-8).
- 25 9. La composición liofilizada de la reivindicación 8(ii):
- (i) que comprende al menos 18% (p/p) del polipéptido bicatenario;
- (ii) en la que la relación en peso de L-arginina HCl:sacarosa:manitol está en el intervalo de (0,9-1):(1,5-2,5):(4,5-5,5); o
- 30 (iii) en la que L-arginina HCl:sacarosa:manitol tiene una relación en peso de alrededor de 0,95:2:5.
10. Una composición liofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, para uso en un método para reducir la hemorragia en un sujeto sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa, que comprende administrar al sujeto una disolución preparada disolviendo la composición liofilizada en un disolvente acuoso.
- 35 11. La composición liofilizada para uso de la reivindicación 10, en la que el inhibidor del factor Xa es apixaban, rivaroxaban o betrixaban.
12. Una formulación acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para uso en un método para reducir la hemorragia en un sujeto sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la formulación.
- 40 13. La formulación acuosa para uso de la reivindicación 12, en la que el inhibidor del factor Xa es apixaban, rivaroxaban o betrixaban.

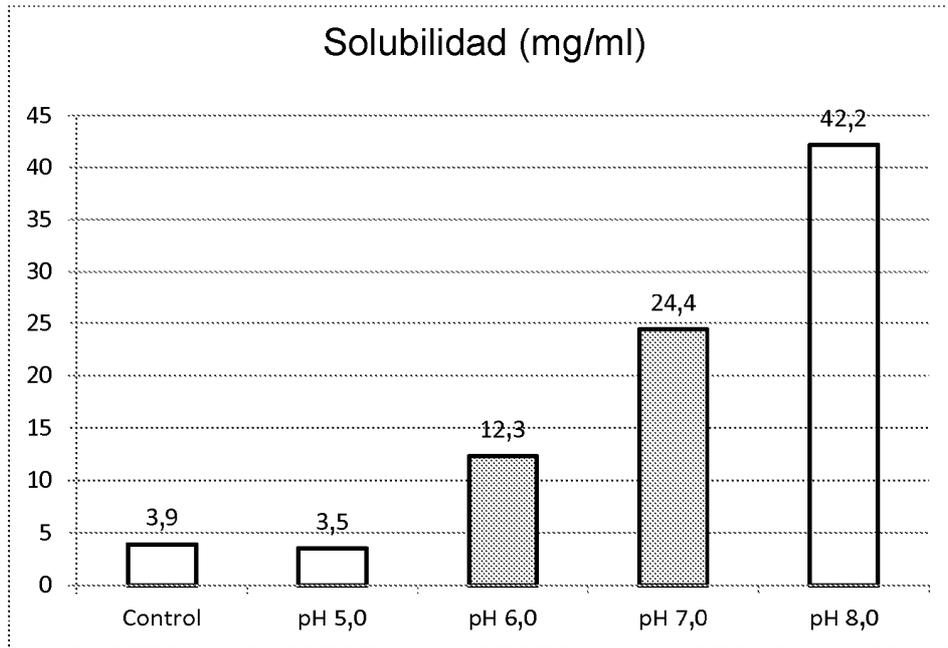


FIG. 1A

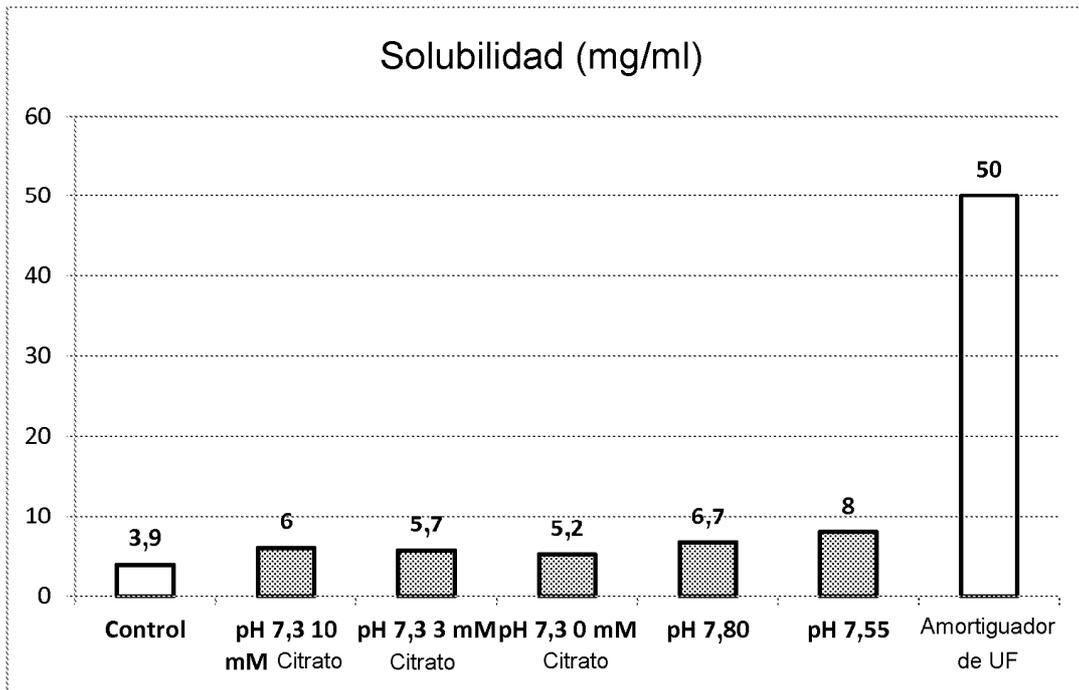


FIG. 1B

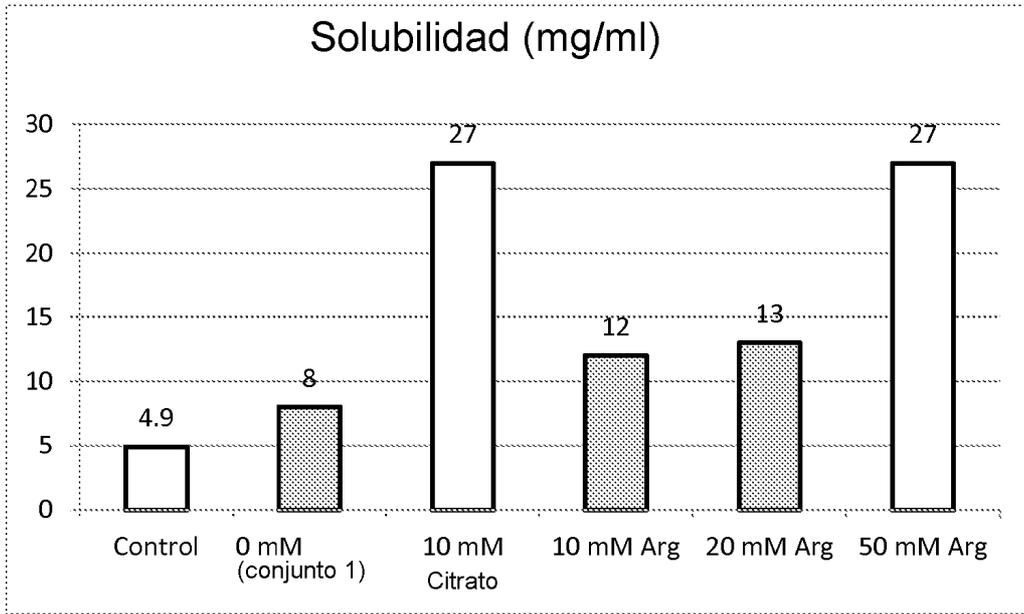


FIG. 1C

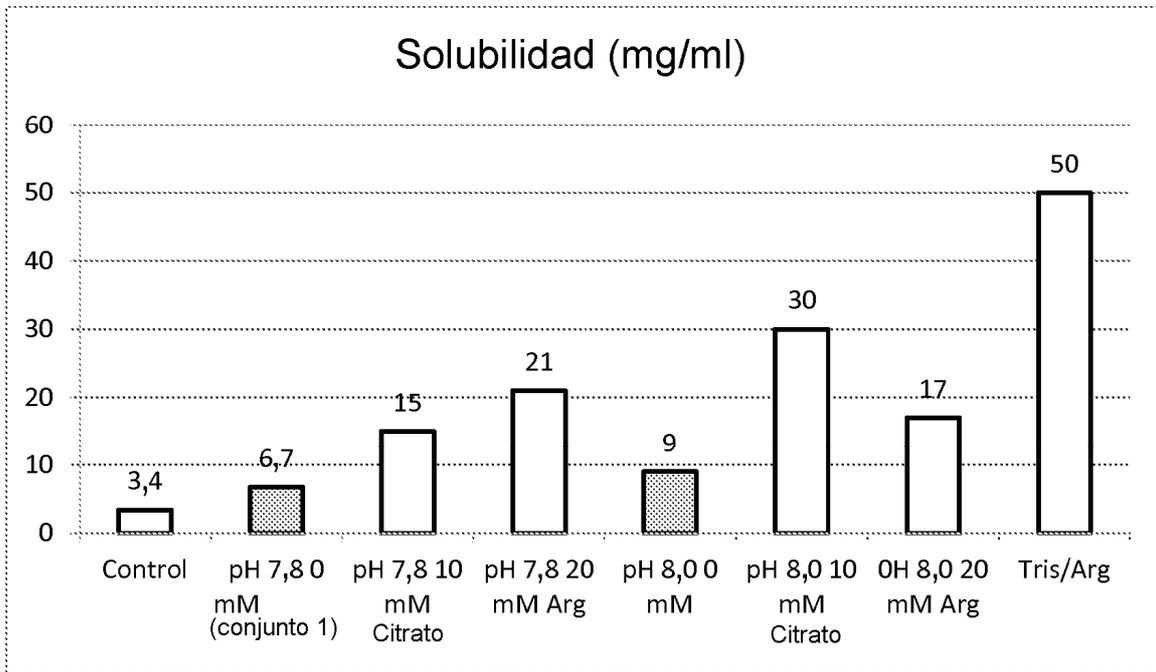


FIG. 1D

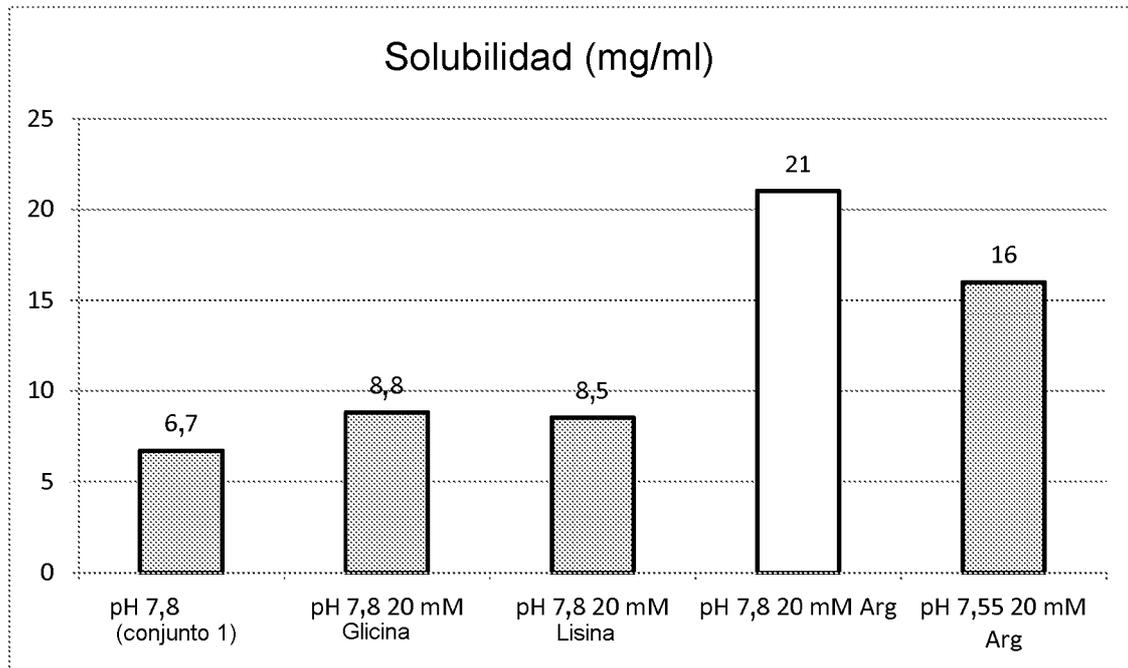


FIG. 1E

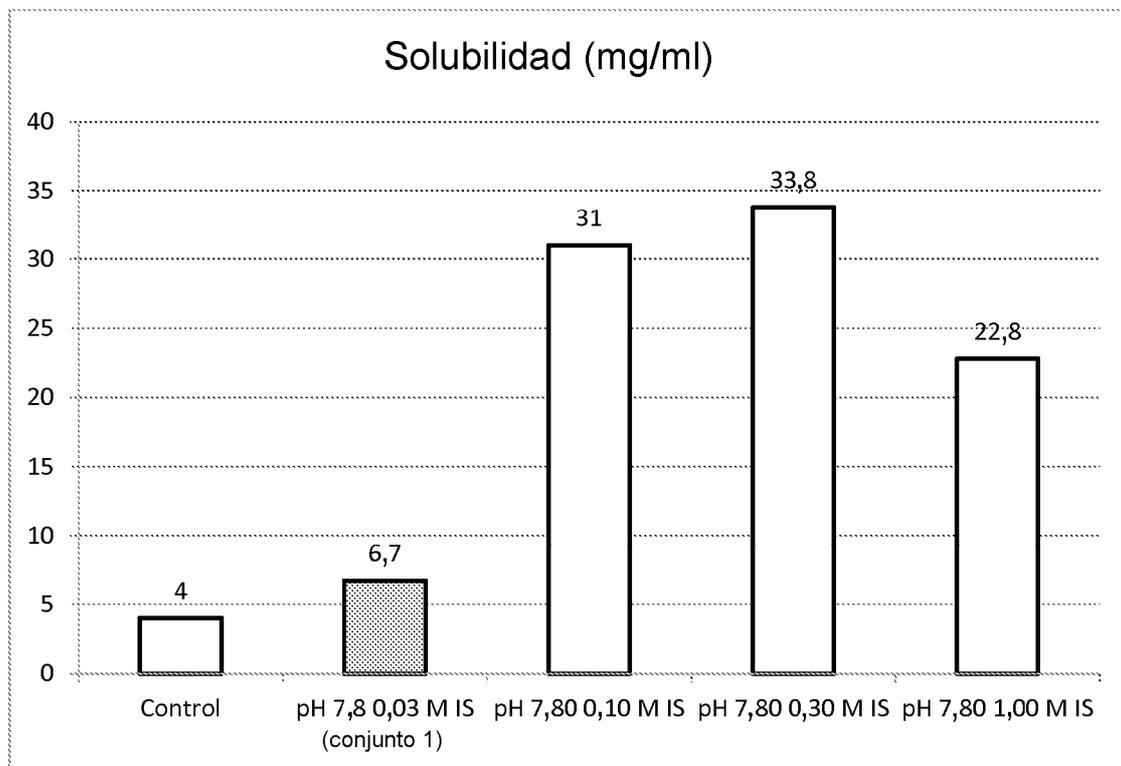


