

04

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08-55550

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "SOLUCIÓN DE CLORURO DE SODIO PARA
RECONSTITUCIÓN O DILUCIÓN DE FÁRMACO"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A 61 k 47/18 / 47/76 / 9/08

71. SOLICITANTE WYETH

DOMICILIO NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO ALVARO CORREA OROZUELA.
T.P. 20.281

22. BOGOTÁ, D. C., Mayo 30, 2008

2008/000212

CS

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-055550-00000-0000

Fecha: 2008-05-30 16:53:25 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eva- 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 146

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE : ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: WYETH Dirección: Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos de América Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América Teléfono: Fax: E-Mail:		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6 Teléfono: 634 1500 Fax: 376 2211 E-Mail: office.bogota@bakemet.com		IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 79.143.366 de Usaquén TP 20.281
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: WEBB, Chandra, A. y ZERFAS, Julie Dirección: 313 Cape Hill Road, Pelham, NH 03076, Estados Unidos de América y 3 Stewart Road, Reading, MA 01867, Estados Unidos de América, respectivamente Nacionalidad o Domicilio: Estadounidenses		
5 PCT (85) Solicitud Internacional No. PCT/US2006/042258 Fecha 27-OCT-06 Publicación Internacional No. WO/2007/053533 Fecha 10-MAY-07			
6 Título (54) SOLUCION DE CLORURO DE SODIO PARA RECONSTITUCION O DILUCION DE FARMACO			
7 Clasificación Internacional (51) A61K 9/08, A61K 38/48, A61K 47/02, A61K 47/18, A61K 47/26			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) Pais de Origen US	(32) Fecha 01-NOV-05	(31) Número de Solicitud 60/732,221
9 Comprobante de pago No. 08-23087 Fecha 17-MAR-08			

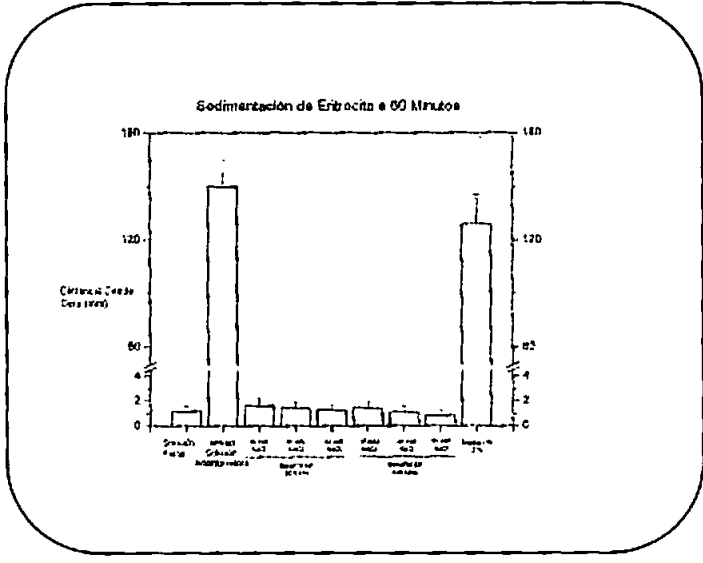
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos, Reporte de búsqueda y opinión escrita y notificación de presentación de documento de prioridad.

11

FIGURA CARATERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDONEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20/281

Instrucciones para la presentación de los anexos ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-055550- -00000-0000

NIT : 000174089-2

Fecha: 2008-05-30 18:53:25 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE(YII) Eje: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 146

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 23.007
FECHA : MARZO 17 DE 2008

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754207	116634	14/03/2008	52.393.300.00

CONCEPTO

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501.000.00
TOTAL :			\$ 501.000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

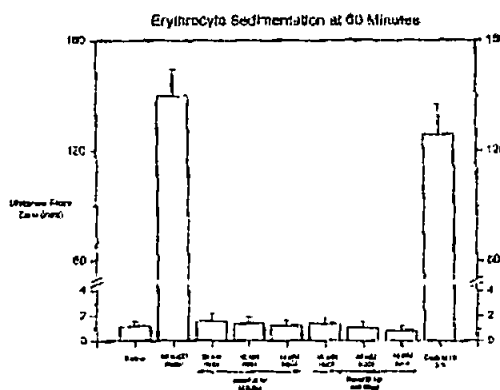
1. The first step in the process is to identify the problem or issue that needs to be addressed. This involves gathering information and understanding the context of the problem.

(10) International Publication Number
WO 2007/053533 A2

kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GH, GI, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available):** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 2007/053533 A2

SODIUM CHLORIDE SOLUTION FOR DRUG RECONSTITUTION OR DILUTION

[0001] This application claims priority to U.S. Serial No. 60/732,221, filed November 1, 2005, which is hereby incorporated by reference in its entirety.

[0002] All patents, patent applications and publications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety. The disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by reference into this application in order to more fully describe the state of the art as known to those skilled therein as of the date of the invention described and claimed herein.

[0003] A portion of the disclosure of this patent document contains material that is subject to copyright protection. The copyright owner has no objection to the facsimile reproduction by anyone of the patent document or the patent disclosure, as it appears in the Patent and Trademark Office patent file or records, but otherwise reserves all copyright rights whatsoever.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0004] When whole blood is mixed with a drug solution, such as in the intravenous (IV) line during administration of an IV injectable drug, rouleaux or erythrocyte aggregation (also called red blood cell agglutination) may occur if the drug solution does not contain sufficient ionic strength. Erythrocyte aggregation occurs, for example, with 5% dextrose in water (a common large volume parenteral solution) and with many pharmaceutical products that have low ionic strength.

[0005] Pharmaceutical products are often lyophilized, and therefore need to be reconstituted with a solution prior to parenteral injection. However, when lyophilized products are reconstituted with low ionic strength solutions, the resultant preparation can also cause erythrocyte aggregation. Although reconstitution of lyophilized cakes with normal saline solution (0.9% NaCl) as opposed to sterile water for injection (sWFI) would provide additional ionic strength, the resulting drug solution may be hypertonic and could have undesirable side effects upon injection.

[0006] Thus, there remains a need for a solution that can be used to reconstitute lyophilized cakes or to dilute pharmaceutical solutions to provide a resultant preparation for injection that is isotonic with respect to plasma and has sufficient ionic strength such that it does not cause erythrocyte aggregation.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0007] The invention provides the discovery that erythrocyte agglutination is caused by low ionic strength solutions that come into contact with blood. Thus, when pharmaceutical formulations are prepared for intravenous injection by reconstitution or dilution in low ionic strength solutions such as 5% dextrose, 3% dextran, or sWFI, the resultant preparations may have the requisite osmolality to be about isotonic with respect to blood, but they often do not have an ionic strength sufficient to prevent agglutination. On the other hand, when pharmaceutical formulations are prepared for intravenous injection by reconstitution or dilution with high ionic strength solutions such as saline (0.9% NaCl or 154 mM NaCl), the resultant preparation may have a sufficient ionic strength to prevent agglutination, but it may possess an osmolality that is hypertonic with respect to blood, thereby causing dehydration of red blood cells (RBCs), venous inflammation, and/or possibly thrombophlebitis if repeated injections are frequent or chronic.

[0008] In one aspect, the invention provides a method for preparing a pharmaceutical formulation for intravenous injection, the method comprising adding an about 25 mM to about 150 mM sodium chloride solution to the pharmaceutical formulation thereby resulting in a formulation prepared for intravenous injection, wherein the prepared formulation is about isotonic with respect to plasma or is slightly hypotonic or slightly hypertonic with respect to plasma, and wherein the prepared formulation has a sufficient ionic strength to prevent erythrocyte agglutination (or erythrocyte aggregation).

[0009] The prepared formulation is about isotonic with respect to plasma, for example, when it has an osmolality that is from about 270 mOsm/L to about 330 mOsm/L. The prepared formulation is slightly hypotonic with respect to plasma, for example, when it has an osmolality that is from about 220 mOsm/L to about 270 mOsm/L. The prepared formulation is slightly hypertonic with respect to plasma, for example, when it has an osmolality that is from about 330 mOsm/L to about 600 mOsm/L.

[0010] In one aspect, the prepared formulation has an ionic strength that is sufficient to prevent erythrocyte agglutination when it has, for example, at least about 25 mEq/L of Na^+ and Cl^- ions. In another aspect, the prepared formulation has an ionic strength that is sufficient to prevent erythrocyte agglutination when it has, for example, at least about 40 mEq/L of Na^+ and Cl^- ions. In another aspect, the prepared formulation has an ionic strength that is sufficient to prevent erythrocyte agglutination when it has, for example, at least about

40 mEq/L of Na^+ and Cl^- ions and less than about 150 mEq/L of Na^+ and Cl^- ions. In another aspect, the prepared formulation has an ionic strength that is sufficient to prevent erythrocyte agglutination when it has, for example, an ionic strength as measured in conductivity that is at least about 2.5 mS/cm. In another aspect, the prepared formulation has an ionic strength that is sufficient to prevent erythrocyte agglutination when it has, for example, an ionic strength as measured in conductivity that is at least about 4.0 mS/cm.

[0011] The pharmaceutical formulation to be prepared for injection can be, for example, a non-liquid formulation or a solution formulation. A non-liquid formulation can therefore be reconstituted into solution by a sodium chloride solution that has a sodium chloride concentration of about 25-150 mM, 25-100 mM, 25-80 mM, 25-40 mM, 25-35 mM, 25-30 mM, or about 40 mM. A liquid or a solution formulation can therefore be diluted by a sodium chloride solution that has a sodium chloride concentration of about 25-150 mM, 25-100 mM, 25-80 mM, 25-40 mM, 25-35 mM, 25-30 mM, or about 40 mM. A non-liquid formulation can be, for example, a lyophilized formulation.

[0012] In one aspect, the sodium chloride solution that is added comprises from about 40 mM to about 150 mM sodium chloride. In one aspect, the sodium chloride solution that is added consists essentially of from about 40 mM to about 150 mM sodium chloride. In one aspect, the sodium chloride solution that is added comprises about 40 mM sodium chloride. In one aspect, the sodium chloride solution that is added consists essentially of a 40 mM sodium chloride solution. In one aspect, the sodium chloride solution that is added consists essentially of a solution that has a sodium chloride solution that is about $40 \text{ mM} \pm 10 \text{ mM}$ sodium chloride.

[0013] In one aspect, wherein prior to the addition of the sodium chloride solution, the pharmaceutical formulation does not contain an appreciable amount of an ionizing salt. An appreciable amount of an ionizing salt can be, for example, an amount that is greater than about 5 mM. In another aspect, an appreciable amount of an ionizing salt can be, for example, an amount that is greater than about 25 mM. If the pharmaceutical formulation is a lyophilized formulation, it does not contain an appreciable amount of an ionizing salt if it does not contain more than, for example, 5 mM or 25 mM of an ionizing salt when the lyophilized formulation is reconstituted in water.

[0014] In one aspect, wherein prior to the addition of the sodium chloride solution, the pharmaceutical formulation comprises histidine, glycine, sucrose, and polysorbate. In

another aspect, wherein prior to the addition of the sodium chloride solution, the pharmaceutical formulation comprises histidine, glycine, sucrose, polysorbate, and a therapeutic protein. Herein, a therapeutic protein can be, for example, a protein used for treating clotting disorders or for hemostasis, including but not limited to Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor XIII, antibodies, related analogues thereof, and derivatives thereof. In another aspect, wherein prior to the addition of the sodium chloride solution, the pharmaceutical formulation comprises histidine, glycine, sucrose, polysorbate, and Factor IX (including recombinant Factor IX (rFIX)). As used herein, Factor IX can include modified versions of Factor IX, including for example, PEGylated Factor IX, protein fusions comprising Factor IX such as albumin-Factor IX or immunoglobulin (whole or domains thereof)-Factor IX, and glycosylated Factor IX.

[0015] In one aspect, wherein the pharmaceutical formulation is a lyophilized formulation, prior to the addition of the sodium chloride solution, the formulation, measured as if it was reconstituted in water (in a volume that is the same as the fill volume, *i.e.*, the volume of the formulation prior to lyophilization), comprises: (a) from about 5 mM to about 30 mM histidine; (b) from about 0.1M to about 0.3M glycine; (c) from about 0.5 to about 2 percent sucrose; and (d) from about 0.001 to about 0.05 percent polysorbate (or from about 0.005 to about 0.05 percent). In one aspect, the formulation can further comprise, measured if it was reconstituted in water, (e) from about 0.1 mg/mL to about 100 mg/mL or more of a therapeutic protein, or from about 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000 IU/mL (international units/mL) or more of a therapeutic protein. In one aspect, the formulation can further comprise, measured if it was reconstituted in water, (e) from about 0.1 mg/mL to about 100 mg/mL or more of Factor IX, or from about 0.4 mg/mL to about 20 mg/mL of Factor IX, or from about 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000 IU/mL (international units/mL) or more of Factor IX.

[0016] In one aspect, the invention provides a method for preventing erythrocyte agglutination caused from intravenous injection, the method comprising reconstituting or diluting a pharmaceutical formulation with an about 25 mM to about 150 mM sodium chloride solution such that the reconstituted or diluted pharmaceutical formulation has an ionic strength sufficient to prevent erythrocyte agglutination when the reconstituted or diluted pharmaceutical formulation is administered to a subject by intravenous injection.

[0017] In one aspect, the invention provides a method for preparing a lyophilized pharmaceutical formulation for intravenous injection, the method comprising reconstituting

the lyophilized pharmaceutical formulation with an about 25 mM to an about 150 mM sodium chloride solution such that after reconstitution, the formulation has an ionic strength sufficient to prevent erythrocyte agglutination and an osmolarity that is about isotonic (or slightly hypertonic or slightly hypotonic).

[0018] In one aspect, the lyophilized formulation is reconstituted with the sodium chloride solution, wherein the volume of the sodium chloride solution used for reconstitution is less than the volume of the formulation pre-lyophilization (*i.e.*, fill volume). In this manner, the invention provides a method for reducing the volume of the formulation to be injected.

[0019] In one aspect, the lyophilized formulation is reconstituted with the sodium chloride solution, wherein the volume of the sodium chloride solution used for reconstitution is greater than the volume of the formulation pre-lyophilization (*i.e.*, fill volume). In this manner, the invention provides a method for maintaining the isotonicity of the formulation to be injected.

[0020] For example, a lyophilized formulation can be reconstituted with a volume of sodium chloride solution that is greater than the volume of the formulation pre-lyophilization, such as reconstitution with 5 mL of sodium chloride where the formulation volume pre-lyophilization is 4 mL. For example, a lyophilized 4 mL formulation reconstituted in 4 mL water is an isotonic solution containing 10 mM histidine, 260 mM glycine, 1% sucrose, 0.005% polysorbate, which is about 300 mOsm/L. But if the lyophilized formulation is reconstituted with 4 mL of a 40 mM NaCl (80 mOsm/L) solution, then the resultant formulation would have a slightly hypertonic solution ($300 \text{ mOsm/L} + 80 \text{ mOsm/L} = 380 \text{ mOsm/L}$). But if the lyophilized formulation is reconstituted with 5 mL of a 40 mM NaCl solution, then the resulting solution is about 8 mM (8 mOsm/L) histidine, 208 mM (208 mOsm/L) glycine, 0.8% (24 mOsm/L) sucrose, 0.004% (negligible osmolarity) polysorbate, and 40 mM (80 mOsm/L) NaCl, which is about 320 mOsm/L. Thus, by reconstituting a pre-lyophilization formulation that is about isotonic with a volume of sodium chloride solution that is greater than the fill volume, the invention can provide a resulting solution that is still about isotonic. In other words, reconstituting a pre-lyophilization formulation that is about isotonic with a volume of sodium chloride solution that is less than or about the same as the fill volume can result in a solution that is slightly hypertonic. To avoid this, the invention provides a method for maintaining isotonicity by reconstituting a lyophilized formulation

with a sodium chloride solution in a volume that is greater than the volume of the formulation pre-lyophilization.

[0021] In one aspect, the invention provides a method for maintaining isotonicity of a lyophilized formulation after reconstitution, the method comprising reconstituting a lyophilized formulation in a volume that is at least 20% greater than the volume of the formulation pre-lyophilization, wherein the formulation pre-lyophilization is about isotonic, such that the reconstituted formulation is about isotonic and has a sufficient ionic strength to prevent erythrocyte agglutination. By reconstituting a lyophilized formulation in a volume greater than its pre-lyophilization volume, the contribution to osmolarity of the lyophilized cake is decreased in direct proportion to the increase of volume from reconstitution as compared to pre-lyophilization. For example, a pre-lyophilization formulation with a tonicity of 300 mOsm/L in a volume X, if reconstituted in a solution with volume Y that is 20% greater than volume X, the 300 mOsm/L is then 240 mOsm/L in volume Y (a 20% decrease in osmolarity due to a 20% increase in volume). If the solution of volume Y is a sodium chloride solution, then the contribution towards tonicity of the sodium chloride solution is twice the concentration of sodium chloride in the solution. For example, if the solution of volume Y is 40 mM, then the reconstituted solution has a tonicity of 240 mOsm/L plus 80 mOsm/L, which is about isotonic, and which has a sufficient ionic strength to prevent erythrocyte aggregation.

[0022] In one aspect, the invention provides a method for preparing a lyophilized Factor IX formulation for intravenous injection, the method comprising adding an about 25 mM to about 150 mM sodium chloride solution to the lyophilized Factor IX formulation thereby resulting in a formulation prepared for intravenous injection, wherein the prepared formulation is about isotonic with respect to plasma or is slightly hypotonic or slightly hypertonic with respect to plasma, and wherein the prepared formulation has a sufficient ionic strength to prevent erythrocyte agglutination. In one aspect, the lyophilized Factor IX formulation, when measured as if reconstituted in water, comprises (a) from about 5 mM to about 30 mM histidine; (b) from about 0.1M to about 0.3M glycine; (c) from about 0.5 to about 2 percent sucrose; (d) from about 0.001 to about 0.05 percent polysorbate; and (e) from about 0.4 mg/mL to about 20 mg/mL of Factor IX, or from about 0.1 mg/mL to about 100 mg/mL or some other soluble amount of Factor IX, or from about 10 IU/mL to about 500 IU/mL of Factor IX, or from about 10 IU/mL to about 5000 IU/mL of Factor IX. In one aspect, an about 40 mM sodium chloride solution is added to the lyophilized Factor IX

formulation. In one aspect, about 5 mL of the about 40 mM sodium chloride solution is added to the lyophilized Factor IX formulation. In one aspect, the lyophilized Factor IX formulation if measured as if it is reconstituted in water comprises about 10 mM histidine, about 0.26M glycine, about 1% sucrose, and about 0.005% polysorbate.

[0023] In one aspect, the invention provides a pharmaceutical kit comprising: (a) a vial containing a lyophilized cake, wherein if the lyophilized cake is reconstituted in about 5 mL of water the solution would comprise: (i) from about 5 mM to about 30 mM histidine; (ii) from about 0.1M to about 0.3M glycine; (iii) from about 0.5 to about 2 percent sucrose; (iv) from about 0.001 to about 0.05 percent polysorbate; and (v) from about 0.4 mg/mL to about 20 mg/mL of Factor IX, or from about 0.1 mg/mL to about 100 mg/mL or some other soluble amount of Factor IX, or from about 50 IU/mL to about 500 IU/mL of Factor IX, or from about 10 IU/mL to about 5000 IU/mL of Factor IX; (b) a 25 mM to about 150 mM sodium chloride solution; and (c) instructions for reconstituting the lyophilized cake with the sodium chloride solution, such that after reconstitution the resultant solution is about isotonic and has a sufficient ionic strength to prevent erythrocyte aggregation upon intravenous injection.

[0024] In one aspect, the invention provides a pharmaceutical kit comprising: (a) a vial containing a lyophilized cake, wherein if the lyophilized cake is reconstituted in 4 mL of water the solution would comprise: (i) about 10 mM histidine; (ii) about 0.26M glycine; (iii) about 1 percent sucrose; (iv) about 0.005 percent polysorbate 80; and (v) from about 50 IU/mL to about 5000 IU/mL of Factor IX; (b) an about 40 mM sodium chloride solution; and (c) instructions for reconstituting the lyophilized cake in the vial with about 5 mL of an about 40 mM sodium chloride solution, such that after reconstitution the resultant solution comprises: (i) from about 7 or 8 to about 10 mM histidine; (ii) from about 200 to about 210 mM glycine; (iii) from about 0.7% to about 0.9% sucrose; (iv) about 0.004% polysorbate 80; (v) from about 50 IU/mL to about 5000 IU/mL of Factor IX; and (vi) about 40 mM NaCl.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0025] Figure 1 shows erythrocyte sedimentation results from experiments described in Example 3. Erythrocyte sedimentation was measured at 60 minutes using an adaptation of the modified Westergren method (see Example 2), in which human blood collected in EDTA was mixed 1:4 with test solutions. After 60 minutes, the distance in mm between the zero mark and the erythrocyte:plasma interface was measured. Horizontal bars represent the mean

and vertical brackets the standard deviation from a total of 12 donors. Results were combined from 4 independent experiments each of which evaluated blood from 3 donors.

[0026] Figure 2 shows an erythrocyte sedimentation evaluation on BeneFIX® formulations reconstituted with NaCl solutions. A 40 mM NaCl solution is sufficient to prevent erythrocyte agglutination when used to reconstitute either the currently marketed BeneFIX® product or a new formulation of BeneFIX® (BeneFIX®-R where prior to lyophilization the fill solution was comprised of 4 mL and had concentrations of 10 mM histidine, 260 mM glycine, 1% sucrose, 0.005% polysorbate 80; and after lyophilization it was reconstituted in 5 mL of 40 mM sodium chloride such that after reconstitution BeneFIX®-R comprises 40 mM NaCl, 8 mM histidine, 208 mM glycine, 0.8% sucrose, and 0.004% polysorbate).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0027] The invention provides methods for preparing pharmaceutical formulations for injection (in particular, preparations readied for intravenous injection) that do not cause erythrocyte agglutination, hemolysis, and/or cell shrinkage. To prevent agglutination, a pharmaceutical formulation ready for injection needs to have sufficient ionic strength. To prevent hemolysis or cell shrinkage, a pharmaceutical formulation ready for injection needs to be about isotonic with respect to plasma. The invention provides methods that prepare pharmaceutical formulations for injection that have both the sufficient ionic strength to prevent agglutination and the requisite tonicity to prevent significant hemolysis or cell dehydration or shrinkage. The present methods involve the use of sodium chloride solutions that are about 25 mM to about 150 mM for reconstituting lyophilized cakes (or other non-liquid pharmaceutical formulations) into solution or for diluting pharmaceutical formulation solutions. Whether the sodium chloride solutions are used for reconstitution or for dilution, the addition of particular sodium chloride solutions result in a pharmaceutical preparation for injection that is about isotonic with respect to plasma or blood and is of sufficient ionic strength to prevent erythrocyte aggregation upon injection, in particular, upon intravenous injection.

[0028] Terms

[0029] As used herein, the "molality" of a solution is the number of moles of a solute per kilogram of solvent.

[0030] As used herein, the "molarity" of a solution is the number of moles of solute per liter of solution.

[0031] As used herein, an "osmole" is the amount of a substance that yields, in ideal solution, that number of particles (Avogadro's number) that would depress the freezing point of the solvent by 1.86K.

[0032] As used herein, the "osmolality" of a solution is the number of osmoles of solute per kilogram of solvent. Osmolality is a measure of the number of particles present in solution and is independent of the size or weight of the particles. It can be measured only by use of a property of the solution that is dependent only on the particle concentration. These properties are vapour pressure depression, freezing point depression, boiling point elevation, and osmotic pressure, and are collectively referred to as colligative properties.

[0033] As used herein, the "osmolarity" of a solution is the number of osmoles of solute per liter of solution.

[0034] As used herein, a "pharmaceutical formulation" that is readied or prepared for injection can be any drug intended to be administered into a subject. For example, a pharmaceutical formulation can be a lyophilized cake, a solution, a powder, or a solid. The formulation, if not in liquid form, is reconstituted into solution with a NaCl solution of the invention. If the formulation is in liquid form, the formulation is diluted or mixed with a NaCl solution of the invention.

[0035] Ionic Strength

[0036] Ionic strength is a characteristic of an electrolyte solution (a liquid with positive and negatively charged ions dissolved in it). It is typically expressed as the average electrostatic interactions among an electrolyte's ions. An electrolyte's ionic strength is half of the total obtained by multiplying the molality (the amount of substance per unit mass of solvent) of each ion by its valence squared.

[0037] Ionic strength is closely related to the concentration of electrolytes and indicates how effectively the charge on a particular ion is shielded or stabilized by other ions (the so-called ionic atmosphere) in an electrolyte. The main difference between ionic strength and electrolyte concentration is that the former is higher if some of the ions are more highly charged. For instance, a solution of fully dissociated (broken down) magnesium sulfate ($\text{Mg}^{2+}\text{SO}_4^{2-}$) has 4 times higher ionic strength than a solution of sodium chloride (Na^+Cl^-) of the same concentration. Another difference between the two is that ionic strength reflects the

14

concentration of free ions, and not just of how much salt was added to a solution. Sometimes a salt may be dissolved but the respective ions are still bound together pairwise, resembling uncharged molecules in solution. In this case the ionic strength is much lower than the salt concentration.

[0038] For the invention, pharmaceutical preparations are prepared for injection such that they are not only isotonic, but also have a sufficient ionic strength to prevent RBC agglutination. A sufficient ionic strength of a preparation ready for injection (*i.e.*, a lyophilized cake that is reconstituted with a NaCl solution of the invention, or a drug solution that is diluted with a NaCl solution of the invention) can have, for example, at least about 25 milliequivalents per liter (mEq/L) of Na^+ and Cl^- ions. In one embodiment, a sufficient ionic strength is at least about 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, or at least about 40 mEq/L of Na^+ and Cl^- ions.

[0039] Ionic strength can also be described in terms of the conductivity of a solution. Conductivity is the ability of a material or solution to conduct electric current. The principle by which instruments measure conductivity is simple - two plates are placed in the sample, a potential is applied across the plates (normally a sine wave voltage), and the current is measured. Conductivity (G), the inverse of resistivity (R) is determined from the voltage and current values according to Ohm's law. $G = I/R = I \text{ (amps)} / E \text{ (volts)}$

[0040] Since the charge on ions in solution facilitates the conductance of electrical current, the conductivity of a solution is proportional to its ion concentration. In some situations, however, conductivity may not correlate directly to concentration. However, for sodium chloride solutions, conductivity is directly proportional to ion concentration. The basic unit of conductivity is the siemens (S), formerly called the mho. Since geometry of a test sample affects conductivity values, standardized measurements are expressed in specific conductivity units (S/cm) to compensate for variations in electrode dimensions. Specific conductivity (C) is simply the product of measured conductivity (G) and the electrode cell constant (L/A), where L is the length of the column of liquid between the electrode and A is the area of the electrodes. $C = G \times (L/A)$. If the cell constant is 1 cm^{-1} , the specific conductivity is the same as the measured conductivity of the solution. Although electrode shape varies, an electrode can always be represented by an equivalent theoretical cell.

[0041] Thus, in one embodiment, a sufficient ionic strength of a preparation ready for injection can have, for example, at least about a conductivity of about 4 mS/cm or higher. In

another embodiment, the sufficient ionic strength of a solution ready for injection is at least about 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, or at least about 3.9 mS/cm.

[0042] An operational definition of whether a solution has a sufficient ionic strength to prevent erythrocyte agglutination can also be used to explain the term "sufficient ionic strength." For example, this can be based on an experiment of adding a test solution to whole blood and observing the distance of erythrocyte sedimentation (see Example 2; adapted, modified Westergren method). In one embodiment, if a test solution when mixed with whole blood in a ratio of 4:1 provides an erythrocyte sedimentation at 60 minutes that is less than about 10 mm (see Example 2, Figures 1 and 2, for example), then the test solution has a sufficient ionic strength to prevent erythrocyte agglutination. In another embodiment, if a test solution when mixed with whole blood in a ratio of 4:1 provides an erythrocyte sedimentation at 60 minutes that is less than about 5 mm, then the test solution has a sufficient ionic strength to prevent erythrocyte agglutination.

[0043] Solution Osmolarity

[0044] The methods of the invention provide pharmaceutical preparations for injection that are about isotonic with respect to blood. To determine whether a pharmaceutical preparation is about isotonic with respect to blood, one calculates the osmolarity for all chemical components of a solution including the diluent. The osmolar concentration of pharmaceutical preparations for injection (parenteral solutions) can exert adverse effects on the blood cells and vessels of the human body. Tonicity can be calculated for fluids and dissolved or diluted medications, which are expressed in a numerical value of milliosmoles per liter of fluid (mOsm/L). This value is also known as osmolarity. The osmolarity of blood ranges between 285 and 310 mOsm/L. When hypotonic or hypertonic solutions are injected into blood, fluid shifts into or out of cells, which can cause a variety of negative effects.

[0045] Solution osmolarity is based in part on the concepts of osmosis and osmotic pressure. Osmosis is the diffusion of solutes (dissolved particles) or the transfer of fluid through semipermeable membranes such as blood vessels or cell membranes. Osmotic pressure, which facilitates the transport of molecules across membranes, is expressed in osmolar concentrations and is referred to as hypo-osmotic (hypotonic), iso-osmotic (isotonic),

or hyper-osmotic (hypertonic) when compared with biologic fluids such as blood or plasma. The term "tonicity" and "osmotic pressure" are often considered to be synonymous.

[0046] The osmotic pressure is the hydrostatic (or hydraulic) pressure required to oppose the movement of water through a semipermeable membrane in response to an 'osmotic gradient' (*i.e.*, differing particle concentrations on the two sides of the membrane). Serum osmolality can be measured by use of an osmometer or it can be calculated as the sum of the concentrations of the solutes present in the solution. The value measured in the laboratory is usually referred to as the osmolality. The value calculated from the solute concentrations is reported by the laboratory as the osmolarity. The osmolar gap is the difference between these two values.

[0047] Herein, tonicity and osmotic pressure are to be considered synonymously, and are to be understood broadly. Tonicity can mean the effective osmolality and is equal to the sum of the concentrations of the solutes in a solution that have the capacity to exert an osmotic force across a membrane, including a cell membrane. In the strict sense, osmolality is a property of a particular solution and is independent of any membrane. Tonicity is a property of a solution in reference to a particular membrane. However, the invention shall refer to solutions being isotonic with respect to biological solutions such as blood or plasma, and this referencing shall include the meaning that the particular solution is isotonic with blood or plasma with respect to a cell membrane of a cell in the blood or plasma or other biological solution.

[0048] An operational definition of tonicity can be used to explain the term. This can be based on an experiment of adding a test solution to whole blood and observing the result. If the RBCs in whole blood swell and rupture, the test solution is said to be hypotonic compared to normal plasma. If the RBCs shrink and become crenated, the test solution is said to be hypertonic compared to normal plasma. If the RBCs stay the same, the test solution is said to be isotonic with plasma. The RBC cell membrane is the reference membrane. For example, whole blood placed in normal saline (*i.e.*, 0.9% sodium chloride) will not swell, and hence normal saline is said to be isotonic.

[0049] Characteristics of Isotonic Solutions

[0050] The invention provides methods for preparing or readying pharmaceutical formulations for injection into a subject, wherein the formulations are prepared into solutions that are (1) about isotonic with respect to blood (or plasma or other biologic fluid) or are not

so hypertonic or hypotonic as to cause significant hemolysis, thrombosis, or vessel irritation, and (2) have sufficient ionic strength to prevent erythrocyte aggregation.

[0051] In one embodiment, isotonic (with respect to blood) pharmaceutical formulations ready for injection have a tonicity or osmolarity that is greater than about 270 mOsm/L and less than about 330 mOsm/L. In one embodiment, the isotonic pharmaceutical formulations ready for injection have a tonicity or osmolarity that is greater than about 270 mOsm/L and less than about 328 mOsm/L.

[0052] Although solutions such as 0.9% sodium chloride and 5% dextrose are isotonic, when they are used to reconstitute or dilute many pharmaceutical formulations, the resultant solution may not have sufficient ionic strength to prevent erythrocyte agglutination (as for 5% dextrose) or may have too much ionic strength such that the resultant solution is hypertonic. Thus, the methods of the invention use solutions for dilution or reconstitution that contain a minimum concentration of sodium chloride to provide (a) a sufficient ionic strength to mitigate erythrocyte aggregation, and (b) a sufficient tonicity to prevent hemolysis, and a maximum concentration of sodium chloride to provide (c) a resultant tonicity that is not so great as to be hypertonic solutions. Further, the methods of the invention use solutions for dilution or reconstitution that can provide a sufficient ionic strength and isotonicity with respect to blood, while also maintaining a practical injection volume for the pharmaceutical preparation.

[0053] Characteristics of Hypotonic Solutions

[0054] The invention provides methods for preparing pharmaceutical formulations for injection into a subject, wherein the formulations are prepared into solutions that are not hypotonic with respect to blood or are not so hypotonic (*i.e.*, slightly hypotonic with respect to blood) so as to cause significant hemolysis. In one embodiment, the pharmaceutical formulations ready for injection that is considered slightly hypotonic with respect to blood can have a tonicity or osmolarity that is less than about 270 mOsm/L and greater than about 240 mOsm/L. In one embodiment, the pharmaceutical formulations ready for injection that is considered slightly hypotonic with respect to blood can have a tonicity or osmolarity that is less than about 270 mOsm/L and greater than about 220 mOsm/L.

[0055] Examples of hypotonic solutions include many pharmaceutical preparations that are readied for injection with sterile water. When hypotonic solutions are injected, a fluid shift occurs and water is moved into the endothelial cells of the vein and blood cells.

Cells that absorb too much water can burst, and thus, injection of hypotonic solutions can cause vein irritation, phlebitis, and hemolysis.

[0056] Characteristics of Hypertonic Solutions

[0057] The invention provides methods for preparing pharmaceutical preparations for injection into a subject, wherein the preparations are prepared into solutions that are not hypertonic with respect to blood or are not so hypertonic (*i.e.*, slightly hypertonic) as to cause significant thrombosis and/or vessel irritation. In one embodiment, the pharmaceutical formulations ready for injection that is considered to be slightly hypertonic can have a tonicity or osmolarity that is greater than about 340 mOsm/L and less than about 600 mOsm/L. In one embodiment, the pharmaceutical formulations ready for injection that is considered to be slightly hypertonic can have a tonicity or osmolarity that is greater than about 340 and less than about 375, 400, 425, 450, 475, 500, or about 575 mOsm/L. In general, hypertonic solutions exhibit a tonicity that is greater than about 340 mOsm/L. Solutions with an osmolarity that is greater than about 600 mOsm/L should be used with care in injections.

[0058] Examples of undesirable hypertonic solutions include many pharmaceutical formulations that are readied for injection with 10% dextrose, or pharmaceutical preparations that have multiple additives that affect osmolarity. When hypertonic solutions are injected, a fluid shift occurs and water is drawn out of the endothelial cells of the vein and blood cells. Cells that lose too much water can shrink, and thus, injection of hypertonic solutions can cause vein irritation, phlebitis, and thrombosis.

[0059] pH

[0060] The pH of blood ranges from about 7.35 to about 7.45, which is considered neutral. Pharmaceutical preparations with a pH value below 7 are considered acidic drugs and those with a pH value below 4.1 are considered very acidic. Drugs with a pH value higher than 7.5 are considered basic or alkaline drugs, and those with a pH value higher than 9.0 are considered very basic or alkaline. Very acidic or very alkaline drug solutions can cause phlebitis and thrombosis. Thus, in one embodiment, the invention provides sodium chloride solutions for reconstituting lyophilized drug formulations or for diluting liquid drug formulations to ready these formulations for intravenous injection, wherein the readied preparations for injection (1) do not have a pH that is less than 4.1 or greater than 9.0, (2) have a sufficient ionic strength to prevent erythrocyte aggregation, and (3) is about isotonic

(or slightly hypertonic or hypotonic) with respect to blood such that hemolysis or crenation does not occur to RBCs. However, the pH of a solution is not a consideration with respect to whether the solution has a sufficient ionic strength to prevent erythrocyte aggregation. In other words, if a lyophilized formulation when reconstituted with water has a pH that is below 4.1 or greater than 9.0, this does not prevent the use of a sodium chloride solution for reconstitution in order to prevent erythrocyte agglutination.

[0061] Calculating Osmolarity

[0062] The osmolarity of any pharmaceutical preparation can be calculated by using the following formula: Osmolarity = (weight of substance (g) divided by the molecular weight of the substance (g/L)) multiplied by the number of species multiplied by 1000 for milliosmolarity. The term "species" refers to the number of ions or chemical species formed when dissolution occurs.

[0063] Pharmaceutical Formulations Ready or Prepared for Injection

[0064] The invention provides methods for reconstituting lyophilized drug products into solution in order to prepare the drug product for injection into a subject. The reconstituted drug product is ready for injection by having a sufficient ionic strength and a tonicity that is about isotonic with respect to blood.

[0065] The methods of the invention also pertain to diluting drug solutions in order to prepare the drug solution for injection into a subject. The diluted drug solution is ready for injection by having a sufficient ionic strength and by being about isotonic with respect to blood.

[0066] In one embodiment, the lyophilized or dry drug product/formulation, if reconstituted in water, has an osmolarity of about 100 mOsm/L to about 360 mOsm/L. Because the invention provides methods for reconstitution using about 25mM to about 150 mM sodium chloride solutions, the practitioner should use a particular sodium chloride solution based upon the expected combined osmolarity of the lyophilized drug product reconstituted into the sodium chloride solution. Thus, for example, if a lyophilized drug product if reconstituted in water has an osmolarity of about 300 mOsm/L, then the NaCl solution for reconstitution should be about 25 mM to about 30 mM. In another example, if a lyophilized drug product if reconstituted in water has an osmolarity of about 100 mOsm/L, then the NaCl solution for reconstitution should be about 25 mM to about 130 mM.

[0067] In one embodiment, a drug product (whether lyophilized or in solution) to be prepared for injection by the present methods does not contain HES (hydroxyethyl starch). HES-containing formulations, despite reconstitution or dilution with NaCl solutions for ionic strength, can cause erythrocyte sedimentation and agglutination in *in vitro* experiments. In another embodiment, a drug product to be prepared for injection by the present methods does not contain dextrans, because adapted modified Westergren methods (see Example 2) show that the addition of NaCl would not counteract the effect of enhanced sedimentation that dextrans can cause.

[0068] In one embodiment, the invention provides methods for preparing a pharmaceutical preparation for intravenous injection wherein the pharmaceutical preparation is a lyophilized cake comprising a primary bulking agent. The primary bulking agent can be, for example, mostly non-ionizing. Non-ionizing bulking agents include, but are not limited to, mannitol, glycine, sucrose, lactose, other disaccharides, therapeutic proteins or the active ingredient of a formulation itself, or other bulking agents known to one skilled in the art. The concentrations of non-ionizing bulking agents do not significantly affect whether a solution has a sufficient ionic strength to prevent agglutination. However, their concentrations do have an effect on osmolarity, and therefore, their concentrations can have an effect on tonicity. The concentration of glycine, for example, is equivalent to its contribution to osmolarity, thus 10 mM glycine is equivalent to 10 mOsm/L.

[0069] Protein ingredients in a drug formulation, including active ingredients, do not significantly affect ionic strength of a solution or the osmolarity of a solution. For example, assume a molecular weight of 50,000 for a protein and assume 2.5 mg of the protein in a 1-2 mL solution to be injected. This is equivalent to 0.05 mM, thus, the protein does not appreciably contribute to osmolarity.

[0070] Pharmaceutical preparations also often contain surfactants, such as polysorbate-80. Polysorbate-80 and other surfactants are large molecular weight molecules, so amounts that are usually present in preparations, such as 0.001% to 0.01%, are too small to contribute appreciably to osmolarity or ionic strength. Other surfactants include Brij® 35, Brij® 30, Lubrol-px™, Triton X-10, Pluronic® F127, and sodium dodecyl sulfate (SDS).

[0071] Other large molecular weight molecules that may be present in small amounts in pharmaceutical formulations that do not appreciably affect osmolarity or ionicity are polymers, with the qualification that they are not salts like dextran sulfate. Exemplary

polymers include dextran, poly(vinyl alcohol) (PVA), hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), gelatin, polyethylene glycol (PEG) and polyvinylpyrrolidone (PVP).

[0072] Pharmaceutical formulations also often contain sucrose or other sugars or polyols, often in an amount of 0-2, 0-5, or 0-10% or higher. For example, 5-10% sucrose can be used when the formulation does not comprise a bulking agent. Generally, where a formulation is lyophilized, and amounts of the formulation are identified herein as percentages or molarity amounts, this is in reference to percentages and molarity of a solution prior to lyophilization (*i.e.*, fill amounts). Thus, when a solution has 1% sucrose, this is equivalent to 29.2 mM. Because sucrose does not appreciably ionize or disassociate in solution, 29 mM of sucrose is equivalent to 29 mOsm/L. Other sugars or polyols that do not appreciably ionize or disassociate in solution include glycerol, xylitol, sorbitol, mannitol (also can be used as a bulking agent), glucose, inositol, raffinose, maltotriose, lactose, and trehalose.

[0073] Pharmaceutical formulations also can contain buffering agents. Buffering agents include, for example, acetate, citrate, glycine, histidine, phosphate (sodium or potassium), diethanolamine and Tris. Buffering agents include those agents that maintain a solution pH in an acceptable range. Buffering agents such as glycine, histidine, and diethanolamine are mostly non-ionizing, and thus their concentrations are equivalent to osmolality and should be kept in mind when considering whether a formulation ready for injection is about isotonic. Buffering agents such as acetate and citrate are usually salts, and are therefore ionizing, and their concentrations are multiplied with respect to calculating their contribution to a solution's osmolality.

[0074] Pharmaceutical formulations can include essentially any active ingredient, including proteins, nucleic acids, viruses, and chemical compounds. These molecules mostly do not appreciably affect the ionic strength or the osmolality of a solution to be injected. If these molecules are salts, as often small molecule compounds are pharmaceutical salts, then they may appreciably affect the ionic strength and/or osmolality.

[0075] Certain amino acids are also found in some pharmaceutical formulations and are used as cryoprotectants, lyoprotectants and/or bulking agents. Some amino acids, such as histidine, are mostly non-ionizing, and thus the concentration of an amino acid in a formulation should only be kept in mind when calculating the osmolality of a solution such that a formulation ready for injection is about isotonic with respect to blood.

[0076] BeneFIX®

[0077] BeneFIX® is produced by a genetically engineered Chinese hamster ovary (CHO) cell line that is extensively characterized and shown to be free of infectious agents. The stored cell banks are free of blood or plasma products. The CHO cell line secretes recombinant Factor IX (rFIX) into a defined cell culture medium that does not contain any proteins derived from animal or human sources, and the recombinant Factor IX is purified by a chromatography purification process that does not require a monoclonal antibody step and yields a high-purity, active product. A membrane filtration step that has the ability to retain molecules with apparent molecular weights >70,000 (such as large proteins and viral particles) is included for additional viral safety. BeneFIX® is predominantly a single component by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis evaluation. The potency (in international units, I.U. (IU)) is determined using an *in vitro* one-stage clotting assay against the World Health Organization (WHO) International Standard for Factor IX concentrate. One international unit is the amount of Factor IX activity present in 1 mL of pooled, normal human plasma. The specific activity of BeneFIX® is greater than or equal to 180 IU per milligram of protein. BeneFIX® is not derived from human blood and contains no preservatives or added animal or human components.

[0078] BeneFIX® is formulated as a sterile, nonpyrogenic, lyophilized powder preparation. BeneFIX® is intended for intravenous (IV) injection. It is available in single use vials containing the labeled amount of Factor IX activity, expressed in international units (IU). Each vial contains, for example, nominally 250, 500, or 1000 IU (or more, including 2000 IU) of coagulation Factor IX (Recombinant). After reconstitution of the lyophilized drug product with sterile water, the concentrations of excipients in the 500 and 1000 IU dosage strengths are 10 mM L-histidine, 1% sucrose, 260 mM glycine, 0.005% polysorbate 80. The concentrations after reconstitution in the 250 IU dosage strength are half those of the other two dosage strengths. The 500 and 1000 IU dosage strengths are isotonic after reconstitution, and the 250 IU dosage strength has half the tonicity of the other two dosage strengths after reconstitution. All dosage strengths yield a clear, colorless solution upon reconstitution.

[0079] In one embodiment, the invention provides methods for preparing BeneFIX® to be injected into a subject, where BeneFIX® is reconstituted into a sodium chloride solution, wherein the sodium chloride solution is greater than about 25 mM and less than about 150 mM. In one embodiment, the sodium chloride solution used to reconstitute

BeneFIX® is about 40 mM. In one embodiment, one vial of lyophilized BeneFIX® is reconstituted into about 4-5 mL of a 25mM-150mM sodium chloride solution.

[0080] Reformulated BeneFIX® (BeneFIX®-R)

[0081] Because of the low ionic strength of BeneFIX® reconstituted in water, various reformulations were made (Reformulated BeneFIX® (BeneFIX®-R)). The goal was to add sufficient ionic strength to the BeneFIX® formulation so as to mitigate the potential for RBC agglutination. In order to increase the ionic strength of BeneFIX®, sodium chloride can be incorporated into the reconstituted product by replacing the sWFI as the reconstituting solution. Alternatively, BeneFIX® can be reformulated by adding NaCl to the pre-lyophilization formulation, such that reconstitution can still be achieved with water, but lyophilizing salt solutions is more difficult, and it is more practical to simply reconstitute lyophilized cakes with NaCl solutions. This is also true for other lyophilized pharmaceutical preparations that do not have a sufficient ionic strength when reconstituted with sWFI to prevent agglutination.

[0082] In one embodiment, BeneFIX®-R can be lyophilized in the same formulation as BeneFIX® (10 mM L-histidine, 260 mM glycine, 1% sucrose, 0.005% polysorbate 80), and only the rFIX concentration will differ. BeneFIX®-R bulk drug product can then be filled, for example, at 4 mL per vial with 10 mM L-histidine, 260 mM glycine, 1% sucrose, 0.005% polysorbate 80, and lyophilized. When BeneFIX®-R is reconstituted to 5 mL per vial with a 25-150 mM NaCl solution, such as with 40 mM NaCl, the concentration of the excipients is reduced by 20% when compared to the current BeneFIX® formulation pre-lyophilization. This strategy results in a formulation that is (1) isotonic, (2) has sufficient ionic strength to reduce the potential for RBC agglutination, and (3) reduces the injection volume for higher doses of rFIX. BeneFIX®-R can be provided with, for example, 250, 500, 1000, and 2000 IU of rFIX per vial dosage strengths. Thus, after reconstitution with 5 mL of a 25-150 mM NaCl solution, the resultant BeneFIX®-R formulation solution can be from about 7 to about 9 mM histidine; from about 188 to about 220 mM glycine; from about 0.7% to about 0.9% sucrose; and about 0.004% polysorbate 80. Depending upon the amount of rFIX in a vial, for example, 250, 500, 1000, or 2000 IU, reconstitution in 5 mL of a NaCl solution would result in an rFIX concentration of about 50, 100, 200, or 400 IU/mL, respectively. The osmolarity of the BeneFIX®-R formulation reconstituted in 5 mL of a 40 mM NaCl solution is about 320 mOsm/L.

[0083] Exemplary Formulations To Be Prepared for Injection

[0084] Recombinant Factor IX can also be lyophilized in formulations described in U.S. Patent No. 6,372,716, which is hereby incorporated by reference for all purposes, including the formulations described therein. The formulations described in the patent can be used with the present invention, where the formulations are not limited to having rFIX as the active ingredient. Thus, for example, lyophilized formulations that can be reconstituted with 25 mM-150 mM sodium chloride solutions to prepare them for injection, include formulations that comprise glycine, polysorbate, sucrose, histidine, and an active ingredient. The active ingredient can be essentially any protein, virus, nucleic acid, or chemical compound, for example. The glycine can have a concentration, for example, of about 0.1M to 0.3M. The polysorbate can have a concentration, for example, of about 0.001 to about 0.05%. The sucrose can have a concentration, for example, of about 0.5% to about 2%. The histidine can have a concentration, for example, of about 5 mM to about 30 mM.

[0085] In one embodiment, a lyophilized formulation to be reconstituted with 25-150 mM sodium chloride solution comprises about 0.1 to 0.3M glycine, about 0.5 to 2% sucrose, 0.001 to about 0.05% polysorbate, about 5 to about 30 mM histidine, and about 0.1 to about 20 mg/mL of an active ingredient. The active ingredient can be, for example, rFIX. In another embodiment, a rFIX lyophilized formulation to be reconstituted with 25-150 mM sodium chloride solution comprises about 0.13 to about 3 mg/ml rFIX or about 50 to about 600 IU/mL of rFIX, about 0.26M glycine, about 10 mM histidine, about 1% sucrose, and about 0.005% polysorbate.

EXAMPLES OF THE INVENTION

[0086] The examples described below are provided to illustrate aspects of the present invention and are not included for the purpose of limiting the invention.

Example 1: Effects of Anti-Coagulants and Formulation Components on BeneFIX®-Associated RBC Agglutination

[0087] There are occasional reports of BeneFIX®-associated RBC agglutination in butterfly catheter lines and syringes. Recent studies in blood from hemophilia dogs demonstrate that the agglutination occurs in the absence of recombinant human FIX in the formulation buffer. Thus, the present study investigated whether standard anti-coagulants, various BeneFIX® components, and ionic strength affects the BeneFIX®-associated agglutination phenomenon.

[0088] Blood was obtained from a pool of anonymous human volunteers and was collected into Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) containing a standard anti-coagulant, such as ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA), sodium citrate, or heparin.

[0089] To test for agglutination, the blood samples in the Vacutainer tubes were first continuously mixed on a nutator. Blood, 12.5 μ L, was diluted in 87.5 μ L of a test solution in a 48-well cell culture plate, and was allowed to incubate at room temperature for 2 minutes prior to observation under an inverted-phase contrast microscope at 400x magnification. Each well was videotaped to capture still images in order to score RBC agglutination according to the following criteria listed below in Table 1.

Table 1: RBC Agglutination Scoring Key

Score	Agglutination Phenotype
0	No agglutination, majority are individual cells, few or occasional doublets.
1	Mostly individual cells, small aggregates dispersed throughout.
2	Lots of small aggregates, still some individual cells in background.
3	Mostly small to medium aggregates with occasional individual cells.
4	Massive cell aggregates.