FIG. 1F

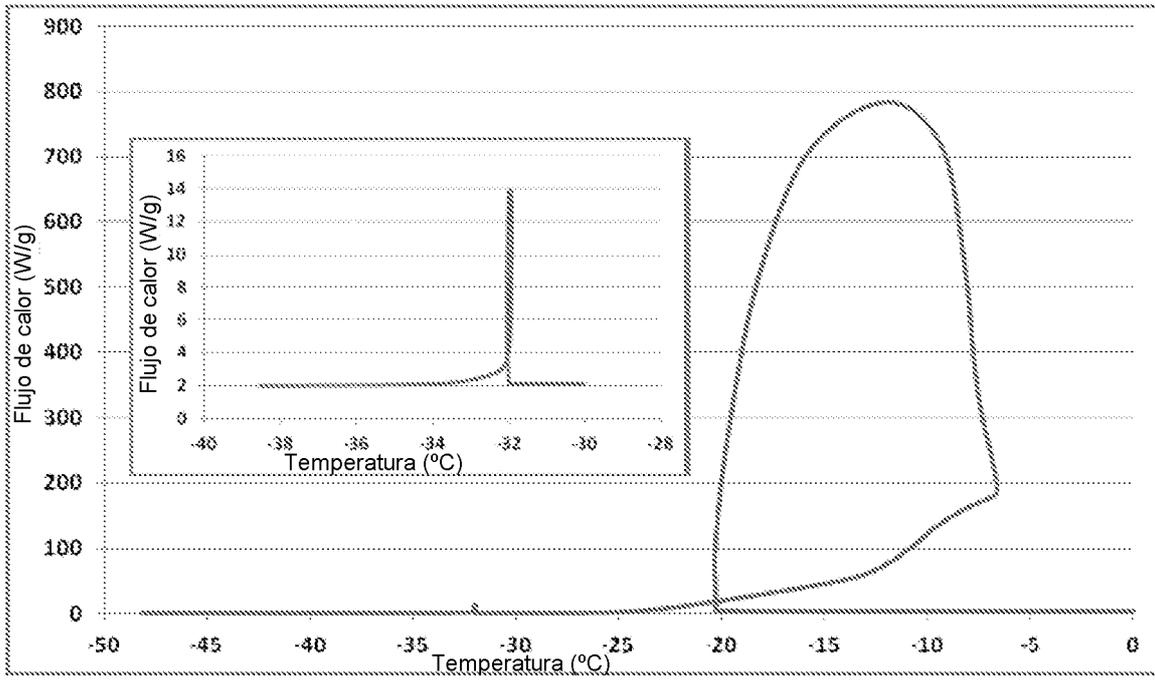


FIG. 2

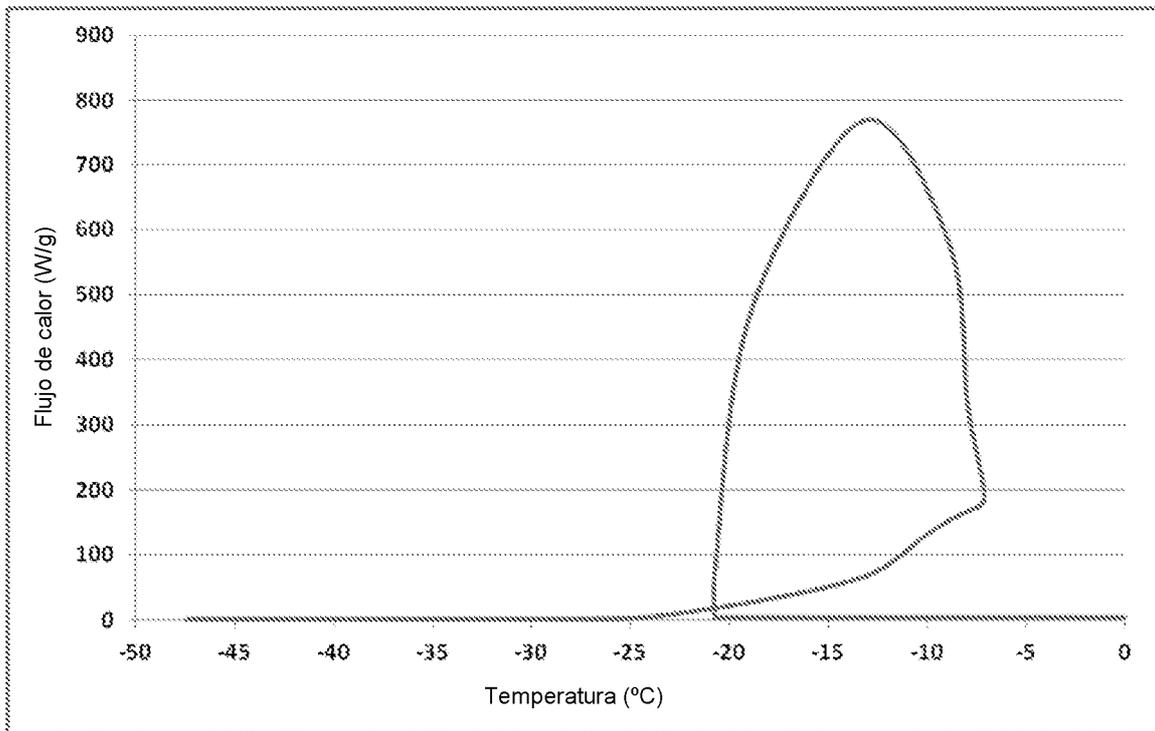


FIG. 3

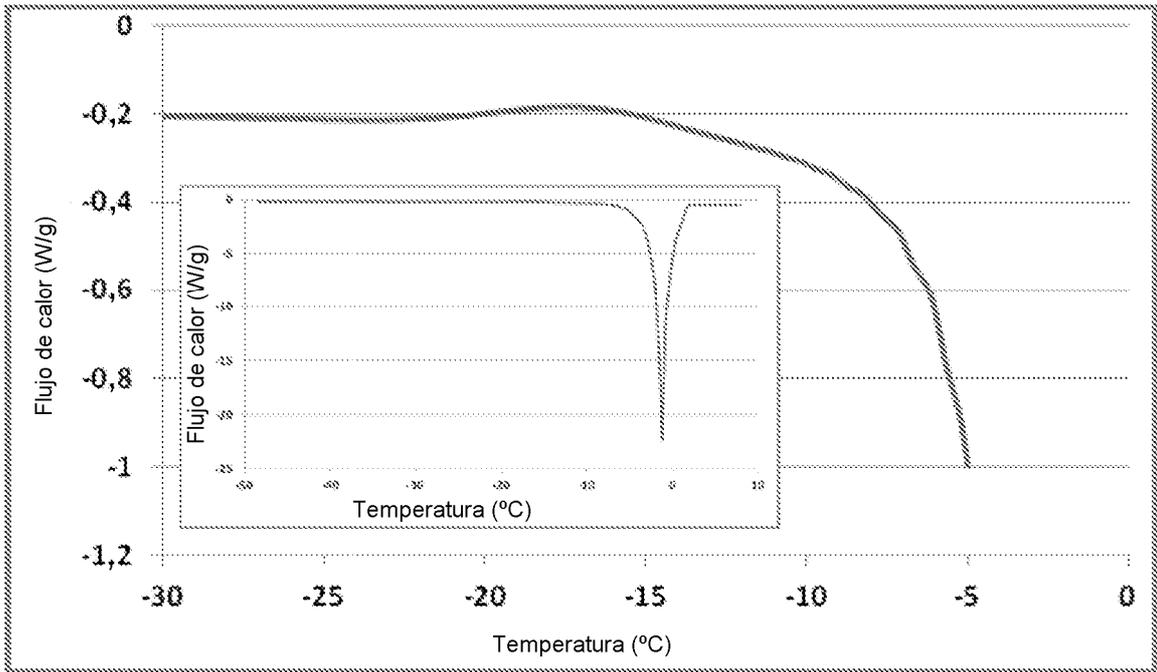


FIG. 4

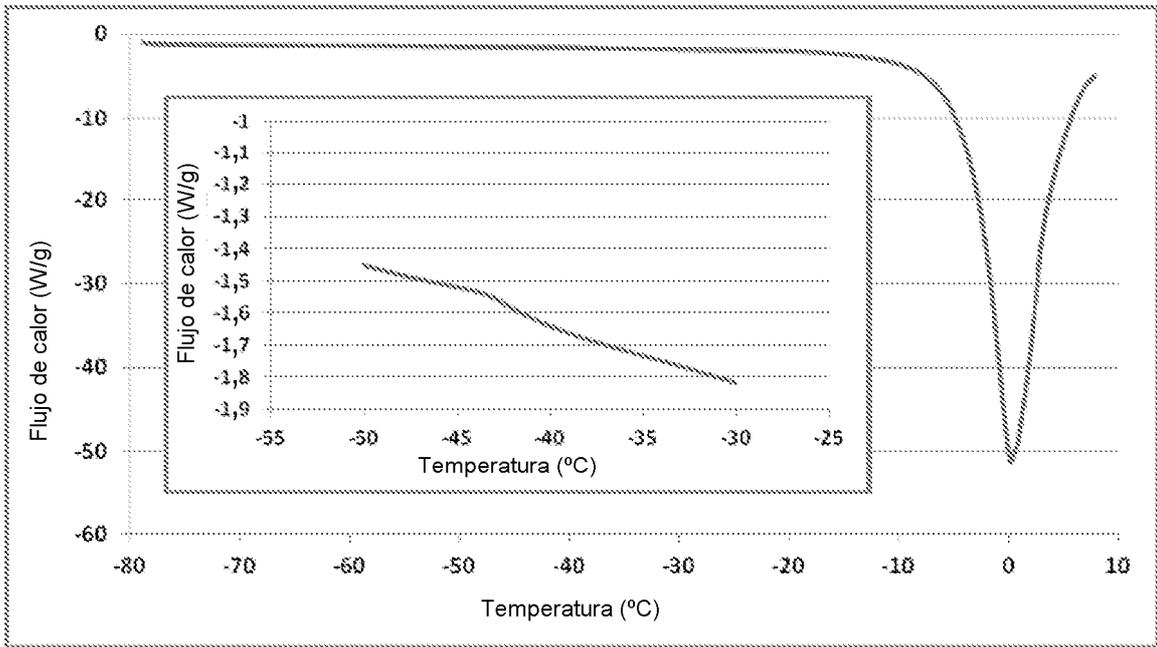


FIG. 5

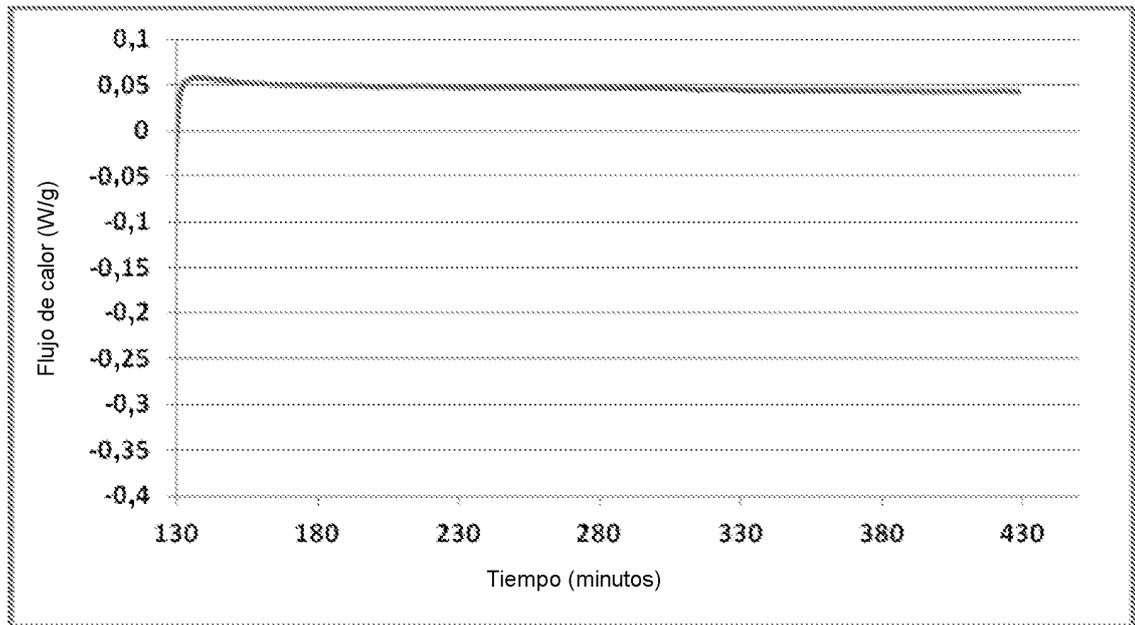


FIG. 6

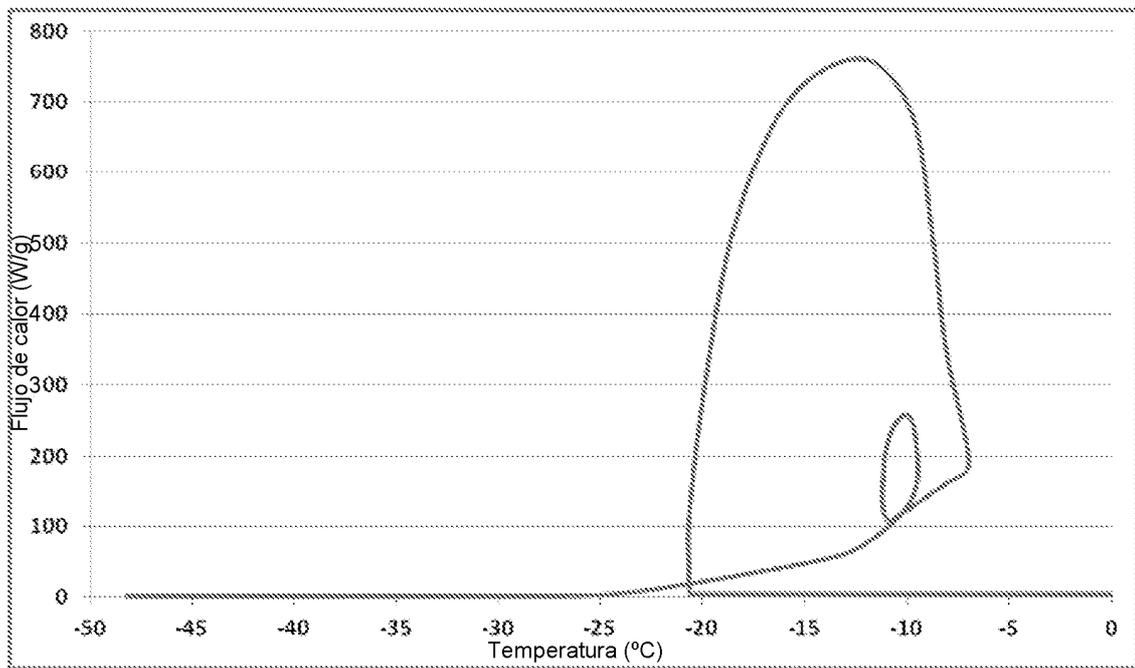