[0090] *Effects of Standard Anti-Coagulants on RBC Agglutination:* The first study included the assay of blood samples from three donors. Blood was collected into EDTA, heparin, and sodium citrate Vacutainer tubes for each donor. The test articles included BeneFIX®, 100 IU/mL, reconstituted in each of the following NaCl concentrations: 0 mM (sWFI), 20 mM, 40 mM, 60 mM, and 77 mM NaCl. In addition, dextrose 5% in water (D5W) was included as a positive control. The samples were diluted at a blood to BeneFIX® or blood to D5W ratio of 1:8. Images were captured, stored digitally, masked, and scored for agglutination. Two minutes following the addition of blood to the BeneFIX® reconstituted with sWFI, agglutination was seen in the samples from all three donors regardless of the type of anti-coagulant used. As increasing concentrations of NaCl were used, the agglutination response was attenuated. Marked agglutination was seen when blood was added to D5W.

[0091] *Effects of NaCl on RBC Agglutination in Pre-screened Donors:* Donor samples were collected into heparinized Vacutainer tubes. Because spontaneous

agglutination had been observed in some previous samples, all donors were initially screened using 154 mM NaCl. If agglutination was observed, the sample was disqualified from further assays. The remaining samples from each donor were diluted 1:8 into one of two formulations: (1) 100 IU/mL BeneFIX® reconstituted with sWFI, and (2) 100 IU/mL BeneFIX® reconstituted with 154 mM NaCl. Images were captured, stored digitally, masked and scored for agglutination. Agglutination was seen with BeneFIX® reconstituted sWFI, whereas reconstitution with 154 mM NaCl reduced or eliminated the agglutination reaction (see Table 2 for scores).

Table 2: Agglutination Scores

Donor	154 mM NaCl Pre-Screen Control	BeneFIX® + sWFI	BeneFIX® + 154 mM NaCl
7	0	2	1
11	0	3	0
8	0	3	0
28	0	3	0
41	0	3	1

[0092] *Effect of Formulation Components and BeneFIX® Concentration:* Several formulations of BeneFIX® were evaluated to ascertain the impact of different components on RBC agglutination. Eight different mixtures, with and without 154 mM NaCl were prepared, for a total of 16 mixtures (Table 3). Twelve donors were screened for spontaneous agglutination and two were disqualified from further study. Blood samples from five of the ten remaining donors were used for the first 8 formulations (samples 1-A through 1-H) and the other five donor samples were used for the second 8 formulations (samples 2-I through 2-P). Samples were diluted 1:8 as before and images were captured and scored as previously described.

Table 3: Formulation Design Matrix
(+/- indicates presence/absence of an ingredient)

Set/Sample ID	BeneFIX® concentration (IU/mL)	Glycine (GLY) 260 mM	Sucrose 10mg/mL	Tween-80 (Polysorbate-80) 0.005%	Histidine (HIS) 10 mM	NaCl 154mM
1-A, BeneFIX®	100	+	+	+	+	-
1-B, BeneFIX®	100	+	+	+	+	+
1-C, BeneFIX®	300	+	+	+	+	-
1-D, BeneFIX®	300	+	+	+	+	+
1-E, BeneFIX®	600	+	+	+	+	-
1-F, BeneFIX®	600	+	+	+	+	+

Set/Sample ID	BeneFIX® concentration (IU/mL)	Glycine (GLY) 260 mM	Sucrose 10mg/mL	Tween-80 (Polysorbate- 80) 0.005%	Histidine (HIS) 10 mM	NaCl 154mM
1-G, No BeneFIX®	-	+	+	+	+	-
1-H, No BeneFIX®	-	+	+	+	+	+
2-I, BeneFIX®, No GLY	100	-	+	+	+	-
2-J, BeneFIX®, No GLY	100	-	+	+	+	+
2-K, No Sucrose	100	+	-	+	+	-
2-L, No Sucrose	100	+	-	+	+	+
2-M, BeneFIX®, No Tween-80	100	+	+	-	+	-
2-N, No Tween-80	100	+	+	-	+	+
2-O, BeneFIX® No HIS	100	+	+	+	-	-
2-P, BeneFIX® No HIS	100	+	+	+	-	+

[0093] Agglutination scores for the experiment laid out in Table 3 are shown below in Tables 4A and 4B. No particular component, whether the active ingredient or an excipient, of the BeneFIX® preparation was associated with agglutination. As expected, removal of glycine caused RBC lysis due to hypotonicity of the solution. However, reconstitution with 154 mM NaCl reduced or eliminated the in vitro agglutination and the lysis.

Table 4A: Agglutination Scores - Varying the BeneFIX® Concentration

Sample Donor ID	1-A	1-B	1-C	1-D	1-E	1-F	1-G	1-H
6	4	1	2	1	4	1	3	2
14	3	0	2	3	3	1	2	4
19	4	1	3	0	3	1	3	1
40	1	0	2	1	2	2	3	1
43	3	0	3	1	4	0	3	3
<i>Mean score</i>	3	0.4	2.4	1.2	3.2	1	2.8	2.2

Table 4B: Agglutination Scores - Excipients Effects

Sample Donor ID	2-I	2-J	2-K	2-L	2-M	2-N	2-O	2-P
1	Lysis	1	2	0	3	1	3	0
11	4	0	4	1	3	1	2	0
18	Lysis	1	4	1	3	2	3	2
34	Lysis	0	2	0	2	2	3	2
45	Lysis	1	4	1	4	3	2	3
<i>Mean score</i>	Lysis	0.6	3.2	0.6	3	1.8	2.6	1.4

[0094] *Effects of Lower Concentrations of NaCl on RBC Agglutination in Pre-Screened Donors:* Donor samples were collected into heparinized Vacutainer tubes.

Because agglutination had been observed in some previous samples, all donors were initially screened with 154 mM NaCl. If agglutination was observed, the sample was disqualified from further assays. The remaining samples from each donor were diluted 1:8 as before into one of three formulations: (1) 100 IU/mL BeneFIX® with sWFI; (2) 100 IU/mL BeneFIX® with 40 mM NaCl; or (3) 100 IU/mL BeneFIX® with 77 mM NaCl. Images were captured, collected and scored as before. The results are provided in Table 5 below. Agglutination was seen in all five samples with BeneFIX® reconstituted with water, whereas reconstitution of BeneFIX® with 40 mM or 77 mM NaCl reduced or eliminated the agglutination reaction.

Table 5: Agglutination Scores

Donor No.	154 mM NaCl	BeneFIX® + sWFI	BeneFIX® + 40 mM NaCl	BeneFIX® + 77 mM NaCl
8	0	3	1	2
34	0	3	2	1
39	0	4	3	1
40	0	3	0	1
47	0	3	1	1
Mean score	0	3.2	1.4	1.2

[0095] *Analysis:* RBC agglutination occurred in blood anti-coagulated with heparin, EDTA, or sodium citrate when mixed with BeneFIX® at a blood to reconstituted BeneFIX® volume ratio of 1:8. No effect of anti-coagulant type was seen on the agglutination, therefore heparin was used as the anti-coagulant in subsequent evaluations. In some samples, agglutination occurred in the presence of 0.9% NaCl alone (negative control for agglutination). Therefore, subsequent evaluations were conducted only with samples that exhibited no agglutination with the 0.9% NaCl control.

[0096] The effects of three concentrations of BeneFIX® (100, 300, or 600 IU/mL) and of each individual component of BeneFIX®, reconstituted in sWFI or NaCl solution were then evaluated for RBC agglutination when mixed with heparin anti-coagulated blood at a blood to BeneFIX® volume ratio of 1:8. Elimination of any particular component, including the recombinant human FIX protein had no effect on the agglutination response. This indicates that a broad range of different pharmaceutical formulations can be readied (reconstituted or diluted) with NaCl solutions for intravenous injection. Removal of glycine resulted in RBC lysis. However, the use of 40 mM (0.234% NaCl, injectable), 77 mM

(0.45% NaCl, injectable) or 154 mM NaCl (0.9% NaCl, injectable) for reconstitution reduced or eliminated the agglutination response and lysis.

[0097] Thus, these results show that no particular component of the BeneFIX® formulation is related to the observed agglutination. Although removal of glycine from the BeneFIX® formulation and reconstitution with water results in a hypotonic solution that causes lysis, osmolarity and tonicity is a distinct concern from ionic strength and agglutination. The results show that agglutination is associated with the low ionic strength of the reconstituted recombinant Factor IX (rFIX) in sWFI, and reconstitution with NaCl attenuates or eliminates agglutination. Thus, reconstitution of other pharmaceutical formulations with NaCl solutions, even NaCl solutions having a concentration below 154 mM, can prevent both agglutination and lysis upon intravenous injection.

Example 2: Adaptation of the Modified Westergren Method of Erythrocyte Sedimentation Rate Measurement to Assess Erythrocyte Aggregation Induced by Pharmaceutical Agents or Formulations

[0098] The currently marketed BeneFIX® formulation is a non-ionic formulation. During administration of the BeneFIX® formulation reconstituted in sWFI, there has been infrequent observations of erythrocyte aggregation (i.e., agglutination) when a patient's blood is mixed with the reconstituted BeneFIX®, such as in intravenous tubing. The invention provides the discovery that erythrocyte aggregation is associated with the formulation, not rFIX, and is prevented by using diluents that contain at least about 40 mM NaCl. To assist in the design of custom diluents containing at least about 40 mM NaCl, a quantifiable assay was designed that can be used to measure erythrocyte sedimentation, which is an established method to assess erythrocyte aggregation in vitro. The modified Westergren method, in which blood is diluted 4:5 in normal saline, was adapted to assess aggregation in blood that had been diluted 1:4 or 1:8 with either saline or test solutions (i.e., custom diluents).

[0099] Human blood was obtained from healthy adult volunteers and collected into tubes containing EDTA. To demonstrate the suitability of blood samples for sedimentation experiments, the clinically defined erythrocyte sedimentation rate ESR₆₀ was measured by the modified Westergren method. Briefly, well-mixed blood was diluted 4:5 with 154 mM NaCl, gently mixed well, and then loaded immediately onto a self-zeroing Westergren tube that had been placed in a custom 10-tube rack. The distance in mm from the zero mark at the top of the tube to the plasma:erythrocyte interface after 60 minutes was measured and recorded. The ESR₆₀ results were compared with published normal reference values (Morris, M.W. *et*

al., Basic examination of blood, in Henry, J.B., ed., Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, Philadelphia, PA, WB Saunders, 2001: 479-519).

[00100] Two experiments were conducted to show the suitability of the adapted, modified Westergren method to assess erythrocyte aggregation associated with pharmaceutical formulations. Human blood samples were suitable for use in these assays because all had ESR₆₀ values that were within normal limits. These samples were diluted 1:4 in the first experiment and diluted 1:8 in the second.

[0100] In the first experiment, erythrocyte sedimentation was enhanced by 5% dextran 70 or BeneFIX® reconstituted with sWFI or 10 mM NaCl. Within 5 minutes, aggregates were visible in the tubes that had been loaded with blood diluted with either 3% dextran 70 or BeneFIX® reconstituted in sWFI. By 60 minutes, erythrocyte sedimentation in these tubes was markedly enhanced when compared with saline control (Table 6). By 90 minutes, blood from one donor that was diluted in BeneFIX® reconstituted in 10 mM NaCl had a two-phase sedimentation pattern with a clear erythrocyte:plasma interface located 8 mm from the zero-mark and another interface between densely packed and less densely packed erythrocytes located 149 mm from the zero mark.

Table 6: Erythrocyte Sedimentation of Human Blood Diluted 1:4 in BeneFIX® or 3% Dextran
(Sedimentation distance in mm measured from zero-mark)

Donor & Dilution Time	Saline	0 mM NaCl	10 mM NaCl	20 mM NaCl	30 mM NaCl	40 mM NaCl	50 mM NaCl	60 mM NaCl	77 mM NaCl	154 mM NaCl	3% Dextran 70
Donor 5											
60 min	2	135	nd	2	2	2	1	1	2	1	132
90 min	3	145	nd	4	3	3	3	2	2	2	159
120 min	4	150	nd	5	4	4	4	3	4	3	167
150min	6	153	nd	7	6	5	5	5	5	5	169
Donor 22											
60 min	0	161	4	3	0	0	0	0	0	nd	145
90 min	3	164	149	3	3	3	2	2	3	nd	166
120min	4	166	151	6	4	4	4	3	4	nd	171
150 min	7	167	152	8	6	5	5	5	6	nd	172

NaCl concentrations are those used to reconstitute BeneFIX®

[0101] In the second experiment, erythrocyte sedimentation was enhanced by 5% dextrose, "MFR-927" (the formulation buffer for BeneFIX® that lacks rFIX), and BeneFIX® reconstituted with 10 mM NaCl (Table 7). Unlike the first experiment, sedimentation in

these tubes was rapid with maximal or nearly maximal sedimentation reached by 15 to 30 minutes.

Table 7: Erythrocyte Sedimentation of Human Blood Diluted 1:8 in MFR-927, BeneFIX® or 5% Dextrose
(Sedimentation distance in mm measured from zero-mark)

Donor & Dilution Time	Saline	MFR-927	10 mM NaCl	25 mM NaCl	30 mM NaCl	40 mM NaCl	50 mM NaCl	60 mM NaCl	77 mM NaCl	5% Dextrose
Donor 56										
15 min	0	>180	~155	1	0	0	0	0	0	175
30 min	0	>180	177	2	1	0	0	0	0	178
45 min	1	>180	180	3	2	1	1	1	1	179
60 min	2	>180	>180	3	2	1	1	1	1	180
Donor 57										
15 min	0	>180	180	1	1	0	0	0	0	179
30 min	1	>180	>180	2	2	1	0	1	1	>180
45 min	1	>180	>180	3	3	1	2	1	1	>180
60 min	2	>180	>180	4	3	2	3	2	2	>180

NaCl concentrations are those used to reconstitute BeneFIX®; MFR-927 is the formulation buffer for BeneFIX® that lacks rFIX.

[0102] The results of these experiments demonstrate that the modified Westergren method used to measure erythrocyte sedimentation can be adapted to assess erythrocyte aggregation induced by pharmaceutical preparations or formulations. For example, measurement of erythrocyte sedimentation in Westergren tubes 60 minutes after loading blood diluted 1:4 with test solutions is sufficient to distinguish between agents that enhance aggregation (*i.e.*, 5% dextrose, 3% dextran 70, MFR-927, and BeneFIX® reconstituted in sWFI) from those that do not (*i.e.*, saline and BeneFIX® reconstituted in diluents containing about 25 mM or more NaCl).

Example 3: Adequacy of 40 mM NaCl in Diluent for Reformulated BeneFIX® to Ameliorate Formulation-Associated Erythrocyte Aggregation

[0103] The non-ionic formulation of currently marketed BeneFIX® has been associated with *in vitro* erythrocyte aggregation, which can occur during administration when patient blood is mixed with BeneFIX® in intravenous tubing. The invention provides the discovery that erythrocyte aggregation is associated with the formulation, not recombinant

Factor IX, and aggregation can be prevented by reconstituting BeneFIX® with diluents that contain at least 40 mM NaCl.

[0104] A goal of this Example is to test the robustness of a 40 mM diluent for reconstituting reformulated BeneFIX® (BeneFIX®-R) preparations. Specifically, experiments were designed to determine whether NaCl concentrations that deviate from 40 mM by as much as 10% are sufficient to prevent formulation-associated erythrocyte aggregation, which was assessed by the adapted, modified Westergren method to measure erythrocyte sedimentation rate (ESR). In addition, the robustness of the NaCl concentration on erythrocyte sedimentation was assessed in both high (*i.e.*, 2000 IU) and low (*i.e.*, 250 IU) dose vials of BeneFIX®-R.

[0105] The effect of BeneFIX®-R formulations, MFR-927, and 3% dextran 70 on erythrocyte sedimentation was measured at room temperature using an adaptation of the modified Westergren method, as described in Example 2. The study design is outlined in Table 8.

Table 8: Study Design for Example 3

Group	Treatment	Number of Experiments	Total Number of Donor Samples Evaluated	Dilution of Blood Evaluated
1	Saline	4	12	1:4
2	MFR-927	4	12	1:4
3	BeneFIX®-R (55 IU/mL); 36 mM NaCl	4	12	1:4
4	BeneFIX®-R (55 IU/mL); 40 mM NaCl	4	12	1:4
5	BeneFIX®-R (55 IU/mL); 44 mM NaCl	4	12	1:4
6	BeneFIX®-R (440 IU/mL); 36 mM NaCl	4	12	1:4
7	BeneFIX®-R (440 IU/mL); 40 mM NaCl	4	12	1:4
8	BeneFIX®-R (440 IU/mL); 44 mM NaCl	4	12	1:4
9	3% Dextran 70	4	12	1:4

[0106] On the day of an experiment, both high (vials of lyophilized BeneFIX®-R containing ~2000 IU rFIX) and low dosage vials of BeneFIX®-R (vials of lyophilized BeneFIX®-R containing ~250 IU rFIX) were reconstituted immediately before use with 5 mL of 36 mM, 40 mM, or 44 mM NaCl. The positive control solution 3% (w/v) dextran 70 was prepared in sterile Dulbecco's modified, calcium- and magnesium-free phosphate-buffered saline (PBS-CMF; pH 7.4). Human blood was obtained from donors and collected

into Vacutainer tubes containing EDTA. Blood samples were used for erythrocyte sedimentation experiments within 3 hours of collection.

[0107] Whole blood was diluted 1:4 in test solutions (*i.e.*, 400 μ L of whole blood was added to 1.2 mL of test solution), mixed well, and then loaded into self-zeroing disposable glass Westergren tubes that were held absolutely vertical in a dedicated custom rack. Erythrocyte sedimentation after 60 minutes, which is the distance in mm from the zero mark at the top of the tube to the plasma-erythrocyte interface, was measured and recorded.

[0108] Results from all 12 donors were similar. Currently marketed BeneFIX® formulation buffer that lacked rFIX (MFR-927) and 3% dextran 70, a standard positive control solution, displayed enhanced erythrocyte sedimentation as compared to blood that had been mixed in NaCl test solutions (*see* Figure 1). Regardless of NaCl concentration in the buffer (36 mM, 40 mM, or 44 mM) or rFIX concentration in the product, BeneFIX®-R did not enhance erythrocyte sedimentation as long as it was reconstituted with a NaCl diluent.

[0109] The results from this study demonstrate that NaCl concentrations 10% higher or lower than 40 mM in the BeneFIX®-R diluents are sufficient to prevent enhanced erythrocyte sedimentation or aggregation (agglutination). Results also show that the ameliorating effect of NaCl on formulation-associated erythrocyte aggregation was not affected by the concentration of the active ingredient (*i.e.*, rFIX).

Example 4: Role of Ionic Strength in the Buffer for Reconstituting BeneFIX® in Causing RBC Agglutination

[0110] Human blood was collected by venipuncture from four different donors into standard heparinized collecting tubes. Formation of RBC agglutinates was tested by drawing up 2.6 mL of buffer or reconstituted BeneFIX® protein into syringes followed by 0.6 mL of heparinized blood. The mixing/sedimentation behavior of the agglutinates was observed in these syringes over time and photographically recorded using a digital camera.

[0111] The composition of the current BeneFIX® formulation pre-lyophilization is rFIX, about 10 mM histidine, about 260 mM glycine, about 1% sucrose, and about 0.005% polysorbate-80, pH 6.8. The BeneFIX® formulation is lyophilized, and prior to injection, reconstituted in sWFI. Originally, the sucrose was suspected to be the cause of agglutination. Hence, test buffers were formulated with 1%, 0.5%, or 0% sucrose. Each sucrose test buffer was drawn up in syringes, followed by a small amount of heparinized blood. The agglutination of RBCs and subsequent rapid sedimentation were found to be identical for the

three buffers, suggesting that the sucrose content of the BeneFIX® formulation did not account for the observed agglutination. BeneFIX® reconstituted in normal saline, rather than in sterile water, caused no agglutination. These data indicate that the ionic strength of the BeneFIX® formulation is not sufficient to prevent agglutination when BeneFIX® is reconstituted in water.

[0112] In order to determine the minimum ionic strength needed to eliminate agglutination, BeneFIX® was reconstituted (or the pre-lyophilization formulation of BeneFIX® can be varied to include sodium chloride, although methods for lyophilizing sodium chloride formulations is more difficult as compared to lyophilizing formulations that do not have sodium chloride) with solutions having varying concentrations of NaCl (0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, and 137 mM). BeneFIX® was also reconstituted in normal saline containing 154 mM NaCl. RBC agglutination and sedimentation behavior was examined in all of these solutions. Table 9 shows the osmolality and ionic strengths (expressed as conductivity) of some of these solutions along with other common intravenous solutions. Upon addition of sodium chloride to the BeneFIX® formulation, whether by straight addition prior to lyophilization or by reconstitution of a lyophilisate with a solution of sodium chloride, the NaCl would be expected to fully dissociate to an equivalent concentration of Na⁺ and Cl⁻ ions. Thus, the ionic strength (expressed in mEq/L (milliequivalents/L) of Na⁺ and Cl⁻) of a formulation buffer plus NaCl would be predicted to be equivalent to the NaCl concentration if the formulation buffer does not contain other ions.

Table 9: Characterization of Various Solutions

Solution	Approximate Calculated Osmolality (mOsm/L)	Approximate Calculated Conductivity (mS/cm)	pH
BeneFIX® formulation	300	0 (observed conductivity is <0.2 mS/cm)	6.8
BeneFIX® formulation + 10 mM NaCl	320	1	6.8
BeneFIX® formulation + 20 mM NaCl	340	2	6.8
BeneFIX® formulation + 40 mM NaCl	380	4	6.8
BeneFIX® formulation + 80 mM NaCl	460	7	6.8
BeneFIX® formulation + 137 mM NaCl	574	12.8	6.8
BeneFIX® formulation + 154 mM NaCl	607	14.4	6.8
0.9% sodium chloride (equivalent to 154 mM NaCl; 154 mEq/L of Na ⁺ and of Cl ⁻ ions)	308	14.4	6.0

Solution	Approximate Calculated Osmolality (mOsm/L)	Approximate Calculated Conductivity (mS/cm)	pH
5% dextrose injection	250	0	4.5

[0113] Upon contact of blood with the solutions in Table 9 in syringes, RBC agglutination was individually observed and then the syringes were gently mixed and inverted to observe blood settling. Agglutinate formation was not observed in all formulations of BeneFIX® reconstituted with at least about 40 mM NaCl (note in the prior Example, about 36 mM NaCl was also sufficient to prevent agglutination). The behavior of blood cells in these solutions containing at least 40 mM NaCl was indistinguishable from that in normal saline.

[0114] Blood sedimentation was tested in a series of syringes containing BeneFIX® formulation diluted (if pre-lyophilization)/reconstituted (if lyophilized) in decreasing concentrations of NaCl (starting at 40 mM) 15 minutes after inversion. There was a consistent concentration-dependent response in terms of agglutinate formation and subsequent speed of sedimentation - increasing agglutination and quicker sedimentation with decreasing concentration of NaCl in the buffer. Obvious agglutination was visible with one blood sample in buffer containing ≤ 25 mM NaCl and with another blood sample in buffer containing ≤ 30 mM NaCl. In all buffer preparations with ≥ 40 mM NaCl, the behavior of blood cells was indistinguishable from that in normal saline or BeneFIX® reconstituted in normal saline. BeneFIX® reconstituted with 40 mM NaCl corresponds to a calculated conductivity of 4 mS/cm.

[0115] The 5% dextrose injection solution, each mL of which contains 50 mg hydrous dextrose USP in water for injection - has a calculated osmolality of 250 mOsm/L and a calculated ionic strength of 0 mS/cm. This solution, which is commonly administered intravenously, also caused RBC agglutination and very rapid blood sedimentation similar to that observed with BeneFIX® formulation reconstituted in water.

[0116] Thus, these results indicate that RBC agglutination caused by BeneFIX® reconstituted in water is due to the BeneFIX® formulation's low ionic strength (0 mEq/L calculated ionic strength, < 0.2 mS/cm measured conductivity). This problem can be corrected by reconstituting in NaCl solutions having ≥ 40 mM NaCl such that the reconstituted solution for injection has a calculated ionic strength of about 40 mEq/L (the sufficient ionic strength to prevent agglutination can also be calculated as a conductivity of about 4 mS/cm or higher) or higher.

WHAT IS CLAIMED:

1. A method for preparing a pharmaceutical formulation for intravenous injection, the method comprising adding an about 25 mM to about 150 mM sodium chloride solution to the pharmaceutical formulation thereby resulting in a formulation prepared for intravenous injection, wherein the prepared formulation is about isotonic with respect to plasma or is slightly hypotonic or slightly hypertonic with respect to plasma, and wherein the prepared formulation has a sufficient ionic strength to prevent erythrocyte agglutination.
2. The method of claim 1, wherein the prepared formulation is about isotonic with respect to plasma and has an osmolarity that is from about 270 mOsm/L to about 330 mOsm/L.
3. The method of claim 1, wherein the prepared formulation is slightly hypotonic with respect to plasma and has an osmolarity that is from about 220 mOsm/L to about 270 mOsm/L.
4. The method of claim 1, wherein the prepared formulation is slightly hypertonic with respect to plasma and has an osmolarity that is from about 330 mOsm/L to about 600 mOsm/L.
5. The method of any one of claims 1 to 4, wherein the prepared formulation has an ionic strength that is at least about 25 mEq/L of Na^+ and Cl^- ions.
6. The method of any one of claims 1 to 4, wherein the prepared formulation has an ionic strength that is at least about 30 mEq/L of Na^+ and Cl^- ions.
7. The method of any one of claims 1 to 4, wherein the prepared formulation has an ionic strength that is at least about 36 mEq/L of Na^+ and Cl^- ions.

8. The method of any one of claims 1 to 4, wherein the prepared formulation has an ionic strength that is at least about 40 mEq/L of Na^+ and Cl^- ions.
9. The method of any one of claims 1 to 4, wherein the prepared formulation has an ionic strength that is at least about 40 mEq/L of Na^+ and Cl^- ions and less than about 150 mEq/L of Na^+ and Cl^- ions.
10. The method of any one of claims 1 to 4, wherein the prepared formulation has an ionic strength as measured in conductivity that is at least 2.5 mS/cm.
11. The method of any one of claims 1 to 4, wherein the prepared formulation has an ionic strength as measured in conductivity that is at least 4.0 mS/cm.
12. The method of any one of claims 1 to 11, wherein the pharmaceutical formulation to be prepared for injection is a lyophilized formulation.
13. The method of any one of claims 1 to 11, wherein the pharmaceutical formulation to be prepared for injection is a solution.
14. The method of any one of claims 1 to 13, wherein the sodium chloride solution is about 40 mM to about 150 mM.
15. The method of any one of claims 1 to 13, wherein the sodium chloride solution is about 36 mM to about 44 mM.
16. The method of any one of claims 1 to 13, wherein the sodium chloride solution is about 40 mM.

17. The method of any one of claims 1 to 16, wherein prior to the addition of the sodium chloride solution, the pharmaceutical formulation does not contain an appreciable amount of an ionizing salt.
18. The method of claim 10, wherein the lyophilized formulation, if reconstituted in water, does not contain more than 5 mM of an ionizing salt.
19. The method of claim 10, wherein the lyophilized formulation, if reconstituted in water, does not contain more than 25 mM of an ionizing salt.
20. The method of any one of claims 1 to 19, wherein prior to the addition of the sodium chloride solution, the pharmaceutical formulation comprises histidine, glycine, sucrose, and polysorbate.
21. The method of any one of claims 1 to 19, wherein prior to the addition of the sodium chloride solution, the pharmaceutical formulation comprises histidine, glycine, sucrose, polysorbate, and a therapeutic protein.
22. The method of any one of claims 1 to 21, wherein prior to the addition of the sodium chloride solution, the pharmaceutical formulation comprises histidine, glycine, sucrose, polysorbate, and Factor IX.
23. The method of any one of claims 1 to 21, wherein prior to the addition of the sodium chloride solution, the pharmaceutical formulation if reconstituted in water comprises:
- (a) from about 5 mM to about 30 mM histidine;
 - (b) from about 0.1M to about 0.3M glycine;
 - (c) from about 0.5 to about 2 percent sucrose; and
 - (d) from about 0.001 to about 0.05 percent polysorbate.

24. The method of claim 23, wherein prior to the addition of the sodium chloride solution, the pharmaceutical formulation if reconstituted in water further comprises:

- (e) from about 50 IU/mL to about 2000 IU/mL of Factor IX.

25. A method for preparing a lyophilized Factor IX formulation for intravenous injection, the method comprising adding an about 25 mM to about 150 mM sodium chloride solution to the lyophilized Factor IX formulation thereby resulting in a formulation prepared for intravenous injection, wherein the prepared formulation is about isotonic with respect to plasma or is slightly hypotonic or slightly hypertonic with respect to plasma, and wherein the prepared formulation has a sufficient ionic strength to prevent erythrocyte agglutination.

26. The method of claim 25, wherein the lyophilized Factor IX formulation if reconstituted in water comprises:

- (a) from about 5 mM to about 30 mM histidine;
- (b) from about 0.1M to about 0.3M glycine;
- (c) from about 0.5 to about 2 percent sucrose; and
- (d) from about 0.001 to about 0.05 percent polysorbate.

27. The method of claim 26, wherein an about 40 mM sodium chloride solution is added to the lyophilized Factor IX formulation.

28. The method of claim 27, wherein about 5 mL of the about 40 mM sodium chloride solution is added to the lyophilized Factor IX formulation.

29. The method of claim 28, wherein the Factor IX formulation has a pre-lyophilization volume of about 4 mL.

30. The method of claim 26, wherein the lyophilized Factor IX formulation if reconstituted in water comprises about 10 mM histidine, 0.26M glycine, 1% sucrose, 0.005% polysorbate, and Factor IX.

31. A pharmaceutical kit comprising:

(a) a vial containing a lyophilized cake, wherein if the lyophilized cake is reconstituted in 5 mL of water the solution would comprise:

- (i) from about 5 mM to about 30 mM histidine;
- (ii) from about 0.1M to about 0.3M glycine;
- (iii) from about 0.5 to about 2 percent sucrose;
- (iv) from about 0.001 to about 0.05 percent polysorbate; and
- (v) from about 50 IU/mL to about 2000 IU/mL of Factor IX;

(b) a 25 mM to about 150 mM sodium chloride solution; and

(c) instructions for reconstituting the lyophilized cake with the sodium chloride solution, such that after reconstitution the resultant solution is about isotonic and has a sufficient ionic strength to prevent erythrocyte aggregation upon intravenous injection.

32. A pharmaceutical kit comprising:

(a) a vial containing a lyophilized cake, wherein if the lyophilized cake is reconstituted in 4 mL of water the solution would comprise:

- (i) about 10 mM histidine;
- (ii) about 0.26M glycine;
- (iii) about 1 percent sucrose;
- (iv) about 0.005 percent polysorbate 80; and
- (v) from about 50 IU/mL to about 2000 IU/mL of Factor IX;

(b) an about 40 mM sodium chloride solution; and

(c) instructions for reconstituting the lyophilized cake in the vial with about 5 mL sodium chloride solution, such that after reconstitution the resultant solution comprises:

- (i) from about 7 to about 9 mM histidine;
- (ii) from about 200 to about 210 mM glycine;
- (iii) from about 0.7% to about 0.9% sucrose;
- (iv) from about 0.004% polysorbate 80;
- (v) from about 50 IU/mL to about 2000 IU/mL of Factor IX; and
- (vi) about 40 mM NaCl.

33. A lyophilized cake, wherein if the lyophilized cake is reconstituted in 5 mL of water the solution would comprise:

- (i) from about 5 mM to about 30 mM histidine;
- (ii) from about 0.1M to about 0.3M glycine;
- (iii) from about 0.5 to about 2 percent sucrose;
- (iv) from about 0.001 to about 0.05 percent polysorbate; and
- (v) from about 50 IU/mL to about 2000 IU/mL of Factor IX.

34. A lyophilized cake, wherein if the lyophilized cake is reconstituted in 4 mL of water the solution would comprise:

- (i) about 10 mM histidine;
- (ii) about 0.26M glycine;
- (iii) about 1 percent sucrose;
- (iv) about 0.005 percent polysorbate 80; and
- (v) from about 50 IU/mL to about 2000 IU/mL of Factor IX.

35. A vial containing a lyophilized cake, wherein if the lyophilized cake is reconstituted in 5 mL of water the solution would comprise:

- (i) from about 5 mM to about 30 mM histidine;
- (ii) from about 0.1M to about 0.3M glycine;

- (iii) from about 0.5 to about 2 percent sucrose;
- (iv) from about 0.001 to about 0.05 percent polysorbate; and
- (v) from about 50 IU/mL to about 2000 IU/mL of Factor IX.

36. A vial containing a lyophilized cake, wherein if the lyophilized cake is reconstituted in

4 mL of water the solution would comprise:

- (i) about 10 mM histidine;
- (ii) about 0.26M glycine;
- (iii) about 1 percent sucrose;
- (iv) about 0.005 percent polysorbate 80; and
- (v) from about 50 IU/mL to about 2000 IU/mL of Factor IX.

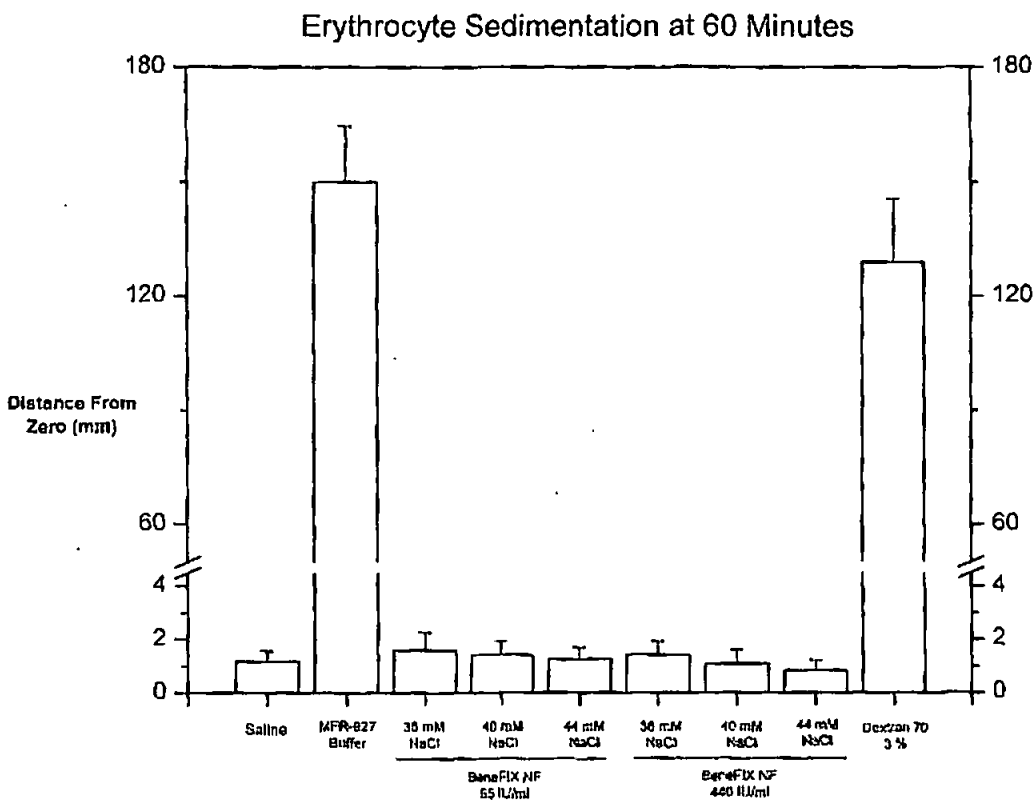


FIG. 1

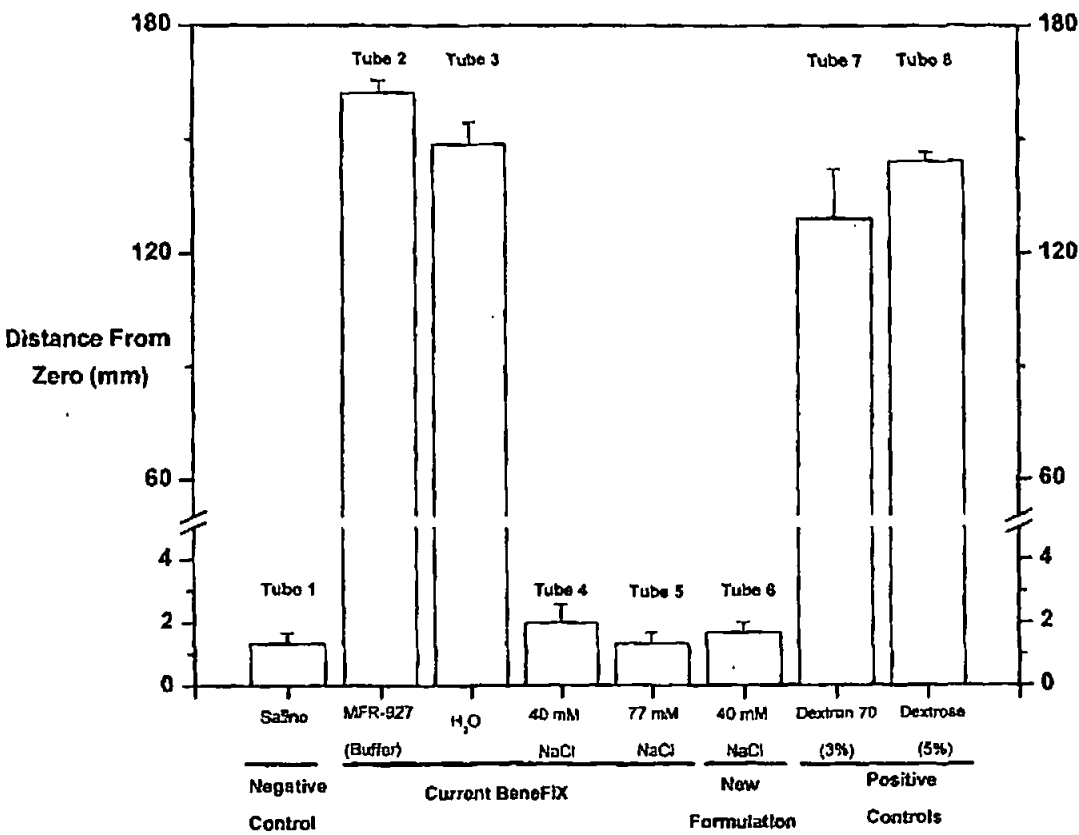


FIG. 2

SOLUCION DE CLORURO DE SODIO PARA RECONSTITUCION O DILUCION
DE FARMACO

Esta solicitud reivindica prioridad al No. De serie de
5 EUA 60/732/221, presentada en Noviembre 1, 2005, la cual está
incorporada por este medio por referencia en su totalidad.

Todas las patentes, solicitudes de patentes y
publicaciones citadas en la presente están incorporadas por
este medio por referencia en su totalidad. Las descripciones
10 estas publicaciones en su totalidad están incorporadas por
este medio por referencia en esta solicitud con el propósito
de describir más completamente el estado de la técnica
conocida como se sabe para aquellos expertos en ello en
cuanto a la fecha de la invención descrita y reivindicada en
15 la presente.

Una porción de la descripción de este documento de
patente contiene material que está sujeto a protección por
derechos de autor. El propietario de los derechos no ha
tenido objeción para la reproducción por facsímil ya sea del
20 documento de patente o de la descripción de la patente, como
aparece en los archivos o registros de la Oficina de Patentes
y Marcas, pero sin embargo se reserva todos los derechos de
autor cualquiera que resulten.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Cuando toda la sangre se mezcla con una solución de fármaco, tal como en la línea intravenosa (IV) durante administración de un fármaco inyectable IV, puede ocurrir en la agregación o aglutinación de eritrocitos (también llamado aglutinación de células de glóbulos rojos) si la solución de fármaco no contiene suficiente fuerza iónica. La aglutinación de eritrocitos ocurre, por ejemplo, con 5% de dextrosa en agua (una solución parenteral de volumen grande común) y con muchos productos farmacéuticos que tienen baja fuerza iónica.

Los productos farmacéuticos a menudo se liofilizan, y por lo tanto necesitan ser reconstituidos con una solución antes de inyección parenteral. Sin embargo, cuando los productos liofilizados se reconstituyen con soluciones de fuerza iónica baja, la preparación resultante también puede provocar aglutinación de eritrocitos. Aunque la reconstitución de tortas liofilizadas con solución salina normal (0.9% NaCl) cuando se opone al agua estéril para inyección (SWFI por sus siglas en inglés) podría proporcionar fuerza iónica adicional, la solución de fármaco que resulta puede ser hipertónica y podría tener efectos colaterales indeseables en la inyección.

Así, permanece una necesidad de una solución que se pueda usar para reconstituir las tortas liofilizadas o para

diluir soluciones farmacéuticas para proporcionar una preparación resultante para inyección que sea isotónica con respecto al plasma y tenga suficiente fuerza iónica tal que no provoque aglutinación de eritrocitos.

5

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La invención proporciona el descubrimiento de que la aglutinación de eritrocitos se provoca por soluciones de baja
10 fuerza iónica que se ponen en contacto con la sangre. Así, cuando las formulaciones farmacéuticas se preparan para inyección intravenosa por reconstitución o dilución en soluciones de baja fuerza iónica tales como dextrosa al 5%, dextrano al 3%, o SWFI, las preparaciones resultantes pueden
15 tener el requisito de osmolaridad para ser casi isotónicas con respecto a la sangre, pero a menudo no tienen una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación. Por otra parte, cuando las formulaciones farmacéuticas se preparan para inyección intravenosa por reconstitución o dilución con
20 soluciones de fuerza iónica alta tales como solución salina (0.9% de NaCl o NaCl 154 mM), la preparación resultante puede tener una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación, pero puede poseer una osmolaridad que es hiperiónica con respecto a la sangre, provocando de esa
25 manera hidratación de células de glóbulos rojos (RBC),

inflamación venosa, y/o posiblemente tromboflebitis si las inyecciones repetidas son frecuentes o crónicas.

En un aspecto, la invención proporciona un método para la preparación de una formulación farmacéutica para inyección intravenosa, el método comprende la adición de una solución de cloruro de sodio desde alrededor de 25 mM hasta alrededor de 150 mM a la formulación farmacéutica que resulta de esa manera en una formulación preparada para inyección intravenosa, en donde la formulación preparada es isotónica con respecto al plasma o es ligeramente hipotónica o ligeramente hipertónica con respecto al plasma, y en donde la formulación preparada tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de eritrocitos (o agregación de eritrocitos).

La formulación preparada es casi isotónica con respecto al plasma, por ejemplo, cuando tiene una osmolaridad que es desde alrededor de 270 mOsm/L hasta alrededor de 330 mOsm/L. La formulación preparada es ligeramente hipotónica con respecto al plasma, por ejemplo, cuando tiene una osmolaridad que es desde alrededor de 220 mOsm/L hasta alrededor de 270 mOsm/L. La formulación preparada es ligeramente hipertónica con respecto al plasma, por ejemplo, cuando tiene una osmolaridad que es desde alrededor de 330 mOsm/L hasta alrededor de 600 mOsm/L.

En un aspecto, la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es suficiente para prevenir la aglutinación de eritrocitos cuando, por ejemplo, tiene por lo menos alrededor de 25 mEq/L de iones de Na^+ y Cl^- . En otro aspecto, la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es suficiente para prevenir la aglutinación de eritrocitos cuando, por ejemplo, tiene por lo menos alrededor de 40 mEq/L de iones de Na^+ y Cl^- . En otro aspecto, la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es suficiente para prevenir la aglutinación de eritrocitos cuando, por ejemplo, esta tiene por lo menos alrededor de 40 mEq/L de iones de Na^+ y Cl^- y menos que alrededor de 150 mEq/L de iones de Na^+ y Cl^- . En otro aspecto, la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es suficiente para prevenir la aglutinación de eritrocitos cuando esta tiene, por ejemplo, una fuerza iónica medida en conductividad que es menos que 2.5 mS/cm. En otro aspecto, la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es suficiente para prevenir la aglutinación de eritrocitos cuando, por ejemplo, tiene una fuerza iónica medida en conductividad que es por lo menos alrededor de 4.0 mS/cm.

La formulación farmacéutica para ser preparada para inyección puede ser, por ejemplo, una formulación no líquida o una formulación de solución. Una formulación no líquida por lo tanto puede ser reconstituida en solución por una solución de cloruro de sodio que tiene una concentración de cloruro de

sodio de alrededor de 25-150 mM, 25-100 mM, 25-80 mM, 25-40 mM, 25-35 mM, 25-30 mM, o alrededor de 40 mM. Un líquido o una formulación en solución por lo tanto se puede diluir mediante una solución de cloruro de sodio que tiene una
5 concentración de cloruro de sodio de alrededor de 25-150 mM, 25-100 mM, 25-80 mM, 25-40 mM, 25-35 mM, 25-30 mM, o alrededor de 40 mM. Una formulación no líquida puede ser, por ejemplo, una formulación liofilizada.

En un aspecto, la solución de cloruro de sodio que se
10 agrega comprende desde alrededor de 40 mM hasta alrededor de 150 mM de cloruro de sodio. En un aspecto, la solución de cloruro de sodio que se agrega esencialmente consiste de desde alrededor de 40 mM hasta alrededor de 150 mM de cloruro de sodio. En un aspecto la solución de cloruro de sodio que
15 se agrega comprende alrededor de 40 mM de cloruro de sodio. En un aspecto, la solución de cloruro de sodio que se agrega consiste esencialmente de una solución de 40 mM de cloruro de sodio. En un aspecto, la solución de cloruro de sodio que se agregó consiste esencialmente de una solución que tiene una
20 solución de cloruro de sodio que es alrededor de $40 \text{ mM} \pm 10 \text{ mM}$ de cloruro de sodio.

En un aspecto, en donde antes de la adición de la solución de cloruro de sodio, la formulación farmacéutica no contiene una cantidad apreciable de una sal de ionización.
25 Una cantidad apreciable de una sal de ionización puede ser,

por ejemplo, una cantidad que es mayor que alrededor de 5 mM. En otro aspecto, una cantidad apreciable de una sal de ionización puede ser, por ejemplo, una cantidad que es mayor que alrededor de 25 mM. Si la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, no contiene una cantidad apreciable de una sal de ionización si esta no contiene más que, por ejemplo, 5 mM o 25 mM de una sal de ionización cuando la formulación liofilizada se reconstituye en agua.

En un aspecto, en donde antes de la adición de la solución de cloruro de sodio, la formulación farmacéutica comprende histidina, glicina, sacarosa, y polisorbato. En otro aspecto, en donde antes de la adición de la solución de cloruro de sodio, la formulación farmacéutica comprende histidina, glicina, sacarosa, polisorbato, y una proteína terapéutica. En la presente, una proteína terapéutica puede ser, por ejemplo, una proteína usada para tratar trastornos de coagulación o para hemostasis, que incluye pero no se limita a Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor XIII, anticuerpos, relacionados análogos de estos, y derivados de estos. En un aspecto, en donde antes de la adición de la solución de cloruro de sodio, la formulación farmacéutica comprende histidina, glicina, sacarosa, polisorbato, y Factor IX (que incluye el Factor IX (rFIX) recombinante). Como se usa en la presente, el Factor IX puede incluir versiones modificadas del Factor IX, que incluyen por ejemplo, Factor

IX PEGilado, fusiones de proteína que comprenden Factor IX tal como albúmina-Factor IX o inmunoglobulina (completa o dominios de esta)-Factor IX, y Factor IX glicosilado.

En un aspecto, en donde la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, antes de la adición de la solución de cloruro de sodio, la formulación, medida como si estuviera reconstituida en agua (en un volumen que es el mismo como el volumen relleno, esto es, el volumen de la formulación antes de liofilización), comprende: (a) desde alrededor de 5 mM hasta alrededor de 30 mM de histidina; (b) desde alrededor de 0.1M hasta alrededor de 0.3M de glicina; (c) desde alrededor de 0.5 hasta alrededor de 2 por ciento de sacarosa; y (d) desde alrededor de 0.001 hasta alrededor de 0.05 por ciento de polisorbato (o desde alrededor de 0.005 hasta alrededor de 0.05 por ciento). En un aspecto, la formulación además puede comprender, medido si fuera reconstituido en agua, (e) desde alrededor de 0.1 mg/mL hasta alrededor de 100 mg/mL o más de una proteína terapéutica, o desde alrededor de 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000 IU/mL (unidades internacionales/mL) o más de una proteína terapéutica. En un aspecto, la formulación además puede comprender, medido si fuera reconstituido en agua, (e) desde alrededor de 0.1 mg/mL hasta alrededor de 100 mg/mL o más del Factor IX, o desde alrededor de 0.4 mg/mL hasta alrededor de 20 mg/mL de Factor IX, o desde alrededor de 10,

50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000 IU/mL (unidades internacionales/mL) o más del Factor IX.

En un aspecto, la invención proporciona un método para la prevención de aglutinación de eritrocitos provocado por
5 inyección intravenosa, el método comprende la reconstitución o dilución de una formulación farmacéutica con una solución de cloruro de sodio desde alrededor de 25 mM hasta alrededor de 150 mM tal que la formulación farmacéutica reconstituida o
10 aglutinación de eritrocitos cuando la formulación farmacéutica reconstituida o diluida se administra a un sujeto por inyección intravenosa.

En un aspecto, la invención proporciona un método de preparación de una formulación farmacéutica para inyección
15 intravenosa, el método que comprende la reconstitución de la formulación farmacéutica liofilizada con una solución de cloruro de sodio desde alrededor de 25 mM hasta alrededor de 150 mM tal que después de reconstitución, la formulación tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la
20 aglutinación de eritrocitos y una osmolaridad que es casi isotónica (o ligeramente hipertónica o ligeramente hipotónica).

En un aspecto, la formulación liofilizada se reconstituye con la solución de cloruro de sodio, en donde el
25 volumen de la solución de cloruro de sodio usado para

con 5 mL de una solución de NaCl 40 mM, entonces la solución que resulta es alrededor de 8 mM (8 mOsm/L) histidina, 208 mM (208 mOsm/L) de glicina, 0.8% (24 mOsm/L) de sacarosa, 0.004% (osmolaridad insignificante) de polisorbato, y 40 mM (80 mOsm/L) NaCl, la cual es alrededor de 320 mOsm/L. Así, por reconstitución de una formulación previa liofilización que es casi isotónica con un volumen de solución de cloruro de sodio que es mayor que el volumen lleno, la invención puede proporcionar una solución que resulta que es todavía cerca de isotónica. En otras palabras, la reconstitución de una formulación previa liofilización que es casi isotónica con un volumen de solución de cloruro de sodio que es menor que o alrededor del mismo volumen de llenado puede resultar en una solución que es ligeramente hipertónica. Para evitar esto, la invención proporciona un método para mantener la isotonicidad por reconstitución de una formulación liofilizada con una solución de cloruro de sodio en un volumen que es mayor que el volumen de la formulación previa liofilización.