FIG. 7

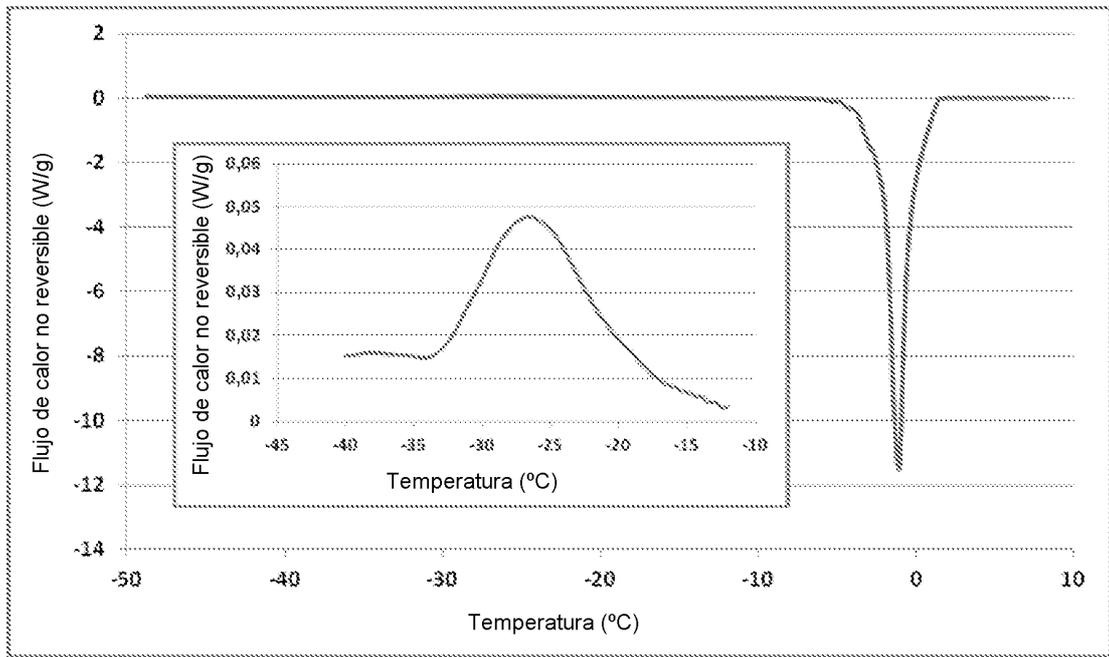


FIG. 8

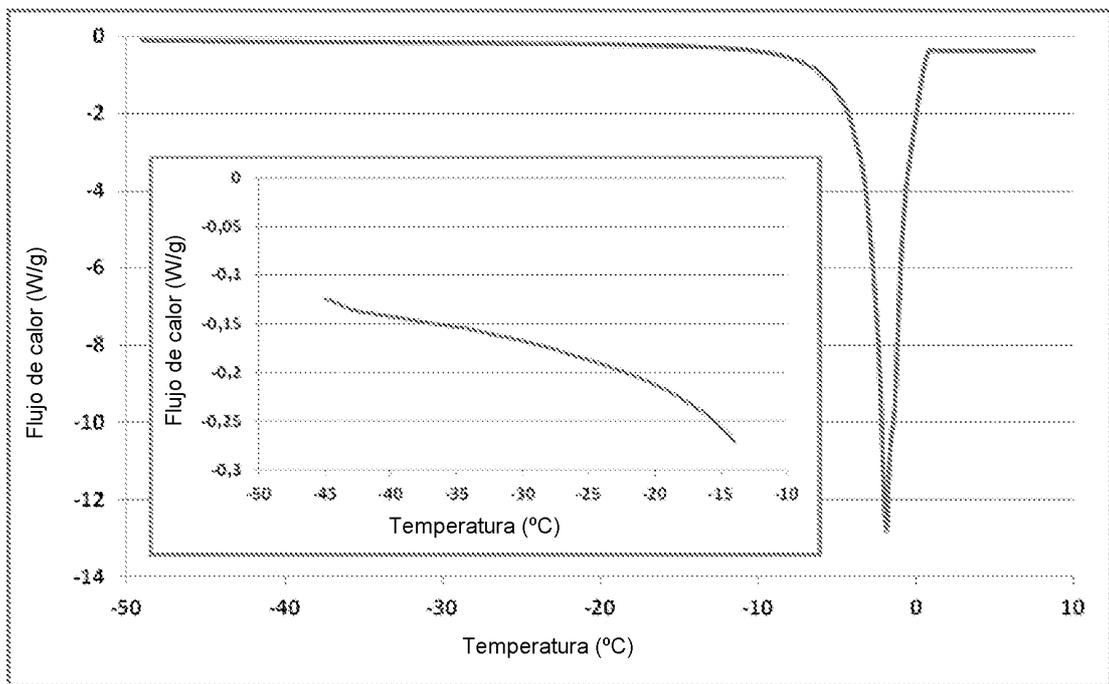


FIG. 9

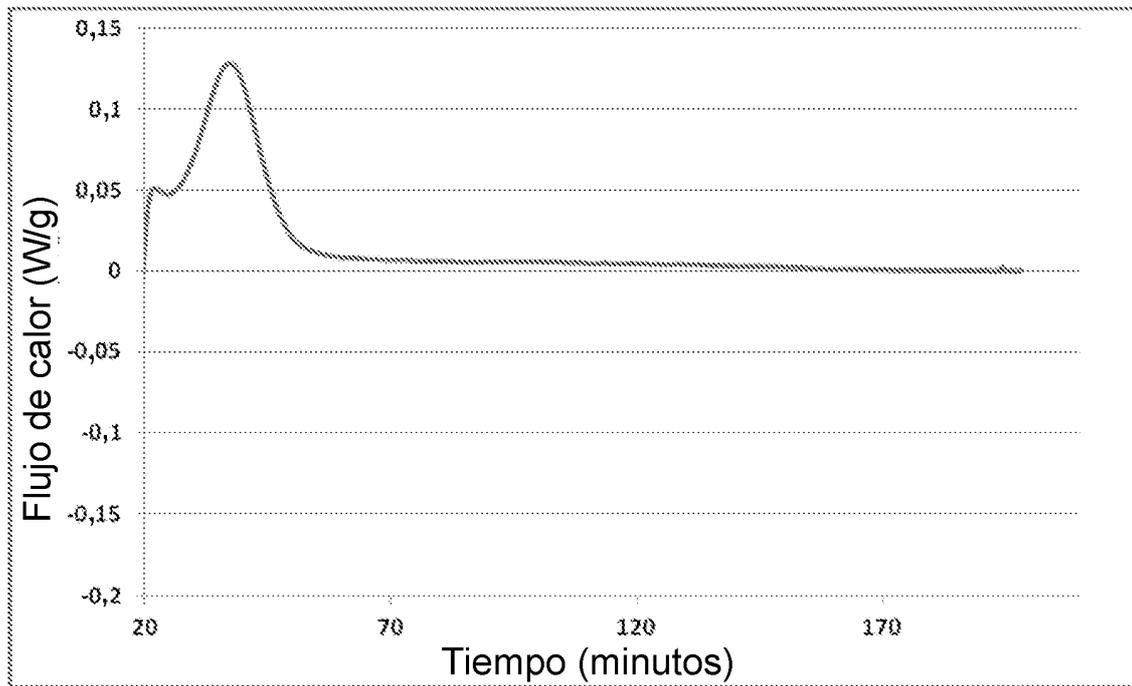


FIG. 10

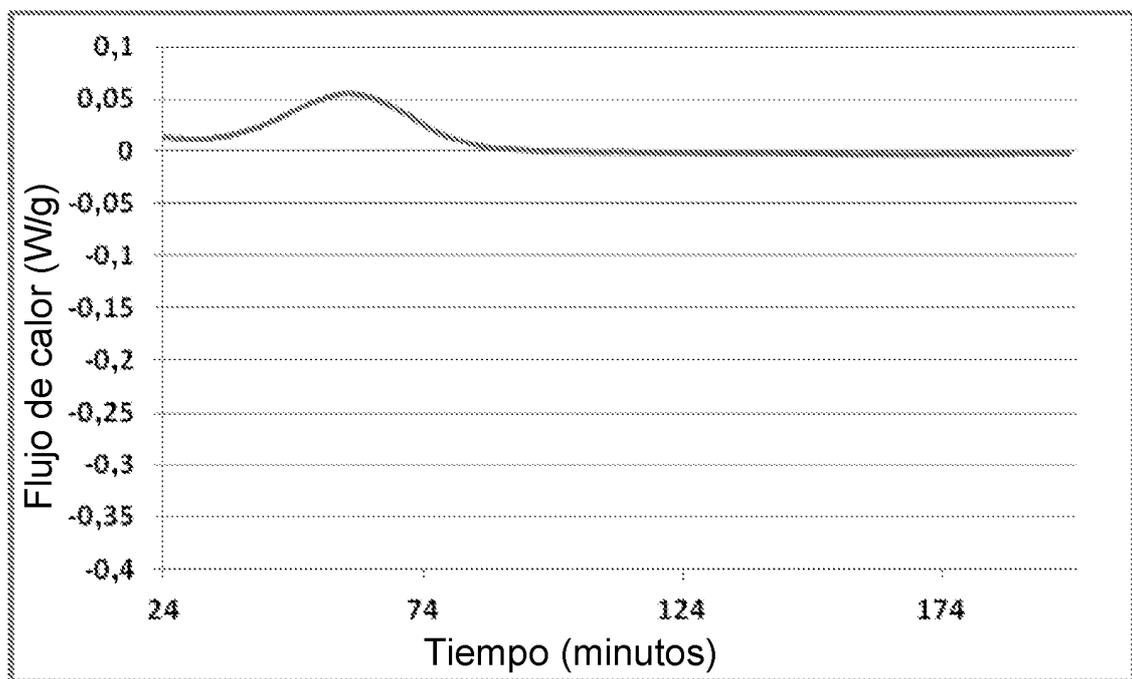


FIG. 11

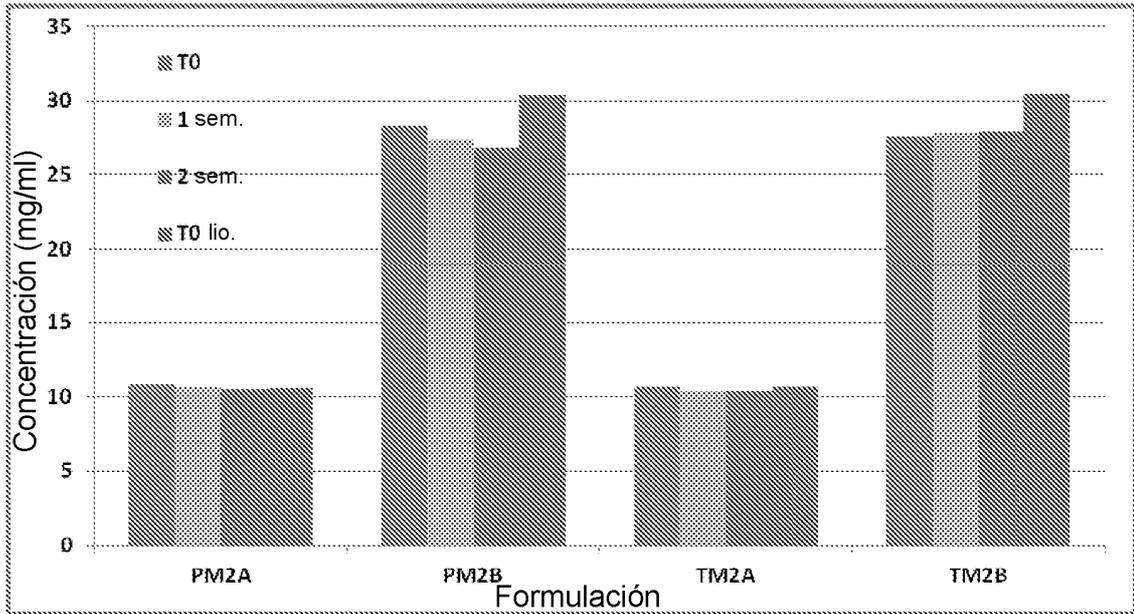


FIG. 12