En un aspecto, la invención proporciona un método para mantener la isotonicidad de una formulación liofilizada después de reconstitución, el método comprende la reconstitución de una formulación liofilizada en un volumen que es por lo menos 20% mayor que el volumen de la formulación previa liofilización, en donde la formulación previa liofilización es casi isotónica, tal que la

5 hasta alrededor de 150 mM a la formulación de Factor IX liofilizada resultando de esa manera en una formulación preparada para inyección intravenosa, en donde la formulación preparada es casi isotónica con respecto al plasma o es ligeramente hipotónica o ligeramente hipertónica con respecto al plasma, y en donde la formulación preparada tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de eritrocitos. En un aspecto, la formulación de Factor IX liofilizada, cuando se mide como si se reconstituye en agua, 10 comprende (a) desde alrededor de 5 mM hasta alrededor de 30 mM de histidina; (b) desde alrededor de 0.1M hasta alrededor de 0.3M de glicina; (c) desde alrededor de 0.5 hasta alrededor de 2 por ciento de sacarosa; (d) desde alrededor de 0.001 hasta alrededor de 0.05 por ciento de polisorbato; y 15 (e) desde alrededor de 0.4 mg/mL hasta alrededor de 20 mg/mL de Factor IX, o desde alrededor de 0.1 mg/mL hasta alrededor de 100 mg/mL o alguna otra cantidad soluble del Factor IX, o desde alrededor de 10 IU/mL hasta alrededor de 500 IU/mL de Factor IX, o desde alrededor de 10 IU/mL hasta alrededor de 20 500 IU/mL de Factor IX. En un aspecto, una solución de cloruro de sodio de alrededor de 40 mM se agrega a la formulación de Factor IX liofilizada. En un aspecto, alrededor de 5 mL de la solución de cloruro de sodio de alrededor de 40 mM se agrega a la formulación de Factor IX 25 liofilizada. En un aspecto, la formulación de Factor IX

En un aspecto, la invención proporciona un kit farmacéutico que comprende: (a) un frasco que contiene una torta liofilizada, en donde si la torta liofilizada se reconstituye en 4 mL de agua la solución podría comprender:

5 (i) alrededor de 10 mM de histidina; (ii) alrededor de 0.26M de glicina; (iii) alrededor de 1 por ciento de sacarosa; (iv) alrededor de 0.005 por ciento de polisorbato 80; y (v) desde alrededor de 50 IU/mL hasta alrededor de 5000 IU/mL de Factor IX; (b) una solución de cloruro de sodio de alrededor de 40

10 mM; y (c) instrucciones para la reconstitución de la torta liofilizada en el frasco con alrededor de 5 mL de una solución de cloruro de sodio alrededor de 40 mM, tal que después de la reconstitución la solución resultante comprende: (i) desde alrededor de 7 u 8 hasta alrededor de 10

15 mM de histidina; (ii) desde alrededor de 200 hasta alrededor de 210 mM de glicina; (iii) desde alrededor de 0.7% hasta alrededor de 0.9% por ciento de sacarosa; (iv) alrededor de 0.004% de polisorbato 80; (v) desde alrededor de 50 IU/mL hasta alrededor de 5000 IU/mL de Factor IX; y (vi) alrededor

20 de 40 mM de NaCl.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra resultados de sedimentación de

25 eritrocitos a partir de experimentos descritos en el Ejemplo

3. La sedimentación de eritrocitos se midió a 60 minutos usando una adaptación del método Westergren modificado (ver Ejemplo 2), en el cual la sangre humana recolectada en EDTA se mezcló 1:4 con soluciones de prueba. Después de 60 minutos, se midió la distancia en mm entre la marca cero y la interfase de eritrocito:plasma. Las barras horizontales representan el promedio y los corchetes verticales la desviación estándar de un total de 12 donadores. Los resultados se combinaron de 4 experimentos independientes cada uno de los cuales evaluó sangre de 3 donadores.

La Figura 2 muestra una evaluación de sedimentación de eritrocitos en formulaciones BeneFIX® reconstituídas con soluciones de NaCl. Una solución de 40 mM de NaCl es suficiente para prevenir la aglutinación de eritrocitos cuando se usa para reconstituir ya sea el producto BeneFIX® comercializado comúnmente o una nueva formulación de BeneFIX® (BeneFIX®-R donde antes de la liofilización la solución llena comprende de 4 mL y tuvo concentraciones de 10 mM de histidina, 260 mM de glicina, 1% de sacarosa, 0.005% de polisorbato 80; y después la liofilización fue reconstituída en 5 mL de 40 mM de cloruro de sodio tal que después de reconstitución de BeneFIX®-R comprende 40 mM de NaCl, 8 mM de histidina, 208 mM de glicina, 0.8% de sacarosa, y 0.004% de polisorbato).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona métodos para la preparación de
5 formulaciones farmacéuticas para inyección (en particular, preparaciones preparadas para inyección intravenosa) que no provocan aglutinación de eritrocitos, hemólisis, y/o contracción de la célula. Para prevenir la aglutinación, una formulación farmacéutica lista para inyección necesita tener
10 suficiente fuerza iónica. Para prevenir hemólisis o contracción de la célula, una formulación farmacéutica lista para inyección necesita ser casi isotónica con respecto al plasma. La invención proporciona métodos que preparan formulaciones farmacéuticas para inyección que tienen tanto
15 la fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación como la tonicidad requerida para prevenir hemólisis significativa o deshidratación o contracción de célula. Los métodos presentes involucran el uso de soluciones de cloruro de sodio que son alrededor de 25 mM hasta alrededor de 150 mM
20 para reconstitución de tortas liofilizadas (u otras formulaciones farmacéuticas no líquidas) en solución o para soluciones de formulación farmacéutica de dilución. Si las soluciones de cloruro de sodio se usan para reconstitución o para dilución, la adición de soluciones de cloruro de sodio
25 particulares resulta en una preparación farmacéutica para

inyección que es casi isotónica con respecto al plasma o a la sangre y es de fuerza iónica suficiente para prevenir la agregación de eritrocitos en la inyección, en particular en inyección intravenosa.

5

Términos.

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

10

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

15

Como se usa en la presente, una "osmol" es la cantidad de una sustancia que produce, en solución ideal, ese número de partículas (número de Avogadro) que podría reducir el punto de congelamiento del solvente por 1.86K.

20

Como se usa en la presente, la "osmolalidad" de una solución es el número de osmoles de soluto por kilogramo de solvente. La osmolalidad es una medición del número de partículas presentes en solución y es independiente del tamaño o peso de las partículas. Se puede medir solamente por uso de una propiedad de la solución que es dependiente solamente de la concentración de partícula. Estas propiedades son disminución de la presión de vapor, disminución del punto de congelamiento, elevación del punto de ebullición, y

25

presión osmótica, y se refieren colectivamente como propiedades coligativas.

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

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

15

Fuerza Iónica

La fuerza iónica es una característica de una solución de electrolito (un líquido con iones cargados positiva y negativamente disueltos en esta). Comúnmente se expresa como
20 las interacciones electrostáticas promedio entre unos iones de electrolito. Una fuerza iónica de electrolito es la mitad del total obtenido por la multiplicación de la molaridad (la cantidad de la sustancia por unidad de masa de solvente) de cada ión por el cuadrado de su valencia.

La fuerza iónica está cercanamente relacionada a la concentración de electrolitos e indica qué tan efectivamente la carga en un ión particular está protegida o estabilizada por otros iones (la así llamada atmósfera iónica) en un electrolito. La principal diferencia entre fuerza iónica y concentración de electrolito es que la anterior es mayor si alguno de los iones se cargan más altamente. Por ejemplo, una solución de sulfato de magnesio ($Mg^{2+}SO_4^{2-}$) completamente disociada (fragmentada) tiene 4 veces mayor fuerza iónica que una solución de cloruro de sodio (Na^+Cl^-) de la misma concentración. Otra diferencia entre las dos es que la fuerza iónica refleja la concentración de iones libres, y no solo de cuánta sal se agrega a una solución. Algunas veces una sal se puede disolver pero los iones respectivos todavía están unidos juntos en forma de pares, pareciendo moléculas no cargadas en solución. En este caso la fuerza iónica es mucho mayor que la concentración de sal.

Para la invención, las preparaciones farmacéuticas se preparan para inyección tal que no son solamente isotónicas, sino también tienen una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de RBC. Una fuerza iónica suficiente de una preparación lista para inyección (esto es, una torta liofilizada que se reconstituye con una solución de NaCl de la invención, o una solución de fármaco que se diluye con una solución de NaCl de la invención) puede tener, por ejemplo,

65

por lo menos alrededor de 25 miliequivalentes por litro (mEq/L) de iones Na^+ y Cl^- . En una modalidad, una fuerza iónica suficiente es por lo menos alrededor de 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 37, 38, 39, o por lo menos alrededor de 40
5 mEq/L de iones Na^+ y Cl^- .

La fuerza iónica también se puede describir en términos de la conductividad de una solución. La conductividad es la capacidad de un material o solución para conducir corriente eléctrica. El principio por el cual los instrumentos miden la
10 conductividad es simple - se colocan dos placas en la muestra, se aplica un potencial a través de las placas (normalmente un voltaje de onda de seno), y se mide la corriente. La conductividad (G), el inverso de la resistividad (R) se determina del voltaje y los valores de
15 corriente de acuerdo con la ley de Ohm. $G = I/R = I$ (amperios) / E (voltios).

Puesto que la carga en iones en solución facilita la conductancia de la corriente eléctrica, la conductividad de una solución es proporcional a su concentración de ión. En
20 algunas situaciones, sin embargo, la conductividad puede no correlacionarse directamente con la concentración. Sin embargo, para soluciones de cloruro de sodio, la conductividad es directamente proporcional a la concentración del ión. La unidad básica de la conductividad son los siemens
25 (S), anteriormente llamados los mho. Puesto que la geometría

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

Así, en una modalidad, una fuerza iónica suficiente de una preparación lista para inyección puede tener, por ejemplo, por lo menos alrededor de una conductividad de alrededor de 4 mS/cm o mayor. En otra modalidad, la fuerza iónica suficiente de una solución lista para inyección es por lo menos alrededor de 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, o por lo menos alrededor de 3.9 mS/cm.

Una definición operacional de si una solución tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de eritrocitos también se puede usar para explicar el término "fuerza iónica suficiente". Por ejemplo, esta puede estar

68

basada en un experimento de adición de una solución de prueba a sangre completa y observar la distancia de la sedimentación de eritrocitos (ver Ejemplo 2; método Westergren modificado adaptado). En una modalidad, si una solución de prueba cuando se mezcla con sangre completa en una relación de 4:1 proporciona una sedimentación de eritrocitos en 60 minutos que es menor que alrededor de 10 mm (ver Ejemplo 2, Figura 1 y 2, por ejemplo), entonces la solución de prueba tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de eritrocitos. En una modalidad, si una solución de prueba cuando se mezcla con sangre completa en una relación de 4:1 proporciona una sedimentación de eritrocitos en 60 minutos que es menor que alrededor de 5 mm, entonces la solución de prueba tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de eritrocitos.

Osmolaridad de Solución

Los métodos de la invención proporcionan preparaciones farmacéuticas para inyección que son casi isotónicas con respecto a la sangre. Para determinar si una preparación farmacéutica es casi isotónica con respecto a la sangre, uno calcula la osmolaridad para todos los componentes químicos de una solución que incluyen el diluyente. La concentración osmolar de preparaciones farmacéuticas para inyección (soluciones parenterales) puede ejercer efectos adversos en

las células de la sangre y vasos sanguíneos del cuerpo humano. La tonicidad se puede calcular para fluidos y medicamentos disueltos o diluidos, la cual se expresa en un valor numérico de miliosmoles por litro de fluido (mOsm/L).

- 5 Este valor también se conoce como osmolaridad. La osmolaridad de la sangre está en el intervalo entre 285 y 310 mOsm/L. Cuando las soluciones hipotónicas o hipertónicas se inyectan en la sangre, el fluido cambia dentro o fuera de las células, lo cual puede provocar una variedad de efectos negativos.

- 10 La osmolaridad de la solución se basa en parte en los conceptos de ósmosis y presión osmótica. La ósmosis es la difusión de solutos (partículas disueltas) o la transferencia de fluido a través de membranas semipermeables tal como vasos sanguíneos o membranas de células. La presión osmótica, la
15 cual facilita el transporte de moléculas a través de membranas, se expresa en concentraciones osmolares y se refiere a hipo-osmótico (hipotónico), iso-osmótico (isotónico), o hiper-osmótico (hipertónico) cuando se compara con fluidos biológicos tales como sangre o plasma. El término
20 "tonicidad" y "presión osmótica" a menudo se considera que son sinónimos.

- La presión osmótica es la presión hidrostática (o hidráulica) requerida para oponer el movimiento del agua a través de una membrana semipermeable en respuesta a un
25 "gradiente osmótico" (esto es, concentraciones de partículas

diferentes en los dos lados de la membrana). La osmolalidad del suero se puede medir por el uso de un osmómetro o se puede calcular como la suma de las concentraciones de los solutos presentes en la solución. El valor medido en el laboratorio usualmente se refiere como la osmolalidad. El valor calculado de las concentraciones de soluto se reporta por el laboratorio como la osmolaridad. La brecha osmolar es la diferencia entre estos dos valores.

En la presente, la tonicidad y presión osmótica se considerarán como sinónimos, y para entenderse ampliamente. La tonicidad puede medir la osmolalidad efectiva y es igual a la suma de las concentraciones de los solutos en una solución que tiene la capacidad para ejercer una fuerza osmótica a través de una membrana, que incluye una membrana de célula. En el sentido estricto, la osmolalidad es una propiedad de una solución particular y es independiente de cualquier membrana. La tonicidad es una propiedad de una solución en referencia a una membrana particular. Sin embargo, la invención se referirá a soluciones que son isotónicas con respecto a soluciones biológicas tales como sangre o plasma, y esta referencia debe incluir el significado de que la solución particular es isotónica con sangre o plasma con respecto a una membrana de una célula en la sangre o plasma u otra solución biológica.

Se puede usar una definición operacional de tonicidad para explicar el término. Esta se puede basar en un experimento de adición de una solución de prueba para sangre completa y observación del resultado. Si las RBC en la sangre completa se hinchan y rompen, la solución de prueba es tal que es hipotónica comparada con plasma normal. Si las RBC se contraen y se vuelven hendidas, la solución de prueba es tal que es hipertónica comparada con el plasma normal. Si las RBC permaneces siendo las mismas, la solución de prueba es tal que es isotónica con plasma. La membrana de célula RBC es la membrana de referencia. Por ejemplo, la sangre completa colocada en la solución salina normal (esto es, 0.9% de cloruro de sodio) no aumentará, y de ahí la solución salina normal es tal que es isotónica.

15

Características de Soluciones Isotónicas.

La invención proporciona métodos para la preparación o alistamiento de formulaciones farmacéuticas para inyección en un sujeto, en donde las formulaciones se preparan en soluciones que son (1) casi isotónicas con respecto a la sangre (o plasma u otro fluido biológico) o no son tan hipertónicas o hipotónicas como para provocar hemólisis, trombosis, o irritación de vasos sanguíneos significativas, y (2) tienen fuerza iónica suficiente para prevenir la agregación de eritrocitos.

25

En una modalidad, las formulaciones farmacéuticas isotónicas (con respecto a la sangre) listas para inyección tienen una tonicidad u osmolaridad que es mayor que alrededor de 270 mOsm/L y menos que alrededor de 330 mOsm/l. En una
5 modalidad, las formulaciones farmacéuticas isotónicas listas para inyección tienen una tonicidad u osmolaridad que es mayor que alrededor de 270 mOsm/L y menor que alrededor de 328 mOsm/L.

Aunque las soluciones tales como cloruro de sodio 0.9% y
10 dextrosa 5% son isotónicas, cuando se usan para reconstituir o diluir muchas formulaciones farmacéuticas, la solución resultante puede no tener suficiente fuerza iónica para prevenir la aglutinación de eritrocitos (como para la dextrosa 5%) o puede tener tanta fuerza iónica tal que la solución resultante es hipertónica. Así, los métodos de la invención usan soluciones para dilución o reconstitución que contienen una concentración mínima de cloruro de sodio para proporcionar (a) una fuerza iónica suficiente para mitigar la
15 aglutinación de eritrocitos, y (b) una tonicidad suficiente para prevenir hemólisis, y una concentración máxima de cloruro de sodio para prevenir (c) una tonicidad resultante que es tan grande como para ser soluciones hipertónicas. Los métodos de la invención usan soluciones para dilución o reconstitución que pueden proporcionar una fuerza iónica suficiente e isotonicidad con respecto a la sangre,

mientras que también mantienen un volumen de inyección parcial para la preparación farmacéutica.

Características de las Soluciones Hipotónicas.

- 5 La invención proporciona métodos para la preparación de formulaciones farmacéuticas para inyección en un sujeto, en donde las formulaciones se preparan en soluciones que no son hipotónicas con respecto a la sangre o no son tan hipotónicas (esto es, ligeramente hipotónicas con respecto a la sangre)
- 10 como para provocar hemólisis significativa. En una modalidad, las formulaciones farmacéuticas listas para inyección que se consideran ligeramente hipotónicas con respecto a la sangre pueden tener una tonicidad u osmolaridad que es menor que alrededor de 270 mOsm/L y mayor que alrededor de 240 mOsm/L.
- 15 En una modalidad, las formulaciones farmacéuticas listas para inyección que se consideran ligeramente hipotónicas con respecto a la sangre pueden tener una tonicidad u osmolaridad que es menor que alrededor de 270 mOsm/L y mayor que alrededor de 220 mOsm/L.
- 20 Ejemplos de soluciones hipotónicas incluyen muchas preparaciones farmacéuticas que se preparan para inyección con agua estéril. Cuando las soluciones hipotónicas se inyectan, ocurre un cambio de fluido y el agua se mueve en las células endoteliales de la vena y las células de la
- 25 sangre. Las células que absorben mucha agua pueden

reventarse, y así, la inyección de soluciones hipotónicas puede provocar irritación de vena, flebitis, y hemólisis.

Características de Soluciones Hipertónicas.

- 5 La invención proporciona métodos para la preparación de preparaciones farmacéuticas para inyección en un sujeto, en donde las preparaciones se hacen en soluciones que no son hipertónicas con respecto a la sangre o no son hipertónicas (esto es, ligeramente hipertónicas) como para provocar
- 10 trombosis significativa y/o irritación de vasos sanguíneos. En una modalidad, las formulaciones farmacéuticas listas para inyección que se consideran ser ligeramente hipertónicas pueden tener una tonicidad u osmolaridad que es mayor que alrededor de 340 mOsm/L y menor que alrededor de 600 mOsm/L.
- 15 En una modalidad, las formulaciones farmacéuticas listas para inyección que se consideran ser ligeramente hipertónicas pueden tener una tonicidad u osmolaridad que es mayor que alrededor de 340 y menor que alrededor de 375, 400, 425, 450, 475, 500, o alrededor de 575 mOsm/L. En general, las
- 20 soluciones hipertónicas exhiben una tonicidad que es mayor que alrededor de 340 mOsm/L. Las soluciones con una osmolaridad que es mayor que alrededor de 600 mOsm/l se deben usar con cuidado en inyecciones.

Ejemplos de soluciones hipertónicas indeseables incluyen

25 muchas formulaciones farmacéuticas que se preparan para

inyección con dextrosa al 10%, o preparaciones farmacéuticas que tienen aditivos múltiples que afectan la osmolaridad. Cuando las soluciones hipertónicas se inyectan, ocurre un cambio en el fluido y el agua escapa hacia afuera de las células endoteliales de la vena y de las células de la sangre. Las células que pierden mucha agua pueden contraerse, y así, la inyección de soluciones hipertónicas puede provocar irritación de vena, flebitis, y trombosis.

10 pH

El pH de la sangre está en el intervalo desde alrededor de 7.35 hasta alrededor de 7.45, el cual se considera neutral. Las preparaciones farmacéuticas con un valor de pH debajo de 7 se consideran fármacos ácidos y aquellos con un valor de pH debajo de 4.1 se consideran muy ácidos. Los fármacos con un valor de pH mayor que 7.5 se consideran fármacos básicos o alcalinos, y aquellos con un valor de pH mayor que 9.0 se consideran muy básicos o alcalinos. Las soluciones de fármaco muy ácidas o muy alcalinas pueden provocar flebitis y trombosis. Así, en una modalidad, la invención proporciona soluciones de cloruro de sodio para reconstitución de formulaciones de fármaco liofilizadas o para dilución de formulaciones de fármaco líquidas para preparar esas formulaciones para inyección intravenosa, en donde las preparaciones hechas para inyección (1) no tienen

un pH que es menor que 4.1 o mayor que 9.0, (2) tienen una fuerza iónica suficiente para prevenir la agregación de eritrocitos, y (3) es casi isotónica (o ligeramente hipertónica o hipotónica) con respecto a la sangre tal que la hemólisis o formación de hendiduras no ocurre para las RBC. Sin embargo, el pH de una solución no es una consideración con respecto a si la solución tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la agregación de eritrocitos. En otras palabras, si una formulación liofilizada cuando se reconstituye con agua tiene un pH que está debajo de 4.1 o mayor que 9.0, este no previene el uso de una solución de cloruro de sodio para reconstitución con el propósito de prevenir la aglutinación de eritrocitos.

15 Cálculo de Osmolaridad

La osmolaridad de cualquier preparación farmacéutica se puede calcular por el uso de la siguiente fórmula:
$$\text{Osmolaridad} = (\text{peso de sustancia (g) dividido por el peso molecular de la sustancia (g/L)}) \text{ multiplicado por el número de especies multiplicadas por 1000 para miliosmolaridad.}$$
El término "especies" se refiere al número de iones o especies químicas formadas cuando ocurre la disolución.

Formulaciones Farmacéuticas Listas o Preparadas para Inyección

La inyección proporciona métodos para reconstitución de productos de fármacos liofilizados en solución con el propósito de preparar el producto de fármaco para inyección en un sujeto. El producto de fármaco reconstituido se prepara para inyección teniendo una fuerza iónica suficiente y una tonicidad que es casi isotónica con respecto a la sangre.

Los métodos de la invención también pretenden diluir soluciones de fármaco con el propósito de preparar la solución de fármaco para inyección dentro de un sujeto. La solución de fármaco diluida se prepara para inyección mediante tener una fuerza iónica suficiente y siendo casi isotónica con respecto a la sangre.

En una modalidad, el producto/formulación de fármaco liofilizado o seco, si se reconstituye en agua, tiene una osmolaridad de alrededor de 100 mOsm/L hasta alrededor de 360 mOsm/L. Debido a que la invención proporciona métodos para reconstitución que usan alrededor de 25 mM hasta alrededor de 150 mM de soluciones de cloruro de sodio, el médico debe usar una solución de cloruro de sodio particular basada en la osmolaridad combinada excepto del producto de fármaco liofilizado reconstituido en la solución de cloruro de sodio. Así, por ejemplo, si un producto de fármaco liofilizado si es reconstituido en agua tiene una osmolaridad desde alrededor

de 300 mOsm/L, entonces la solución de NaCl para reconstitución debe ser alrededor de 25 mM hasta alrededor de 30 mM. En otro ejemplo, si un producto de fármaco liofilizado si es reconstituido en agua tiene una osmolaridad de
5 alrededor de 100 mOsm/L, entonces la solución de NaCl para reconstitución debe ser alrededor de 25 mM hasta alrededor de 130 mM.

En una modalidad, un producto de fármaco (si es liofilizado o en solución) para ser preparado por inyección
10 por los métodos presentes no contiene HES (almidón de hidroxietilo). Las formulaciones que contienen HES, a pesar de la reconstitución o dilución con soluciones de NaCl para fuerza iónica, pueden provocar sedimentación y aglutinación de eritrocitos en experimentos in vivo. En otra modalidad, un
15 producto de fármaco para ser preparado para inyección por los métodos presentes no contiene dextranos, debido a que los métodos de Westergren modificados adaptados (ver Ejemplo 2) muestran que la adición de NaCl podría no contrarrestar el efecto de sedimentación aumentado que los dextranos pueden
20 provocar.

En una modalidad, la invención proporciona método para la preparación de una preparación farmacéutica para inyección intravenosa en donde la preparación farmacéutica es una torta liofilizada que comprende un agente de volumen primario. El
25 agente de volumen primario puede ser, por ejemplo,

principalmente sin ionización. Los agentes de volumen sin ionización incluyen, pero no se limitan a, manitol, glicina sacarosa, lactosa, otros disacáridos, proteínas terapéuticas o el ingrediente activo de una misma formulación, u otros
5 agentes de volumen conocidos por un experto en la técnica. Las concentraciones de agentes de volumen sin ionización no afectan significativamente si una solución tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación. Sin embargo, sus concentraciones tienen un efecto de osmolaridad, y por lo
10 tanto, sus concentraciones pueden tener un efecto en la tonicidad. La concentración de glicina, por ejemplo, es equivalente a su contribución para la osmolaridad, así 10 mM de glicina es equivalente a 10 mOsm/L.

Los ingredientes de proteína en una formulación de
15 fármaco, que incluyen ingredientes activos, no afectan significativamente la fuerza iónica de una solución o la osmolaridad de una solución. Por ejemplo, suponiendo un peso molecular de 50,000 para una proteína y suponiendo 2.5 mg de la proteína en una solución de 1-2 mL para ser inyectada.
20 Esto es equivalente a 0.05 mM, así, la proteína no contribuye apreciablemente a la osmolaridad.

Las preparaciones farmacéuticas a menudo también contienen agentes tensoactivos, tales como polisorbato 80. El polisorbato-80 y otros agentes tensoactivos son moléculas de
25 peso molecular grande, entonces las cantidades que usualmente

están presente en preparaciones tales como 0.001% hasta 0.01%, son muy pequeñas para contribuir apreciablemente a la osmolaridad o fuerza iónica. Otros agentes tensoactivos incluyen Brij® 35, Brij® 30, Lubrol-px™, Triton X-10, 5 Pluronic® F127, y sulfato de dodecilo de sodio (SDS).

Otras moléculas de peso molecular grande que pueden estar presente en cantidades pequeñas en formulaciones farmacéuticas que no afectan apreciablemente la osmolaridad o ionicidad son los polímeros, con la calificación de que no 10 son sales como el sulfato de dextrano. Los polímeros ejemplares incluyen dextrano, poli(vinil alcohol) (PVA), metilcelulosa de hidroxipropilo (HPMC), gelatina, polietilen glicol (PEG) y polivinilpirrolidona (PVP).

Las formulaciones farmacéuticas a menudo también 15 contienen sacarosa u otros azúcares o polioles, a menudo en una cantidad de 0-2, 0-5, ó 0-10% o mayor. Por ejemplo, se puede usar de 5-10% de sacarosa cuando la formulación no comprende un agente de volumen. Generalmente, cuando una formulación se hidroliza, y cantidades de la formulación se 20 identifican en la presente como porcentajes o cantidades de molaridad, esto es en referencia a los porcentajes y molaridad de una solución antes de liofilización (esto es, cantidades de llenado). Así, cuando una solución tiene 1% de sacarosa, esto es equivalente a 29.2 mM. Debido a que la 25 sacarosa no ioniza o disocia apreciablemente en solución, 29

mm de sacarosa es equivalente a 20 mOsm/L. Otros azúcares o polioles que no ionizan o disocian apreciablemente en solución incluyen glicerol, xilitol, sorbitol, manitol (también se puede usar como un agente de volumen), glucosa, inositol, rafinosa, maltotriosa, lactosa, y trehalosa.

Las formulaciones farmacéuticas también pueden contener agentes amortiguadores. Los agentes amortiguadores incluyen por ejemplo, acetato, citrato, glicina, histidina, fosfato (sodio o potasio), dietanolamina y Tris. Los agentes amortiguadores incluyen aquellos agentes que mantienen un pH de solución en un intervalo aceptable. Los agentes amortiguadores tales como glicina, histidina, y dietanolamina son en su mayor parte sin ionización, y así sus concentraciones son equivalentes a osmolaridad y se deben tener en mente cuando se considera si una formulación lista para inyección es casi isotónica. Los agentes de solución amortiguadora tales como acetato y citrato usualmente son sales, y por lo tanto son de ionización, y sus concentraciones se multiplican con respecto al cálculo de su contribución con una osmolaridad de solución.

Las formulaciones farmacéuticas pueden incluir esencialmente cualquier ingrediente activo, que incluye proteínas, ácidos nucleicos, virus, y compuestos químicos. Estas moléculas en su mayoría no afectan apreciablemente la fuerza iónica o la osmolaridad de una solución a ser

inyectada. Si estas moléculas son sales, como a menudo compuestos de molécula pequeña son sales farmacéuticas, entonces podrían afectar apreciablemente la fuerza iónica y/o osmolaridad.

5 Ciertos aminoácidos también se encuentran en algunas formulaciones farmacéuticas y se usan como protectores criogénicos, lioprotectores y/o agentes de volumen. Algunos aminoácidos, tales como histidina, en su mayoría son sin ionización, y así la concentración de un aminoácido en una
10 formulación debe ser tomada en cuenta solamente cuando se calcula la osmolaridad de una solución tal que una formulación lista para inyección es casi isotónica con respecto a la sangre.

15 BeneFIX®

El BeneFIX® se produce por una línea de célula de ovario de hámster Chino (CHO) diseñada genéticamente que se caracteriza ampliamente y muestra que está libre de agentes infecciosos. Los bancos de células almacenadas están libres
20 de productos de sangre o plasma. La línea de células CHO secreta Factor IX recombinante (rFIX) en un medio de cultivo de célula definido que no contiene ninguna proteína derivada de fuentes animales o humanas, y el Factor IX recombinante se purifica por un proceso de purificación de cromatografía que
25 no requiere un paso de anticuerpo monoclonal y produce un

82

producto activo de alta pureza. Se incluye un paso de filtración de membrana que tiene la capacidad de retener moléculas con pesos moleculares apreciables >70,000 (así como proteínas grandes y partículas virales) para seguridad viral

5 adicional. El BeneFIX® predominantemente es un componente único por evaluación de electroforesis de gel de SDS-poliacrilamida. La potencia (en unidades internacionales, I.U. (IU)) se determina usando un ensayo de coagulación de etapa uno in Vitro contra el estándar internacional de la

10 Organización Mundial de la Salud (OMS) para el concentrado del Factor IX. Una unidad internacional es la cantidad de actividad de Factor IX presente en 1 mL de plasma humano normal acumulado. La actividad específica del BeneFIX® es mayor que o igual a 180 IU por miligramo de proteína. El

15 BeneFIX® no se deriva de sangre humana y no contienen conservadores o componentes animales o humanos agregados.

El BeneFIX® se formula como una preparación de polvo liofilizada no pirogénica estéril. El BeneFIX® se proyecta para inyección intravenosa (IV). Está disponible en frascos

20 de uso único que contienen la cantidad etiquetada de actividad de Factor IX, expresada en unidades internacionales (IU). Cada frasco contiene, por ejemplo, nominalmente 250, 500, ó 1000 IU (o más, que incluyen 2000 IU) de Factor IX de coagulación (Recombinante). Después de reconstitución del

25 producto de fármaco liofilizado con agua estéril, las

concentraciones de excipientes en las fuerzas de dosis de 500 y 100 IU son 10 mM de L-histidina, 1% de sacarosa, 260 mM de glicina, 0.005% de polisorbato 80. Las concentraciones después de reconstitución en la fuerza de dosis de 250 IU son la mitad de aquellas de las otras dos fuerzas de dosificación. Las fuerzas de dosis de 500 y 1000 IU son isotónicas después de reconstitución. Todas las fuerzas de dosis producen una solución incolora clara en reconstitución.

En una modalidad, la invención proporciona método para la preparación de BeneFIX® para ser inyectado a un sujeto, donde el BeneFIX® se reconstituye en una solución de cloruro de sodio, en donde la solución de cloruro de sodio es mayor que alrededor de 25 mM y menor que alrededor de 150 mM. En una modalidad, la solución de cloruro de sodio usada para reconstituir BeneFIX® es alrededor de 40 mM. En una modalidad, un frasco de BeneFIX® liofilizado se reconstituye en alrededor de 4-5 mL de una solución de cloruro de sodio de 25mM-150mM.

BeneFIX® Reformulado (BeneFIX®-R)

Debido a la fuerza iónica baja del BeneFIX® reconstituido en agua, varias formulaciones se hicieron (BeneFIX® Reformulado (BeneFIX®-R)). El objetivo fue agregar fuerza iónica suficiente a la formulación de BeneFIX® tal como para mitigar el potencial para la aglutinación de RBC.

Con el propósito de aumentar la fuerza iónica de BeneFIX®, el cloruro de sodio se puede incorporar en el producto reconstituido por reemplazo del SWFI como la solución de reconstitución. Alternativamente, el BeneFIX® se puede formular por adición de NaCl a la formulación previa liofilización, tal que la reconstitución todavía se puede lograr con agua, pero las soluciones de sal de liofilización son más difíciles, y es más práctico reconstituir tortas liofilizadas simples con soluciones de NaCl. También es verdad para otras preparaciones farmacéuticas liofilizadas que no tienen una fuerza iónica suficiente cuando se reconstituyen con SWFI para prevenir aglutinación.

En una modalidad, el BeneFIX®-R se puede liofilizar en la misma formulación como BeneFIX® (10 mM de L-histidina, 260 mM de glicina, 1% de sacarosa, 0.005% de polisorbato 80), y solamente la concentración de rFIX cambiará. El producto de fármaco de volumen BeneFIX®-R puede ser llenado luego, por ejemplo, a 4 mL por frasco con 10 mM de L-histidina, 260 mM de glicina, 1% de sacarosa, 0.005% de polisorbato 80, y ser liofilizada. Cuando el BeneFIX®-R se reconstituye a 5 mL por frasco con una solución de NaCl de 25-150 mM, tal como con 40 mM de NaCl, la concentración de los excipientes se reduce a 29% cuando se compara con la formulación de BeneFIX® actual previa liofilización. Esta estrategia resulta en una formulación que es (1) isotónica, (2) tiene suficiente fuerza

iónica para reducir el potencial para aglutinación de RBC, y
(3) reduce el volumen de inyección para dosis más grandes de
rFIX. El BeneFIX®-R se puede proporcionar con, por ejemplo,
250, 500, 1000, y 2000 IU de rFIX por fuerzas de dosis de
5 frasco. Así, después de reconstitución con 5 mL de una
solución de NaCl de 25-150 mM, la solución de formulación de
BeneFIX®-R resultante puede ser desde alrededor de 7 hasta
alrededor de 9 mM de histidina; desde alrededor de 188 hasta
alrededor de 220 mM de glicina; desde alrededor de 0.7% hasta
10 alrededor de 0.9% de sacarosa; y alrededor de 0.004% de
polisorbato 80. Dependiendo de la cantidad de rFIX en un
frasco, por ejemplo, 250, 500, 1000, ó 2000 IU, la
reconstitución en 5 mL de una solución podría resultar en una
concentración de rFIX de alrededor de 50, 100, 200, ó 400
15 IU/mL, respectivamente. La osmolaridad de la formulación
BeneFIX®-R reconstituida en 5 mL de una solución de NaCl de
40 mM es alrededor de 320 mOsm/L.

Formulaciones Ejemplares Para Ser Preparadas para
20 Inyección

El Factor IX Recombinante también puede ser liofilizado
en formulaciones descritas en la Patente de EUA No.
6,372,716, la cual está incorporada en la presente por
referencia para todos los propósitos, incluyendo las
25 formulaciones descritas en ella. Las formulaciones descritas

en la patente se pueden usar con la presente invención, donde las formulaciones no están limitadas para tener rFIX como el ingrediente activo. Así, por ejemplo, las formulaciones liofilizadas que se pueden reconstituir con soluciones de

5 cloruro de sodio de 25 mM-150 mM para prepararlas para inyección, incluyen formulaciones que comprenden glicina, polisorbato, sacarosa, histidina, y un ingrediente activo. El ingrediente activo puede ser esencialmente cualquier proteína, virus, ácido nucleico, o compuesto químico, por

10 ejemplo. La glicina puede tener una concentración, por ejemplo, de alrededor de 0.1M hasta 0.3M. El polisorbato puede tener una concentración, por ejemplo, desde alrededor de 0.001 hasta alrededor de 0.05%. La sacarosa puede tener una concentración, por ejemplo, desde alrededor de 0.5% hasta

15 alrededor de 2%. La histidina puede tener una concentración, por ejemplo, desde alrededor de 5 mM hasta alrededor de 30 mM.

En una modalidad, una formulación liofilizada para ser reconstituida con solución de cloruro de sodio de 25-150 mM

20 comprende alrededor de 0.1 hasta 0.3 M de glicina, alrededor de 0.5 hasta 2% de sacarosa, 0.001 hasta alrededor de 0.05% de polisorbato, alrededor de 5 hasta alrededor de 30 mM de histidina y alrededor de 0.1 hasta alrededor de 20 mg/mL de un ingrediente activo. El ingrediente activo puede ser, por

25 ejemplo, rFIX. En otra modalidad, una formulación liofilizada

de rFIX para ser reconstituida con solución de cloruro de sodio de 25-150 mM comprende alrededor de 0.13 hasta alrededor de 3 mg/ml de rFIX o alrededor de 50 hasta alrededor de 600 IU/mL de rFIX, alrededor de 0.26M de glicina, alrededor de 10 mM de histidina, alrededor de 1% de sacarosa, y alrededor de 0.005% de polisorbato.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

10

Los ejemplos descritos a continuación se proporcionan para ilustrar aspectos de la presente invención y no están incluidos para el propósito de imitación de la invención.

15 Ejemplo 1: Efectos de Anti-Coagulantes y Componentes de Formulación de Aglutinación de RBC Asociada con BeneFIX®

Existen reportes ocasionales de aglutinación de RBC asociados con BeneFIX® en líneas de catéter de mariposa y jeringas. Estudios recientes en sangre de perros con hemofilia demuestran que la aglutinación ocurre en la ausencia de FIX humano recombinante en la solución amortiguadora de formulación. Así, el estudio presente investigó si los anti-coagulantes estándar, varios componentes de BeneFIX®, y la fuerza iónica afectan el fenómeno de aglutinación asociado con BeneFIX®.

La sangre se obtuvo de un acumulado de voluntarios humanos anónimos y fue recolectada en tubos de Vacutainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) que contienen un anti-coagulante estándar, tal como ácido tetra acético de etilendiamina (EDTA), citrato de sodio, o heparina.

Para la prueba de aglutinación, las muestras de sangre en los tubos de Vacutainer primero fueron mezcladas continuamente en un nutator. Sangre, 12.5 μ L, se disolvió en 87.5 μ L de una solución de prueba en una placa de cultivo de células de 48 pozos. Y se dejó para incubar a temperatura de habitación por 2 minutos antes de observación bajo un microscopio de contraste de fase invertida a 400x de ampliación. Cada pozo fue videograbado para capturar las imágenes estáticas con el propósito de registrar la aglutinación de RBC de acuerdo con los siguientes criterios listados a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: Clave de Registro de Aglutinación de RBC

Registro	Fenotipo de Aglutinación
0	Sin coagulación, la mayoría son células individuales, pocos u ocasionales dobles.
1	En la mayor parte células individuales, pequeños agregados dispersos en toda la muestra.
2	Lotes de pequeños agregados, todavía hay algunas células individuales en el fondo.
3	Principalmente agregados pequeños a medianos con células individuales ocasionales.
4	Agregados de células masivas.

Efectos de Anti-Coagulantes Estándar en Aglutinación de RBC: El primer estudio incluye el ensayo de muestras de sangre de tres donadores. La sangre se recolectó en tubos de Vacutainer con EDTA, heparina, y citrato de sodio para cada donador. Los artículos de prueba incluyeron BeneFIX®, 100 IU/mL, reconstituido en cada una de las siguientes concentraciones de NaCl: 0 mM (SWFI), 20 mM, 40 mM, 60 mM, y 77 mM NaCl. Además, dextrosa al 5% en agua (D5W) se incluyó como un control positivo. Las muestras fueron diluidas en una sangre para BeneFIX® o sangre para D5W en relación de 1:8. Las imágenes fueron capturadas, almacenadas digitalmente, cubiertas y registradas para aglutinación. Dos minutos después de la adición de sangre para el BeneFIX®

reconstituido con sWFI, la aglutinación se observó en las muestras de los tres donadores sin tomar en cuenta el tipo de anticoagulante usado. Conforme fueron usadas concentraciones incrementadas de NaCl, la respuesta de aglutinación fue
5 atenuada. La aglutinación notable se observó cuando la sangre se agregó a D5W.

Efectos de NaCl en Aglutinación de RBC en Donadores Previamente Seleccionados: Las muestras de donadores fueron recolectadas en tubos de Vacutainer heparinizados. Debido a
10 que se había observado aglutinación espontánea en algunas muestras previas, todos los donadores fueron seleccionados inicialmente usando 154 mM de NaCl. Si se observaba la aglutinación, la muestra era descalificada de los demás ensayos. La muestras que permanecieron de cada donador fueron
15 diluidas 1:8 en una de dos formulaciones: (1) 100 IU/mL de BeneFIX® reconstituido con sWFI, y (2) 100 IU/mL de BeneFIX® reconstituido con 154 mM de NaCl. Las imágenes fueron capturadas, almacenadas digitalmente, cubiertas y registradas para aglutinación. La aglutinación se observó con sWFI
20 reconstituida con BeneFIX®, considerando que la reconstitución con 154 mM de NaCl redujo o eliminó la reacción de aglutinación (ver Tabla 2 de registros).

Tabla 2: Registros de Aglutinación

Donador	Control Preseleccionado de 154 mM de NaCl	BeneFIX® + SWFI	BeneFIX® + 154 mM de NaCl
7	0	2	1
11	0	3	0
8	0	3	0
28	0	3	0
41	0	3	1

Efecto de Componentes de Formulación y Concentración de BeneFIX®: Varias formulaciones de BeneFIX® fueron evaluadas para determinar el impacto de componentes diferentes en aglutinación de RBC. Fueron preparadas ocho diferentes mezclas, con y sin 154 mM de NaCl, para un total de 16 mezclas (Tabla 3). Los doce donadores fueron seleccionados por aglutinación espontánea y dos fueron descalificados del resto del estudio. Las muestras de sangre de cinco de los diez donadores que quedaron se usaron para las primeras 8 formulaciones (muestras 1-A a través de 1-H) y las otras cinco muestras de donadores se usaron para las segundas 8 formulaciones (muestras 2-I hasta 2-P). Las

muestras fueron diluidas 1:8 como antes y las imágenes fueron capturadas y registradas como se describió previamente.

Tabla 3: Matriz de Diseño de Formulación

5 (+/- indica presencia/ausencia de un ingrediente)

Identificación de Grupo/Muestra	Concentración de BeneFIX® (IU/mL)	Glicina (GLY) 260 mM	Sacarosa 10mg/mL	Tween-80 (Polisor- bato 80) 0.005%	Histidina (HIS) 10 mM	NaCl 154mM
1-A, BeneFIX®	100	+	+	+	+	-
1-B, BeneFIX®	100	+	+	+	+	+
1-C, BeneFIX®	300	+	+	+	+	-
1-D, BeneFIX®	300	+	+	+	+	+
1-E, BeneFIX®	600	+	+	+	+	-
1-F, BeneFIX®	600	+	+	+	+	+
1-G, Sin BeneFIX®	-	+	+	+	+	-
1-H, Sin BeneFIX®	-	+	+	+	+	+
2-I, BeneFIX®, Sin GLY	100	-	+	+	+	-
2-J, BeneFIX®, Sin GLY	100	-	+	+	+	+
2-K, Sin Sacarosa	100	+	-	+	+	-
2-L, Sin Sacarosa	100	+	-	+	+	+

Identificación de Grupo/Muestra	Concentración de BeneFIX® (IU/mL)	Glicina (GLY) 260 mM	Sacarosa 10mg/mL	Tween-80 (Polisor- bato 80) 0.005%	Histidina (HIS) 10 mM	NaCl 154mM
2-M, BeneFIX®, Sin Tween-80 5	100	+	+	-	+	-
2-N, Sin Tween-80	100	+	+	-	+	+
2-O, BeneFIX® Sin HIS	100	+	+	+	-	-
10 2-P, BeneFIX® Sin HIS	100	+	+	+	-	+

Los registros de aglutinación para el experimento presentados en la Tabla 3 se muestran a continuación en las Tablas 4A y 4B. Ningún componente particular, ya sea el ingrediente activo o un excipiente, de la preparación de BeneFIX® estuvo asociado con la aglutinación. Como se esperaba, la remoción de glicina provocó lisis de RBC debido a hipotonicidad de la solución. Sin embargo, la reconstitución con 154 mM de NaCl redujo o eliminó la aglutinación in Vitro y la lisis.

Tabla 4A: Registros de Aglutinación - Variación de la
Concentración de BeneFIX®

5

10

15

20

25

Identi- ficación Del Donador de la Muestra	1-A	1-B	1-C	1-D	1-E	1-F	1-G	1-H
6	4	1	2	1	4	1	3	2
14	3	0	2	3	3	1	2	4
19	4	1	3	0	3	1	3	1
40	1	0	2	1	2	2	3	1
43	3	0	3	1	4	0	3	3
Regis- tro medio	3	0.4	2.4	1.2	3.2	1	2.8	2.2

Tabla 4B: Registros de Aglutinación - Efectos de Excipientes

5	Identificación Del Donador de la Muestra	2-I	2-J	2-K	2-L	2-M	2-N	2-O	2-P
	1	Lisis	1	2	0	3	1	3	0
	11	4	0	4	1	3	1	2	0
	18	Lisis	1	4	1	3	2	3	2
10	34	Lisis	0	2	0	2	2	3	2
	45	Lisis	1	4	1	4	3	2	3
	Regis- tro medio	Lisis	0.6	3.2	0.6	3	1.8	2.6	1.4

15

Efectos de Concentraciones Menores de NaCl en Aglutinación de RBC en Donadores Previamente Seleccionados: Las muestras de donadores fueron recolectadas en tubos Vacutainer heparinizados. Debido a que la aglutinación se había observado en algunas muestras previas, todos los donadores fueron seleccionados inicialmente con 154 mM de NaCl. Si se observó coagulación, la muestra fue descalificada de los demás ensayos. Las muestras que quedaron de cada donador fueron diluidas 1:8 como antes en una de tres formulaciones: (1) 100 IU/mL de BeneFIX® reconstituido con

25

sWFI; (2) 100 IU/mL de BeneFIX® con 40 mM de NaCl; o (3) 100 IU/mL de BeneFIX® con 77 mM de NaCl. Las imágenes fueron capturadas, recolectadas y registradas como anteriormente. Los resultados se proporcionan en la Tabla 5 a continuación.

5 La aglutinación se observó en las cinco muestras con BeneFIX® reconstituido con agua, considerando que la reconstitución de BeneFIX® con 40 mM o 77 mM de NaCl redujo o eliminó la reacción de aglutinación.

10

Tabla 5: Registros de Aglutinación

15

20

Donador	NaCl 154	BeneFIX® +	BeneFIX® + 40	BeneFIX® +
No.	mM	sWFI	mM NaCl	77 mM NaCl
8	0	3	1	2
34	0	3	2	1
39	0	4	3	1
40	0	3	0	1
47	0	3	1	1
Registro	0	3.2	1.4	1.2
Promedio				

Análisis: La aglutinación de RBC ocurrió en sangre anti-coagulada con heparina, EDTA, o citrato de sodio cuando se mezcla con BeneFIX® en una sangre para BeneFIX® reconstituido en relación de volumen de 1:8. No se observó ningún efecto de tipo anti-coagulante en la aglutinación; por lo tanto la

heparina se usó como el anti-coagulante en evaluaciones subsiguientes. En algunos ejemplos, la anticoagulación ocurrió en la presencia de 0.9% de NaCl solo (control negativo para aglutinación). Por lo tanto, las evaluaciones
5 subsiguientes se condujeron solamente con muestras que no exhiben coagulación con el control de 0.9% de NaCl.

Los efectos de tres concentraciones de BeneFIX® (100, 300 ó 600 IU/mL) y de cada componente individual de BeneFIX®, reconstituido en sWFI ó solución de NaCl se evaluaron luego
10 para aglutinación donde se mezclaron con sangre anticoagulada con heparina en una sangre de BeneFIX® en relación de volumen de 1:8. La eliminación de cualquier componente particular, que incluye la proteína FIX humana recombinante no tuvo efecto en la respuesta de aglutinación. Esto indica que un
15 amplio intervalo de formulaciones farmacéuticas diferentes se pueden preparar (reconstituidas o diluidas) con soluciones de NaCl para inyección intravenosa. La remoción de glicina resultó en lisis de RBC. Sin embargo, el uso de 40 mM (0.234% de NaCl, inyectable), 77 mM (45% de NaCl, inyectable) o 154
20 mM de NaCl (0.9% de NaCl, inyectable) para reconstitución redujo o eliminó la respuesta de aglutinación y lisis.

Así, estos resultados muestran que ningún componente particular de la formulación de BeneFIX® se relaciona con la aglutinación observada. Aunque la remoción de glicina de la
25 formulación de BeneFIX® y la reconstitución con agua resulta

en una solución hipotónica que provoca lisis, osmolaridad y tonicidad es un problema distinto de la fuerza iónica y aglutinación. Los resultados muestran que la aglutinación se asocia con la fuerza iónica del Factor IX recombinante reconstituido (rFIX) en sWFI, y la reconstitución con NaCl disminuye o elimina la aglutinación. Así, la reconstitución de otras formulaciones farmacéuticas con soluciones de NaCl aún soluciones de NaCl que tienen una concentración debajo de 154 mM, pueden prevenir tanto la aglutinación como la lisis en inyección intravenosa.

Ejemplo 2: Adaptación del Método de Westergren Modificado de Medición de Grado de Sedimentación de Eritrocitos para Evaluar la Agregación de Eritrocitos Inducida por Agentes o Formulaciones Farmacéuticas.