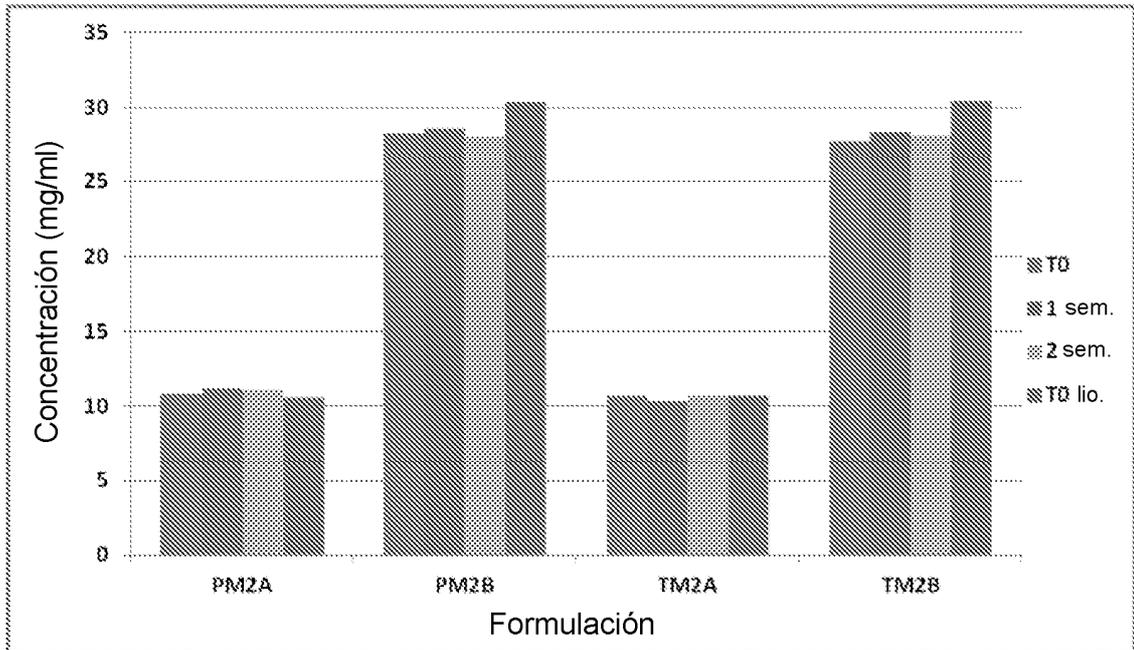


FIG. 13

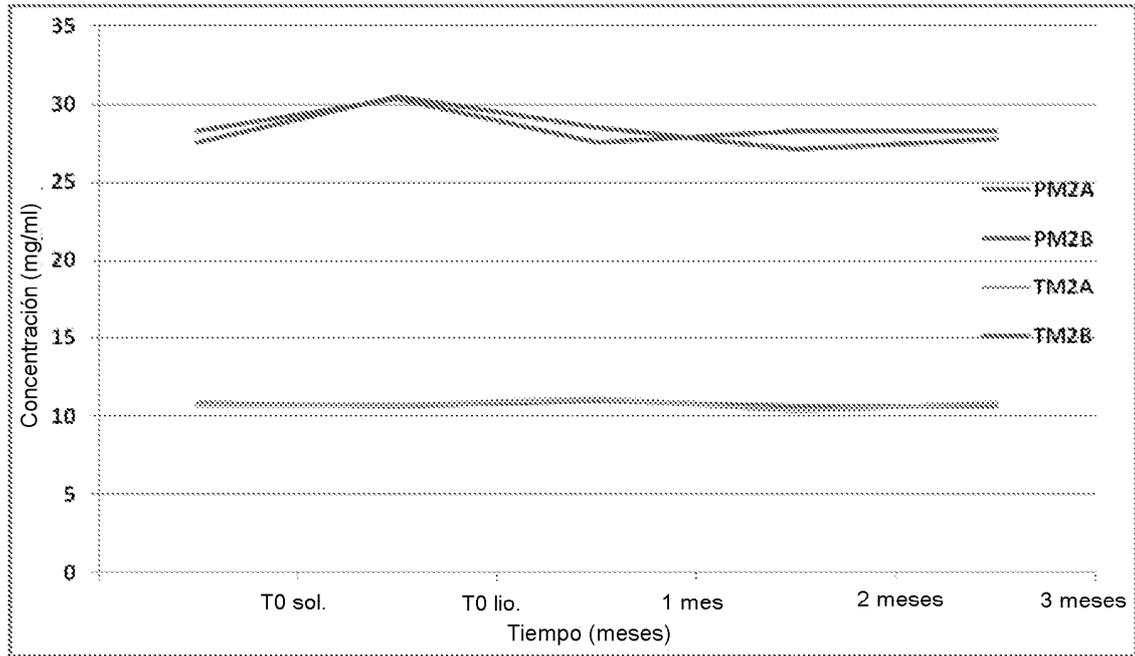


FIG. 14

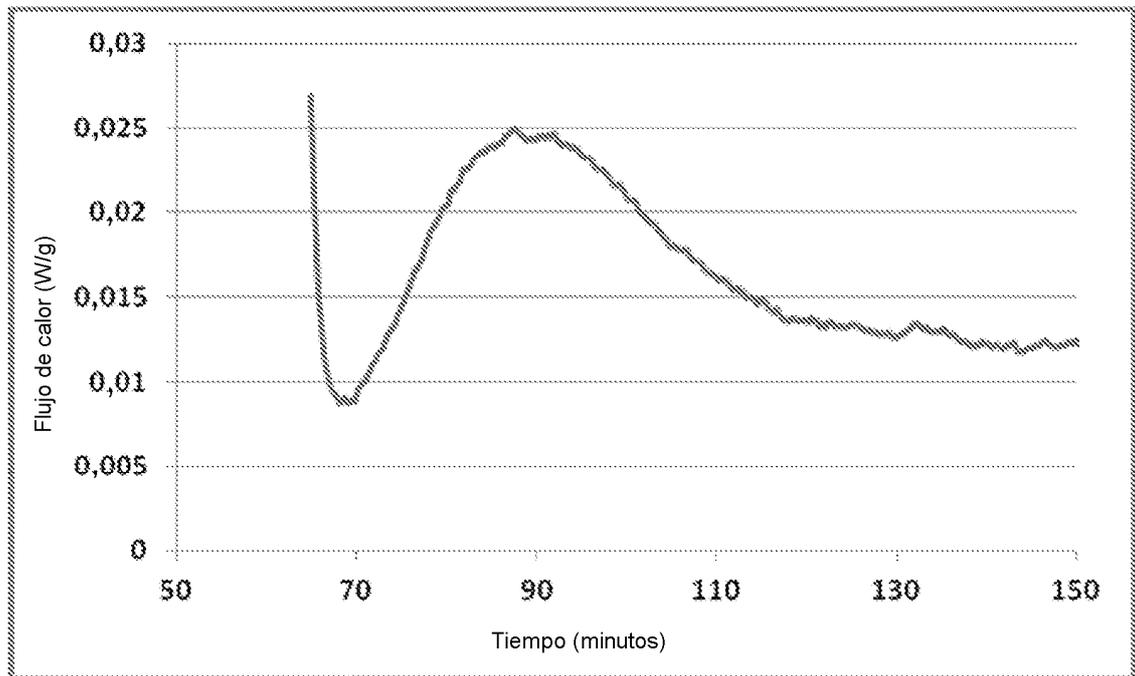


FIG. 15

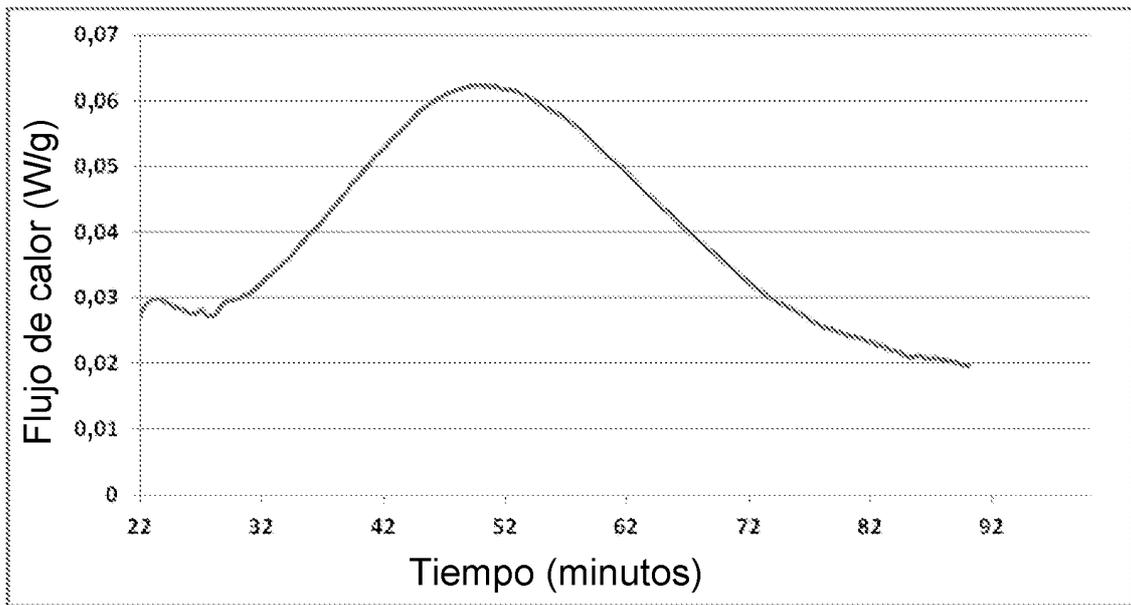


FIG. 16

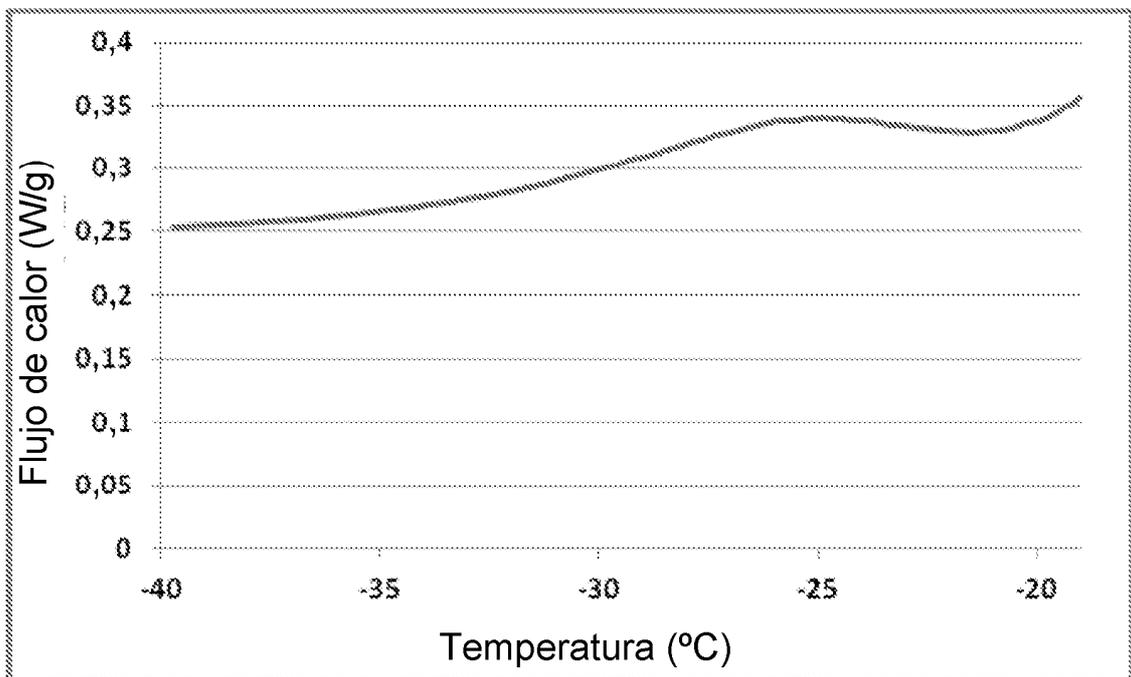


FIG. 17

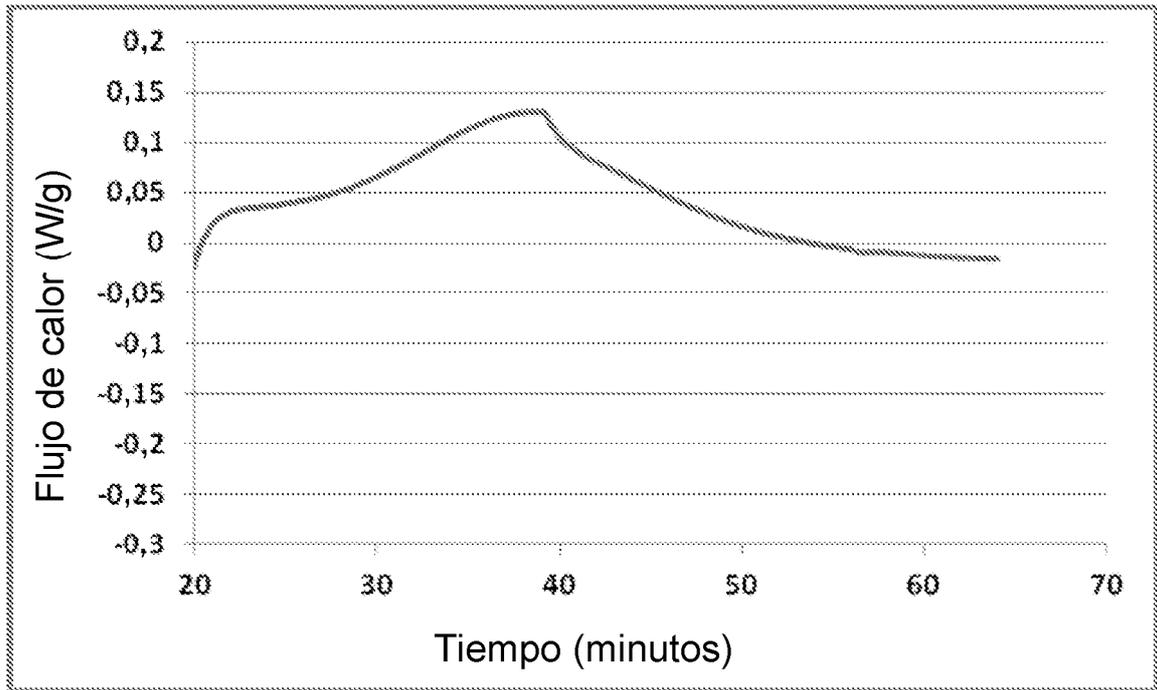


FIG. 18