La formulación de BeneFIX® comercializada actualmente es una formulación no iónica. Durante la administración de la formulación BeneFIX® reconstituida en sWFI, hubo observaciones poco frecuentes de agregación de eritrocitos (esto es, aglutinación) donde una sangre de paciente se mezcla con el BeneFIX® reconstituido, tal como en conducto intravenoso. La invención proporciona el descubrimiento de que la agregación de eritrocitos se asocia con la formulación, sin rFIX, y se previene por el uso de diluentes que contienen por lo menos alrededor de 40 mM de NaCl. Para

ayudar en el diseño de diluentes a la medida que contienen por lo menos alrededor de 40 mM de NaCl, se diseñó un ensayo cuantificable que se puede usar para medir la sedimentación de eritrocitos, el cual es un método establecido para evaluar la agregación de eritrocitos in Vitro. El método de Westergren modificado, en el cual la sangre se diluye 4:5 en solución salina normal, se adaptó para evaluar la agregación en sangre que ha sido diluida 1:4 ó 1:8 con cualquier solución ya sea salina o de prueba (esto es, diluentes a la medida).

La sangre humana se obtuvo de voluntarios adultos saludables y se recolectó en tubos que contienen EDTA. Para demostrar lo apropiado de las muestras de sangre para experimentos de sedimentación, se midió el grado de sedimentación de eritrocitos definido clínicamente ESR₆₀ por el método de Westergren modificado. Brevemente, la sangre bien mezclada se diluyó 4:5 con 154 mM de NaCl, se mezcló bien suavemente, y luego se cargó inmediatamente en un tubo de Westergren con ajuste propio a cero que se colocó en un soporte de 10 tubos adecuado. La distancia en mm desde la marca cero en la parte superior del tubo hasta la interfase de plasma:eritrocito después de 60 minutos se midió y registró. Los resultados de ESR₆₀ se compararon con valores de referencia normal publicados (Morris, M.W. y colaboradores, Basic examination of blood, in Henry, J.B.,

ed., Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, Philadelphia, PA, WB Saunders, 2001: 479-519).

Se condujeron dos experimentos para demostrar lo apropiado del método Westergren modificado adaptado para evaluar la agregación de eritrocitos asociada con formulaciones farmacéuticas. Las muestras de sangre humana fueron apropiadas para uso en estos ensayos debido a que todos tuvieron valores de ESR₆₀ que estuvieron dentro de límites normales. Estas muestras se diluyeron 1:4 en el primer experimento y se diluyeron 1:8 en el segundo.

En el primer experimento, la sedimentación de eritrocitos se mejoró mediante 5% de dextrano 70 o BeneFIX® reconstituido con sWFI o 10 mM de NaCl. En 5 minutos, los agregados fueron visibles en los tubos que habían sido cargados con sangre diluida ya sea con 30% de dextrano 70 o con BeneFIX® reconstituido en sWFI. En 60 minutos, la sedimentación de eritrocitos en estos tubos fue marcadamente aumentada cuando se compara con el control salino (Tabla 6). En 90 minutos, la sangre de un donador que fue diluida en BeneFIX® reconstituido en 10 mM de NaCl tuvo un patrón de sedimentación de dos fases con una interfase de eritrocito:plasma clara localizada 8 mm desde la marca cero y otra interfase entre los eritrocitos empacados densamente y los empacados menos densamente localizados 149 mm desde la marca cero.

Tabla 6: Sedimentación de Eritrocitos de Sangre Humana

Diluida 1:4 en BeneFIX® o 3% de Dextrano

(Distancia de sedimentación en mm medidos desde la marca
cero)

Donador y Tiempo de Dilución	Solución Salina	0 mM NaCl	10 mM NaCl	20 mM NaCl	30 mM NaCl	40 mM NaCl	50 mM NaCl	60 mM NaCl	77 mM NaCl	NaCl 154 mM	3% Dextrano 70
Donador 5											
60 min	2	135	nd	2	2	2	1	1	2	1	132
90 min	3	145	nd	4	3	3	3	2	2	2	159
120 min	4	150	nd	5	4	4	4	3	4	3	167
150min	6	153	nd	7	6	5	5	5	5	5	169
Donador 22											
60 min	0	161	4	3	0	0	0	0	0	nd	145
90 min	3	164	149	3	3	3	2	2	3	nd	166
120min	4	166	151	6	4	4	4	3	4	nd	171
150 min	7	167	152	8	6	5	5	5	6	nd	172

Las concentraciones de NaCl fueron aquellas usadas para reconstituir BeneFIX®

En el segundo experimento, la sedimentación de eritrocitos se mejoró mediante 5% de dextrosa, "MFR-927" (la

solución amortiguadora de la formulación para BeneFIX® que carece de rFIX), y el BeneFIX® reconstituido con 10 mM de NaCl (Tabla 7). Diferente del primer experimento, la sedimentación en estos tubos fue rápida con sedimentación máxima o cercanamente máxima alcanzada en 15 a 30 minutos.

Tabla 7: Sedimentación de Eritrocitos de Sangre Humana
Diluida 1:8 en MFR-927, BeneFIX® o 5% de Dextrosa

(Distancia de sedimentación en mm medidos desde la marca de
cero)

Donador y Tiempo de Dilución	Solución Salina	MFR- 927	10 mM NaCl	25 mM NaCl	30 mM NaCl	40 mM NaCl	50 mM NaCl	60 mM NaCl	77 mM NaCl	3% Dextrano 70
Donador 56										
15 min	0	>180	~155	1	0	0	0	0	0	175
30 min	0	>180	177	2	1	0	0	0	0	178
45 min	1	>180	180	3	2	1	1	1	1	179
60min	2	>180	>180	3	2	1	1	1	1	180
Donador 57										
15 min	0	>180	180	1	1	0	0	0	0	179
30 min	1	>180	>180	2	2	1	0	1	1	>180

5

Donador y Tiempo de Dilución	Solución Salina	MFR- 927	10 mM NaCl	25 mM NaCl	30 mM NaCl	40 mM NaCl	50 mM NaCl	60 mM NaCl	77 mM NaCl	3% Dextrano 70
45 min	1	>180	>180	3	3	1	2	1	1	>180
60 min	2	>180	>180	4	3	2	3	2	2	>180

Las concentraciones de NaCl fueron aquellas usadas para reconstituir BeneFIX®; MFR-927 es la formulación de solución amortiguadora para BeneFIX® que carece de rFIX.

10

15

20

Los resultados de estos experimentos demuestran que el Método de Westergren modificado usado para medir sedimentación de eritrocitos se puede adaptar para evaluar agregación de eritrocitos inducida por preparaciones o formulaciones farmacéuticas. Por ejemplo, la medición de sedimentación de eritrocitos en tubos de Westergren 60 minutos después de cargar sangre diluida 1:4 con soluciones de prueba es suficiente para distinguir entre los agentes que mejoran la agregación (esto es, 5% de dextrosa, 3% de dextrano 70, MFR-927, y BeneFIX® reconstituido en sWFI) de aquellos que no lo hicieron (esto es, solución salina y BeneFIX® reconstituido en diluentes que contienen alrededor de 25 mM o más de NaCl).

25

Ejemplo 3: Adecuación de 40 mM de NaCl en Diluyente para
BeneFIX® reformulado para Mejorar la Agregación de
Eritrocitos Asociada con Formulación

La formulación no iónica de BeneFIX® comercializada
5 actualmente se ha asociado con agregación de eritrocitos in
Vitro, la cual puede ocurrir durante la administración cuando
la sangre del paciente se mezcla con BeneFIX® en conducto
intravenoso. La invención proporciona el descubrimiento de
que la agregación de eritrocitos está asociada con la
10 formulación, sin Factor IX recombinante, y la agregación se
puede prevenir mediante BeneFIX® de reconstitución con
diluentes que contienen por lo menos 40 mM de NaCl.

Un objetivo de este Ejemplo es evaluar la fuerza de un
diluyente 40 mM para preparaciones de BeneFIX® reformulado de
15 reconstitución (BeneFIX®-R). Específicamente, fueron
diseñados experimentos para determinar si las concentraciones
de NaCl que derivan de 40 mM mediante tanto como 10% son
suficientes para prevenir la agregación de eritrocitos
asociada con formulación, la cual se evaluó mediante el
20 método de Westergren modificado adaptado para medir el grado
de sedimentación de eritrocitos (ESR). Además, la fuerza de
la concentración NaCl o sedimentación de eritrocitos se
evaluó en ambos frascos de dosis alta (esto es, 2000 IU) y
baja (esto es, 250 IU) de BeneFIX®-R.

El efecto de las formulaciones de BeneFIX®-R, MFR-927, y 3% de dextrano 70 en sedimentación de eritrocito se midió a temperatura de habitación usando una adaptación del método de Westergren modificado, como se describe en el Ejemplo 2. El diseño del estudio se esboza en la Tabla 8.

Tabla 8: Diseño de Estudio para el Ejemplo 3

Grupo	Tratamiento	Número de Experimentos	Número Total de Muestras de Donadores Evaluadas	Dilución de sangre Evaluada
1	Solución Salina	4	12	1:4
2	MFR-927	4	12	1:4
3	BeneFIX®-R (55 IU/mL); 36 mM NaCl	4	12	1:4
4	BeneFIX®-R (55 IU/mL); 40 mM NaCl	4	12	1:4
5	BeneFIX®-R (55 IU/mL); 44 mM NaCl	4	12	1:4
6	BeneFIX®-R (440 IU/mL); 36 mM NaCl	4	12	1:4
7	BeneFIX®-R (440 IU/mL); 40 mM NaCl	4	12	1:4

Grupo	Tratamiento	Número de Experimentos	Número Total de Muestras de Donadores Evaluadas	Dilución de sangre Evaluada
8	BeneFIX®-R (440 IU/mL); 44 mM NaCl	4	12	1:4
9	3% Dextran 70	4	12	1:4

En el día del experimento, ambos frascos de dosis alta (frascos de BeneFIX®-R liofilizado que contienen ~2000 IU rFIX) y baja de BeneFIX®-R (frascos de BeneFIX®-R liofilizado que contienen ~250 IU rFIX) fueron reconstituidos inmediatamente antes de uso con 5 mL de 36 mM, 40 mM, ó 44 mM de NaCl. La solución de control positivo 3% (w/v) de dextrano 70 se preparó en solución salina de solución amortiguadora de fosfato libre de magnesio y calcio modificada de Dulbecco estéril (PBS-CMF; pH 7.4). La sangre humana se obtuvo de donadores y se recolectó en tubos de Vacutainer que contienen EDTA. Las muestras de sangre se usaron para experimentos de sedimentación de eritrocitos dentro de las 3 horas después de recolección.

La sangre entera se diluyó 1:4 en soluciones de prueba (esto es, 400 μ L de sangre entera se agregaron a 1.2 mL de solución de prueba), se mezcló bien y luego se cargó en tubos de Westergren de cristal desechables con ajuste propio a cero que se mantuvieron absolutamente verticales en un soporte a la medida dedicado. La sedimentación de eritrocitos después de 60 minutos, la cual es la distancia en mm desde la marca de cero en la parte superior del tubo hasta la interfase de plasma-eritrocitos, se midió y registró.

Los resultados de los 12 donadores fueron similares. La solución amortiguadora de la formulación BeneFIX® comercializada actualmente que carece de rFIX (MFR-927) y 3% de dextrano 70, una solución de control positivo estándar, exhibieron sedimentación de eritrocitos aumentada en comparación con la sangre que había sido mezclada en soluciones de prueba NaCl (ver Figura 1). A pesar de la concentración de NaCl en la solución amortiguadora (36 mM, 40 mM, ó 44 mM) o concentración de rFIX en el producto, BeneFIX®-R no aumentó la sedimentación de eritrocitos mientras fue reconstituido con un diluyente de NaCl.

Los resultados de este estudio demuestran que las concentraciones de NaCl 10% mayores o menores que 40 mM en los diluentes de BeneFIX®-R son suficientes para prevenir la sedimentación o agregación (aglutinación) de eritrocitos aumentada. Los resultados también demuestran que el efecto de

mejoría de NaCl en la agregación de eritrocitos asociado a la formulación no se afecta por la concentración del ingrediente activo (esto es, rFIX).

5 Ejemplo 4: Papel de la Fuerza Iónica en la Solución Amortiguadora para Reconstitución de BeneFIX® en Provocación de Aglutinación de RBC

La sangre humana se recolectó mediante punción en la vena de cuatro diferentes donadores en tubos de recolección
10 heparinizados estándar. La formación de aglutinados de RBC se evaluó mediante extracción de 2.6 mL de solución amortiguadora o proteína BeneFIX® reconstituida en jeringas seguida de 0.6 mL de sangre heparinizada. Se observó el comportamiento del mezclado/sedimentación de los aglutinados
15 en estas jeringas durante el tiempo y se registró fotográficamente usando una cámara digital.

La composición de la formulación de BeneFIX® actual previa liofilización es rFIX, alrededor de 10 mM de histidina, alrededor de 260 mM de glicina, alrededor de 1% de
20 sacarosa, y alrededor de 0.005% de polisorbato 80, pH 6.8. La formulación BeneFIX® se liofiliza, y antes de inyección, se reconstituye en sWFI. Originalmente, la sacarosa era la sospechosa de provocar la aglutinación. De ahí, las soluciones amortiguadoras de tubos fueron formuladas con 1%,
25 0.5% ó 0% de sacarosa. Cada solución amortiguadora de

sacarosa fue extraída en jeringas, seguida por una cantidad de sangre heparinizada. La aglutinación de las RBC y la sedimentación rápida subsiguiente se encontraron que son idénticas para las tres soluciones amortiguadoras, sugiriendo
5 que el contenido de sacarosa de la formulación BeneFIX® no cuenta para la aglutinación observada. El BeneFIX® reconstituido en solución salina normal, mejor que en agua estéril, no provocó aglutinación. Estos datos indican que la fuerza iónica de la formulación de BeneFIX® no es suficiente
10 para prevenir la aglutinación cuando BeneFIX® se reconstituye en agua.

Con el propósito de determinar la fuerza iónica mínima necesaria para eliminar la aglutinación, el BeneFIX® fue reconstituido (o la formulación previa liofilización de
15 BeneFIX® puede ser variada para incluir cloruro de sodio, aunque los métodos para liofilización de formulaciones de cloruro de sodio son más difíciles comparados con la liofilización de formulaciones que no tienen cloruro de sodio) con soluciones que tienen variación de concentraciones
20 de NaCl (0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, y 137 mM). El BeneFIX® también fue reconstituido en solución salina normal que contiene 154 mM de NaCl. Se examinó el comportamiento de la aglutinación y sedimentación de RBC en todas estas soluciones. La Tabla 9 muestra la osmolaridad y
25 fuerzas iónicas (expresadas como conductividad) de algunas de

estas soluciones junto con otras soluciones intravenosas comunes. Durante la adición de cloruro de sodio a la formulación de BeneFIX®, si mediante la adición directa antes de liofilización o mediante la reconstitución de un liofilizado con una solución de cloruro de sodio, el NaCl podría esperarse que se disociara completamente a una concentración equivalente de iones Na^+ y Cl^- . Así, la fuerza iónica (expresada en mEq/L (miliequivalentes/L) de Na^+ y Cl^-) de una solución amortiguadora de la formulación más NaCl se podría predecir que es equivalente a la concentración de NaCl si la solución amortiguadora de la formulación no contiene otros iones.

Tabla 9: Caracterización de Varias Soluciones

Solución	Osmolaridad	Conductividad	pH
	Calculada Aproximada (mOsm/L)	Calculada Aproximada (mS/cm)	
Formulación de BeneFIX®	300	0 (la conductividad observada es <0.2 mS/cm)	6.8
Formulación de BeneFIX® + 10 mM	320	1	6.8

Solución	Osmolaridad Calculada Aproximada (mOsm/L)	Conductividad Calculada Aproximada (mS/cm)	pH
NaCl			
Formulación de BeneFIX® + 20 mM NaCl	340	2	6.8
Formulación de BeneFIX® + 40 mM NaCl	380	4	6.8
Formulación de BeneFIX® + 80 mM NaCl	460	7	6.8
Formulación de BeneFIX® + 137 mM NaCl	574	12.8	6.8
Formulación de BeneFIX® + NaCl 154 mM	607	14.4	6.8
0.9% de cloruro de sodio (equivalente a NaCl 154 mM; 154 mEq/L de iones Na ⁺ y Cl ⁻)	308	14.4	6.0

Solución	Osmolaridad Calculada Aproximada (mOsm/L)	Conductividad Calculada Aproximada (mS/cm)	pH
Inyección de 5% de dextrosa	250	0	4.5

Durante el contacto de sangre con las soluciones en la Tabla 9 en jeringas, la aglutinación de RBC se observó individualmente y luego las jeringas fueron mezcladas suavemente e invertidas para observar la sedimentación de la sangre. No se observó la formación de aglutinado en las formulaciones de BeneFIX® reconstituido con por lo menos alrededor de 40 mM NaCl (se observa en el Ejemplo anterior, alrededor de 36 mM de NaCl también fueron suficientes para prevenir la aglutinación). El comportamiento de las células de sangre en estas soluciones que contienen por lo menos 40 mM de NaCl no se distinguió de aquel en solución salina normal.

La sedimentación de sangre se evaluó en una serie de jeringas que contienen formulación de BeneFIX® diluida (si es previa liofilización)/reconstituida (si es liofilizada) en concentraciones de disminución de NaCl (iniciando en 40 mM) 15 minutos después de inversión. Hubo una respuesta dependiente de concentración consistente en términos de

formación de aglutinado y subsiguiente velocidad de sedimentación - aumentando la aglutinación y sedimentación más rápida con disminución de concentración de NaCl en la solución amortiguadora. La aglutinación obvia fue visible con una muestra de sangre en solución amortiguadora que contiene ≤ 25 mM de NaCl y con otra muestra de sangre en solución amortiguadora que contiene ≤ 30 mM de NaCl. En todas las preparaciones de solución amortiguadora con ≥ 40 mM de NaCl, el comportamiento de las células de sangre no se distinguió de aquel en solución salina normal o BeneFIX® reconstituido en solución salina normal. El BeneFIX® reconstituido con 40 mM de NaCl corresponde a una conductividad calculada de 4 mS/cm.

La solución de inyección de dextrosa al 5%, cada mL de la cual contiene 50 mg de USP de dextrosa hídrica en agua para inyección - tuvo una osmolaridad de 250 mOsm/L y una fuerza iónica calculada de 0 mS/cm. Esta solución, la cual comúnmente se administra intravenosamente, también provoca aglutinación de RBC y sedimentación de sangre muy rápida similar a aquella observada con la formulación de BeneFIX® reconstituida en agua.

Así, estos resultados indican que la aglutinación de RBC provocada por BeneFIX® reconstituido en agua se debe a la fuerza iónica baja de la formulación de BeneFIX® (0 mEq/L fuerza iónica calculada, <0.2 mS/cm conductividad medida).

Este problema puede ser corregido mediante reconstitución en soluciones de NaCl que tienen ≥ 40 mM de NaCl tal que la solución reconstituida para inyección tenga una fuerza iónica calculada de alrededor de 40 mEq/L (la fuerza iónica
5 suficiente para prevenir la aglutinación también se puede calcular como una conductividad de alrededor de 4 mS/cm o mayor) o más alta.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de una formulación farmacéutica para inyección intravenosa, el método
5 caracterizado porque comprende la adición de alrededor de 25 mM hasta alrededor de 150 mM de solución de cloruro de sodio a la formulación farmacéutica resultando de esa manera en una formulación preparada para inyección intravenosa, en donde la formulación preparada es casi isotónica con respecto al
10 plasma o es ligeramente hipotónica o ligeramente hipertónica con respecto al plasma, y en donde la formulación preparada tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de eritrocitos.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1,
15 caracterizado porque la formulación preparada es casi isotónica con respecto al plasma y tiene una osmolaridad que es desde alrededor de 270 mOsm/L hasta alrededor de 330 mOsm/L.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1,
20 caracterizado porque la formulación preparada es ligeramente hipotónica con respecto al plasma y tiene una osmolaridad que es desde alrededor de 220 mOsm/L hasta alrededor de 270 mOsm/L.

4. El método de conformidad con la reivindicación 1,
25 caracterizado porque la formulación preparada es ligeramente

hipertónica con respecto al plasma y tiene una osmolaridad que es desde alrededor de 330 mOsm/L hasta alrededor de 660 mOsm/L.

5. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, caracterizado porque la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es por lo menos alrededor de 25 mEq/L de iones Na^+ y Cl^- .

6. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, caracterizado porque la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es por lo menos alrededor de 30 mEq/L de iones Na^+ y Cl^- .

7. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, caracterizado porque la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es por lo menos alrededor de 36 mEq/L de iones Na^+ y Cl^- .

8. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, caracterizado porque la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es por lo menos alrededor de 40 mEq/L de iones Na^+ y Cl^- .

9. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, caracterizado porque la formulación preparada tiene una fuerza iónica que es por lo menos alrededor de 40 mEq/L de iones Na^+ y Cl^- y menos que alrededor de 150 mEq/l de iones Na^+ y Cl^- .

10. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, caracterizado porque la formulación preparada tiene una fuerza iónica medida en conductividad que es por lo menos 2.5 mS/cm.

5 11. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, caracterizado porque la formulación preparada tiene una fuerza iónica medida en conductividad que es por lo menos 4.0 mS/cm.

10 12. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 11, caracterizado porque la formulación farmacéutica a ser preparada para inyección es una formulación liofilizada.

15 13. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 11, caracterizado porque la formulación farmacéutica a ser preparada para inyección es una solución.

20 14. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 13, caracterizado porque la solución de cloruro de sodio es alrededor de 40 mM hasta alrededor de 150 mM.

15. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 13, caracterizado porque la solución de cloruro de sodio es alrededor de 36 mM hasta alrededor de 44 mM.

16. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 13, caracterizado porque la solución de cloruro de sodio es alrededor de 40 mM.

17. El método de conformidad con cualesquiera de las
5 reivindicaciones 1 a la 16, caracterizado porque antes de la adición de la solución de cloruro de sodio, la formulación farmacéutica no contiene una cantidad apreciable de una sal de ionización.

18. El método de conformidad con la reivindicación 10,
10 caracterizado porque la formulación liofilizada, si se reconstituye en agua, no contiene más que 5 mM de una sal de ionización.

19. El método de conformidad con la reivindicación 10,
caracterizado porque la formulación liofilizada, si se
15 reconstituye en agua, no contiene más que 25 mM de una sal de ionización.

20. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 19, caracterizado porque antes de la adición de la solución de cloruro de sodio, la formulación
20 farmacéutica comprende histidina, glicina, sacarosa, y polisorbato.

21. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 19, caracterizado porque antes de la adición de la solución de cloruro de sodio, la formulación

119
farmacéutica comprende histidina, glicina, sacarosa, polisorbato, y una proteína terapéutica.

22. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 21, caracterizado porque antes de la
5 adición de la solución de cloruro de sodio, la formulación farmacéutica comprende histidina, glicina, sacarosa, polisorbato, y Factor IX.

23. El método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a la 21, caracterizado porque antes de la
10 adición de la solución de cloruro de sodio, la formulación farmacéutica si se reconstituye en agua comprende:

(a) desde alrededor de 5 mM hasta alrededor de 30 mM de histidina;

(b) desde alrededor de 0.1 mM hasta alrededor de 0.3 mM
15 de glicina;

(c) desde alrededor de 0.5 hasta alrededor de 2 por ciento de sacarosa; y

(d) desde alrededor de 0.001 hasta alrededor de 0.05 por ciento de polisorbato.

20 24. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque antes de la adición de la solución de cloruro de sodio, la formulación farmacéutica si se reconstituye en agua además comprende:

(e) desde alrededor de 50 IU/mL hasta alrededor de 2000
25 IU/mL de Factor IX.

25. Un método para la preparación de una formulación de Factor IX liofilizada para inyección intravenosa, el método comprende la adición de alrededor de 25 mM hasta alrededor de 150 mM de solución de cloruro de sodio a la formulación de Factor IX liofilizada resultando de esta manera en una formulación preparada para inyección intravenosa, caracterizado porque la formulación preparada es casi isotónica con respecto al plasma o es ligeramente hipotónica o ligeramente hipertónica con respecto al plasma, y en donde la formulación preparada tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación de eritrocitos.

26. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la formulación de Factor IX liofilizada si se reconstituye en agua comprende:

(a) desde alrededor de 5 mM hasta alrededor de 30 mM de histidina;

(b) desde alrededor de 0.1 mM hasta alrededor de 0.3 mM de glicina;

(c) desde alrededor de 0.5 hasta alrededor de 2 por ciento de sacarosa; y

(d) desde alrededor de 0.001 hasta alrededor de 0.05 por ciento de polisorbato.

27. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque una solución de cloruro de sodio de

alrededor de 40 mM se agrega a la formulación de Factor IX liofilizada.

28. El método de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque alrededor de 5 mL de la solución de 5 cloruro de sodio de alrededor de 40 mM se agrega a la formulación de Factor IX liofilizada.

29. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque la formulación de Factor IX tiene un volumen de pre-liofilización de alrededor de 4 mL.

10 30. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque la formulación de Factor IX liofilizada si se reconstituye en agua comprende alrededor de 10 mM de histidina, 0.26 M de glicina, 1% de sacarosa, 0.005% de polisorbato, y Factor IX.

15 31. Un kit farmacéutico caracterizado porque comprende:

(a) un frasco que contiene una torta liofilizada, en donde si la torta liofilizada se reconstituye en 5 mL de agua la solución comprendería:

20 (i) desde alrededor de 5 mM hasta alrededor de 30 mM de histidina;

(ii) desde alrededor de 0.1M hasta alrededor de 0.3M de glicina;

(iii) desde alrededor de 0.5 hasta alrededor de 2 por ciento de sacarosa;

(iv) desde alrededor de 0.001 hasta alrededor de 0.05 por ciento de polisorbato; y

(v) desde alrededor de 50 IU/mL hasta alrededor de 2000 IU/mL de Factor IX;

5 (b) una solución de cloruro de sodio de 25 mM hasta alrededor de 150 mM; y

(c) instrucciones para la reconstitución de la torta liofilizada con la solución de cloruro de sodio, tal que después de reconstitución la solución resultante es casi
10 isotónica y tiene una fuerza iónica suficiente para prevenir la agregación de eritrocitos en la inyección intravenosa.

32. Un kit farmacéutico caracterizado porque comprende:

(a) un frasco que contiene una torta liofilizada, en donde si la torta liofilizada se reconstituye en 4 mL de agua
15 la solución comprendería:

(i) alrededor de 10 mM de histidina;

(ii) alrededor de 0.26M de glicina;

(iii) alrededor de 1 por ciento de sacarosa;

(iv) alrededor de 0.005 por ciento de polisorbato
20 80; y

(v) desde alrededor de 50 IU/mL hasta alrededor de 2000 IU/mL de Factor IX;

(b) una solución de cloruro de sodio de alrededor de 40 mM; y (c) instrucciones para la reconstitución de la torta
25 liofilizada en el frasco con alrededor de 5 mL de solución de

cloruro de sodio, tal que después de la reconstitución la solución resultante comprende:

(i) desde alrededor de 7 hasta alrededor de 9 mM de histidina;

5 (ii) desde alrededor de 200 hasta alrededor de 210 mM de glicina;

(iii) desde alrededor de 0.7% hasta alrededor de 0.9% de sacarosa;

(iv) desde alrededor de 0.004% de polisorbato 80;

10 (v) desde alrededor de 50 IU/mL hasta alrededor de 2000 IU/mL de Factor IX; y

(vi) alrededor de 40 mM de NaCl.

33. Una torta liofilizada, caracterizada porque si la torta liofilizada se reconstituye en 5 ml de agua, la
15 solución comprendería:

(i) desde alrededor de 5 mM hasta alrededor de 30 mM de histidina;

(ii) desde alrededor de 0.1M hasta alrededor de 0.3M de glicina;

20 (iii) desde alrededor de 0.5 hasta alrededor de 2 por ciento de sacarosa;

(iv) desde alrededor de 0.001 hasta alrededor de 0.05 por ciento de polisorbato; y

(v) desde alrededor de 50 IU/mL hasta alrededor de
25 2000 IU/mL de Factor IX.

34. Una torta liofilizada, caracterizada porque si la torta liofilizada se reconstituye en 4 ml de agua, la solución comprendería:

- i) alrededor de 10 mM de histidina;
- 5 ii) alrededor de 0.26M de glicina;
- iii) alrededor de 1 por ciento de sacarosa;
- iv) alrededor de 0.005 por ciento de polisorbato 80; y
- v) desde alrededor de 50 IU/ml hasta alrededor de 2000 IU/ml de Factor IX.

10 35. Un frasco que contiene una torta liofilizada, caracterizado porque si la torta liofilizada se reconstituye en 5 ml de agua, la solución comprendería:

- (i) desde alrededor de 5 mM hasta alrededor de 30 mM de histidina;
- 15 (ii) desde alrededor de 0.1M hasta alrededor de 0.3M de glicina;
- (iii) desde alrededor de 0.5 hasta alrededor de 2 por ciento de sacarosa;
- (iv) desde alrededor de 0.001 hasta alrededor de 20 0.05 por ciento de polisorbato; y
- (v) desde alrededor de 50 IU/mL hasta alrededor de 2000 IU/mL de Factor IX.

36. Un frasco que contiene una torta liofilizada, caracterizado porque si la torta liofilizada se reconstituye
25 en 4 ml de agua, la solución comprendería:

- i) alrededor de 10 mM de histidina;
ii) alrededor de 0.26M de glicina;
iii) alrededor de 1 por ciento de sacarosa;
iv) alrededor de 0.005 por ciento de polisorbato 80; y
5 v) desde alrededor de 50 IU/ml hasta alrededor de 2000
IU/ml de Factor IX.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona métodos para la preparación de formulaciones farmacéuticas para inyección tal que en la inyección la formulación no provoque la aglutinación de eritrocitos, hemólisis, y/o contracción de células. Para prevenir la aglutinación, una formulación farmacéutica preparada para inyección necesita tener una fuerza iónica suficiente. Para prevenir la hemólisis o la contracción de células, una formulación farmacéutica preparada para inyección necesita ser casi isotónica con respecto al plasma. La invención proporciona métodos que preparan formulaciones farmacéuticas para inyección que tienen tanto la fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación y la tonicidad requerida para prevenir hemólisis o deshidratación o contracción de células significativas. Los métodos presentes involucran el uso de soluciones de cloruro de sodio que son alrededor de 25 mM hasta alrededor de 150 mM para reconstitución de tortas liofilizadas (u otras formulaciones farmacéuticas no líquidas) en solución o para dilución de soluciones de formulación farmacéutica.

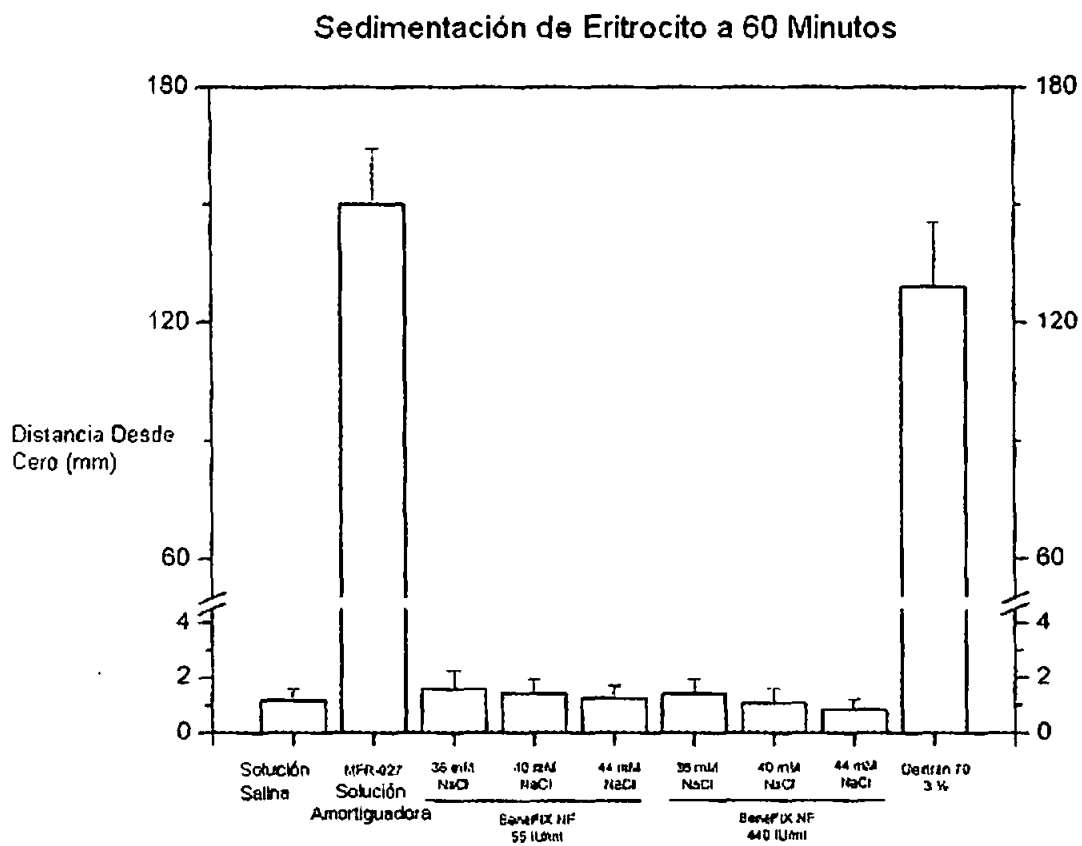


FIG. 1

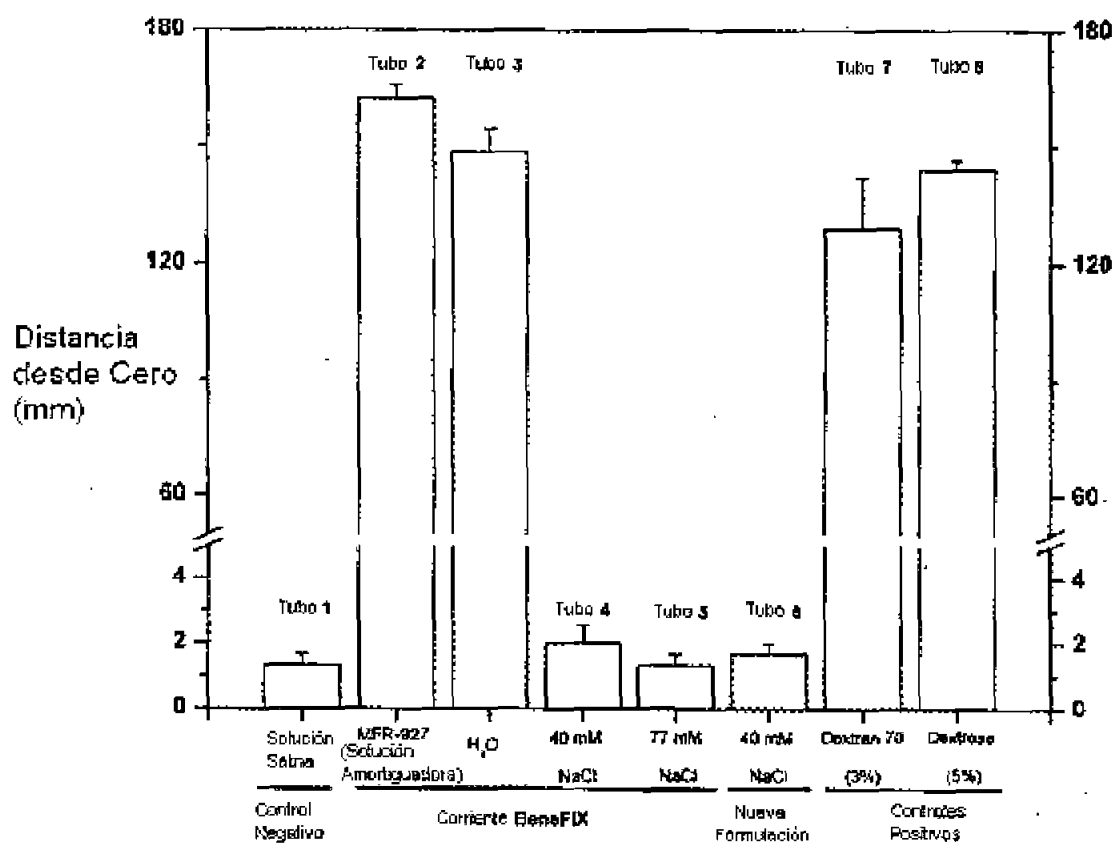


FIG. 2

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SUPERKO, Colleen
WILMER CUTLER PICKERING HALE & DORR LLP
60 State Street
Boston, MA 02109
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 06 February 2007 (06.02.2007)	
Applicant's or agent's file reference AM102155	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2006/042258	International filing date (day/month/year) 27 October 2006 (27.10.2006)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 01 November 2005 (01.11.2005)
Applicant WYETH et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
01 November 2005 (01.11.2005)	60/732,221	US	18 December 2006 (18.12.2006)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Dorothee Mülhausen

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 338 90 84

Telephone No. +41 22 338 96 72

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To: WILMER CUTLER PICKERING HALE AND DORR LLP Attn: Superko, Colleen 60 State Street Boston MA 02109 ETATS-UNIS D'AMERIQUE		NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION	
RE: <u>36119.237 WO1</u> Action Date: <u>12/22/07</u> <u>4</u> Action to be Taken: <u>Search</u> Docketed By: <u>HAL</u>		WILMER CUTLER PICKERING HALE AND DORR LLP DOCKETING HALE And DORR LLP DOCKETING 01/22/08 Written Opinion (PCT Rule 44.1) Date of mailing (day/month/year) 22/10/2007	
Applicant's or agent's file reference AM102155		FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below	
International application No. PCT/US2006/042258		International filing date (day/month/year) 27/10/2006	
Applicant WYETH			

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Joëlle Gerber
---	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AM102155	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/US2006/042258	International filing date (day/month/year) 27/10/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 01/11/2005
Applicant WYETH		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:



the international application in the language in which it was filed



a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1



as suggested by the applicant



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/042258

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K9/08 A61K9/19 A61K47/02 A61K47/18 A61K47/26 A61K38/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/058283 A (NOVO NORDISK HEALTH CARE AG [CH]; HANSEN BIRTHE LYKKEGAARD [DK]; JENSE) 30 June 2005 (2005-06-30) page 6, line 12 - line 37 page 50, line 7 - page 52, line 11; example 4	1-21, 23
X	VAN DEN BERG H M ET AL: "Benefix™ induces agglutination of red cells" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 96, no. 11 Part 1, 16 November 2000 (2000-11-16), page 641a, XP008083763 ISSN: 0006-4971 abstract	1-36
----- -/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 October 2007		Date of mailing of the international search report 22/10/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 opo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Marchand, Petra

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/042258

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/089712 A (WYETH CORP [US]; JUNEAU JENNIFER [US]; KNOWLES SUSAN [US]) 29 September 2005 (2005-09-29) paragraph [0006] paragraph [0009] paragraphs [0067], [0068] tables 2,7,12 examples 1-3 claims 1,12,26,27,29,31-37,43,45,49-52 -----	1-36
X	BUSH L ET AL: "THE FORMULATION OF RECOMBINANT FACTOR IX: STABILITY, ROBUSTNESS, AND CONVENIENCE" SEMINARS IN HEMATOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 35, no. 2, SUPPL 2, April 1998 (1998-04), pages 18-21, XP001010494 ISSN: 0037-1963 the whole document -----	33-36
X	US 3 717 708 A (WADA S ET AL) 20 February 1973 (1973-02-20) column 1, line 1 - line 17 column 3, line 40 - column 4, line 31 -----	1,2, 5-14,17
X	US 2001/031721 A1 (WEBB CHANDRA [US] ET AL) 18 October 2001 (2001-10-18) paragraph [0001] paragraph [0026] table 1 -----	1-14, 17-19
A	VAN OSS C J: "On the mechanism of the spontaneous aggregation of human erythrocytes at reduced ionic strength and PH" BIORHEOLOGY, ELSEVIER SCIENCE LTD., OXFORD, GB, vol. 21, no. 3, 1984, pages 415-416, XP008083758 ISSN: 0006-355X the whole document -----	1-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/042258

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005058283	A	30-06-2005	AU 2004298789 A1	30-06-2005
			BR PI0417721 A	03-04-2007
			CA 2549593 A1	30-06-2005
			CN 1917861 A	21-02-2007
			EP 1703899 A2	27-09-2006
			JP 2007519623 T	19-07-2007
			KR 20060109950 A	23-10-2006
			MX PA06006886 A	04-09-2006
			US 2007021338 A1	25-01-2007
WO 2005089712	A	29-09-2005	AU 2005225000 A1	29-09-2005
			BR PI0509117 A	28-08-2007
			CA 2554018 A1	29-09-2005
			EP 1720519 A1	15-11-2006
US 3717708	A	20-02-1973	CA 920948 A1	13-02-1973
US 2001031721	A1	18-10-2001	NONE	

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2006/042258

International filing date (day/month/year)
27.10.2006

Priority date (day/month/year)
01.11.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K9/08 A61K9/19 A61K47/02 A61K47/18 A61K47/26 A61K38/48

Applicant
WYETH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis 1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2260 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Marchand, Petra

Telephone No. +31 70 340-9527



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2006/042258

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2006/042258

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>3, 4, 15, 16, 27-29, 31, 32</u>
	No: Claims	<u>1, 2, 5-14, 17-26, 30, and 33-36</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-36</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-36</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2006/042258

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

1 Reference is made to the following documents:

- D1: WO 2005/058283 A (NOVO NORDISK HEALTH CARE AG [CH]; HANSEN BIRTHE LYKKEGAARD [DK]; JENSE) 30 June 2005 (2005-06-30)
- D2: VAN DEN BERG H M ET AL: "BeneFixTM induces agglutination of red cells" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 96, no. 11 Part 1, 16 November 2000 (2000-11-16), page 641a, XP008083763 ISSN: 0006-4971
- D3: WO 2005/089712 A (WYETH CORP [US]; JUNEAU JENNIFER [US]; KNOWLES SUSAN [US]) 29 September 2005 (2005-09-29)
- D4: BUSH L ET AL: "THE FORMULATION OF RECOMBINANT FACTOR IX: STABILITY, ROBUSTNESS, AND CONVENIENCE" SEMINARS IN HEMATOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 35, no. 2, SUPPL 2, April 1998 (1998-04), pages 18-21, XP001010494 ISSN: 0037-1963
- D5: US-A-3 717 708 (WADA S ET AL) 20 February 1973 (1973-02-20)
- D6: US 2001/031721 A1 (WEBB CHANDRA [US] ET AL) 18 October 2001 (2001-10-18).

2 Clarity (Article 6 PCT) and interpretation of claims

- 2.1 The application does not meet the requirements of Article 6 PCT, because claim 1 is not clear. The term "sufficient ionic strength to prevent erythrocyte agglutination" used is not clear, because the skilled person is left in doubt as to which ionic strengths are intended to be covered by the claim. The description offers in paragraph 10 various alternative interpretations, e.g. the solution should have at least about 25 mEq/L of Na⁺ and Cl⁻ ions, or at least about 40 mEq/L of Na⁺ and Cl⁻ ions, or at least about 40 mEq/L and less than about 150 mEq/L of Na⁺ and Cl⁻ ions, or a conductivity of at least about 4.0 mS/cm. For the interpretation of novelty, it has been assumed that a concentration of at least 25 mM NaCl (or equivalent of another salt) would be sufficient to prevent erythrocyte agglutination.

- 2.2 It is clear from the description (e.g. paragraphs 7, 10) that a certain ionic strength of the final solution is essential for the definition of the invention, because this is presented as essential for preventing erythrocyte aggregation upon administration of the formulation. In the present application this ionic strength is to be achieved by adding a solution comprising 25-150 mM sodium chloride to the formulation. Since independent claims 33-36 do not contain this feature or any other feature related to the ionic strength, they do not meet the requirement following from Article 6 PCT taken in combination with Rule 6.3(b) PCT that any independent claim must contain all the technical features essential to the definition of the invention.

3 Novelty (Article 33(2) PCT)

- 3.1 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1, 2, 5-14, 17-26, 30, and 33-36 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.
- 3.2 The document D1 discloses (example 4 on page 50, line 7 - page 52, line 11; in particular formulations F2, H2, N2, P2, V2, and Y2) a method for preparing pharmaceutical formulations for intravenous injection, the method comprising adding 50 mM sodium chloride solution (2,92 mg/ml) to lyophilized formulations comprising recombinant factor VIIa, glycylglycine, polysorbate 20, sucrose, and histidine. The prepared formulation has sufficient ionic strength to prevent erythrocyte aggregation (50 mM) and is about isotonic. The subject-matter of claims 1, 2, 5-14, 17, and 19 is therefore not new in view of D1.
- 3.3 The document D2 discloses (in the abstract) a method of preparing a pharmaceutical formulation for intravenous injection, the method comprising diluting the commercial BeneFix® (factor IX) preparation in "normal saline", which comprises about 150 mM sodium chloride. The document further discloses that BeneFix®-induced erythrocyte agglutination is caused not by the drug itself but by the vehicle, and that it could be prevented when the formulation was diluted in normal saline instead. The commercial BeneFix® preparation is known to comprise - prior to the addition of the diluent - the excipients histidine, glycine, sucrose, and polysorbate. The subject-matter of claims 1, 2, 5-14, 17-26, and 30 is therefore not new in view of D2.

- 3.4 The documents D3 (page 20, paragraph 67 - page 21, paragraph 68) and D4 (whole document; abstract; Fig. 2) disclose lyophilized factor IX formulations comprising 10 mM histidine, 1% sucrose, 50 mM sodium chloride, 0,005% polysorbate, and 260 mM glycine. The subject-matter of claims 33-36 therefore appears to be not new in view of D3 or D4.
- 3.5 The document D5 discloses (column 4, lines 12-31) a method comprising dissolving dry factor IX protein powder in a diluent of 0,05 M sodium citrate and 0,088 M sodium chloride to result in a final concentration of 25 units of factor IX/ml; the pH is buffered to 7,3 and after sterile filtration the solution is suitable for intravenous injection. In D5, the solution is then lyophilized. The subject-matter of claims 1, 2, 5-14, and 17 is therefore not new in view of D5.

4 Inventive step (Article 33(3) PCT)

- 4.1 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-36 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.
- 4.2 The subject-matter of claims 1, 2, 5-14, 17-26, 30, and 33-36 is not new and can therefore not involve an inventive step.
- 4.3 Dependent claims 3, 4, 15, 16, 27-29, 31, and 32 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, are either new or involve an inventive step with respect to the prior art named in the present proceedings. The reasons therefor are that the additional features of the said dependent claims are either known directly from document D3, or are a combination of features obvious to the skilled person in consideration of one or more documents D1-D6, or they concern minor modifications which lie within the normal practice of the skilled person.

Especially D2 and D3 appear to be highly relevant for IS. D3 already discloses (paragraph 68) that the final NaCl concentration in a reconstituted factor IX formulation should be ≥ 40 mM in order to reduce red blood cell agglutination when

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2006/042258

the formulation is administered. Whether the NaCl is present in the lyophilized cake (as in D3) or in the solution for reconstitution (as in the present application) appears to be a minor difference in implementation detail, which falls under the normal practice of the skilled person.

D6 also appears relevant for IS, in so far as it already discloses (paragraph 26; table 1) the use of 0,066 M NaCl as tonicity modifier in a commercial factor IX preparation (Mononine®).

5 Industrial applicability (Article 33(4) PCT)

- 5.1 Claims 1-36 meet the criterion of industrial applicability in the sense of Article 33(4) PCT.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPEA (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION

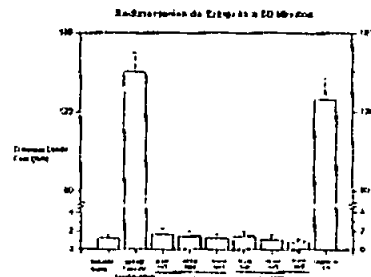
PCT X

MODELO DE UTILIDAD

DISEÑO INDUSTRIAL

146

(N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional: A61K 9/08, A61K 38/48, A61K 47/02, A61K 47/18, A61K 47/26	
(71) Solicitante(s) WYETH	
(72) Inventor(es) WEBB, Chandra, A. y ZERFAS, Julie	
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 60/732,221
	(32) Fecha 01/11/05
	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 01/06/08	(87) Publicación internacional:
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT	Fecha: 10/05/07
Fecha de presentación de la solicitud: 27/10/06	No. Publicación: WO/2007/053533
No. de solicitud PCT/US2006/042258	



(54) Título:
SOLUCION DE CLORURO DE SODIO PARA RECONSTITUCION O DILUCION DE FARMACO

(57) Resumen: La invención proporciona métodos para la preparación de formulaciones farmacéuticas para inyección tal que en la inyección la formulación no provoque la aglutinación de eritrocitos, hemólisis, y/o contracción de células. Para prevenir la aglutinación, una formulación farmacéutica preparada para inyección necesita tener una fuerza iónica suficiente. Para prevenir la hemólisis o la contracción de células, una formulación farmacéutica preparada para inyección necesita ser casi isotónica con respecto al plasma. La invención proporciona métodos que preparan formulaciones farmacéuticas para inyección que tienen tanto la fuerza iónica suficiente para prevenir la aglutinación y la tonicidad requerida para prevenir hemólisis o deshidratación o contracción de células significativas. Los métodos presentes involucran el uso de soluciones de cloruro de sodio que son alrededor de 25 mM hasta alrededor de 150 mM para reconstitución de tortas liofilizadas (u otras formulaciones farmacéuticas no líquidas) en solución o para dilución de soluciones de formulación farmacéutica.



No. 08-055550-00000-0000

Fecha: 2008-05-30 16:53:25 Dep. 2020 NUECREACION
Tra: 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folia: 148



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒ MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Descripción de la invención.	()	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ☒ INCOMPLETA	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA	()	()

Firma Responsable:

Fecha:

Mayo 30, 2008

148

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDÓÑEZ ALVARO

REFERENCIA	Radicación No.	8 55550
	Solicitud internacional	PCT/US2006/042258
	Fecha inicio fase nacional	01/06/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	8329

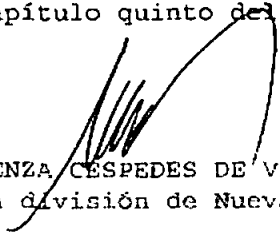
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 27 JUN. 2008
adpall