

FORMULACIONES QUE COMPRENDEN UN ÁCIDO NUCLEICO EN UNA ALTA CONCENTRACIÓN

1. REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/540,657, presentada el 3 de agosto de 2017, cuyo contenido se incorpora mediante esta referencia en su totalidad.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[001] El Defibrotide, una sal de ácido nucleico, es una mezcla compleja de secuencia aleatoria, predominantemente polidesoxirribonucleótidos monocatenarios derivados de ADN de mucosa animal. Tiene efectos protectores en las células endoteliales vasculares, particularmente aquellas de vasos sanguíneos pequeños y tiene propiedades antitrombóticas, antiinflamatorias y antiisquémicas.

[002] La sal de sodio de defibrotide es vendida comercialmente como Defitelio® (Gentium S.r.L., Villa Guardia, Italia) y está actualmente aprobada para el tratamiento de pacientes adultos y pediátricos con enfermedad venooclusiva hepática (VOD, por su sigla en inglés), también conocida como síndrome de obstrucción sinusoidal (SOS), con disfunción renal o pulmonar luego de un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT, por su sigla en inglés). Se administra a pacientes mediante infusiones intravenosas de 2 horas cada 6 horas durante un mínimo de 21 días. La frecuencia y los grandes volúmenes del régimen de infusión requiere que los pacientes tengan una segunda línea IV para la administración de defibrotide para evitar mezclar el defibrotide con otros fármacos que se deben administrar de forma IV. El régimen de tratamiento no sería compatible en una dosificación de un paciente ambulatorio para indicaciones de enfermedad adicionales para las cuales el defibrotide puede mostrar ser terapéutico. Por lo tanto, sería beneficioso administrar el defibrotide en una forma que sea más conveniente para que el paciente permita la dosificación en un ámbito de paciente ambulatorio, permitir a los pacientes autoadministrarse en sus hogares mediante un dispositivo de administración compatible, o reducir la duración de la dosificación y el volumen líquido en un entorno hospitalario. Por lo tanto, existe una necesidad de nuevas formulaciones de defibrotide que permitirían regímenes de dosificación más convenientes para los pacientes para la administración de dosis farmacéuticamente eficaces en el hogar.

3. COMPENDIO DE LA INVENCION

[003] Esta invención cubre un amplio rango de ácidos nucleicos y sus sales, que incluyen defibrotide, y la capacidad de elaborar formulaciones de alta concentración de estas moléculas

mientras mantienen la viscosidad y osmolaridad a niveles fisiológicamente relevantes. Estas formulaciones de alta concentración ofrecen numerosos beneficios al paciente, que incluyen por ejemplo, la capacidad de ser administradas de forma subcutánea y de ser administradas al paciente fuera de un ámbito hospitalario. Las ventajas de autoadministración y administración mediante otra vía que la IV son reconocidas por el paciente y sus familias así como por el hospital. La cantidad de tiempo y recursos que el hospital necesita para tratar y monitorear estos pacientes son reducidos de forma significativa lo cual proporciona una carga económica reducida tanto en el hospital como en el paciente. Las formulaciones proporcionadas en la presente están relacionadas específicamente con el defibrotide; sin embargo, se entiende que la invención aplica a un amplio rango de productos de nucleótidos, por ejemplo, productos de ARN o ADN de cadena simple y doble, tal como vacunas de ARN y ADN.

[004] Se proporcionan en la presente composiciones de ácido nucleico para administración terapéutica que puede ser administrada por múltiples vías parenterales y que pueden mejorar la calidad de vida para los pacientes al tener una duración más corta y/o menos frecuente de dosificación que los productos de ácido nucleico similares actualmente en el mercado. Más particularmente, se proporcionan formulaciones de ácido nucleico de alta concentración y baja viscosidad que pueden también ser administrados por vías diferentes de la intravenosa, que incluye por ejemplo, la vía subcutánea, intramuscular y/o intraperitoneal. En determinadas modalidades, las formulaciones de ácido nucleico de alta concentración se autoadministran y/o administran en una base de paciente ambulatorio. En modalidades específicas, el ácido nucleico es defibrotide. Las formulaciones de la invención se pueden usar para el tratamiento y/o prevención de condiciones numerosas que incluyen, por ejemplo, complicaciones relacionadas con el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) tal como síndrome de obstrucción sinusoidal o enfermedad venooclusiva hepática (VOD), Enfermedad de injerto versus huésped (GvHD, por su sigla en inglés), Microangiopatía trombótica asociada con trasplante (TA-TMA, por su sigla en inglés) o Síndrome de neumonía idiopática. Otras condiciones que incluyen, por ejemplo, otras TMA que incluyen púrpura trombocitopénica trombótica (TTP, por su sigla en inglés) y síndrome urémico hemolítico (HUS, por su sigla en inglés), isquemia de miocardio aguda, accidente cerebrovascular isquémico, lesión por isquemia-reperfusión en trasplantes de órganos sólidos, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, por su sigla en inglés), crisis vasooclusiva de células falciformes (VOC, por su sigla en inglés), síndrome torácico agudo relacionado con células falciformes, coagulación intravascular diseminada (DIC), sepsis, Insuficiencia renal, otras enfermedades de arteria periférica o coronaria, neoplasias malignas hematológicas o tumores sólidos.

[005] En algunos aspectos, la presente descripción proporciona formulaciones farmacéuticas

de baja viscosidad que comprende un ácido nucleico a una concentración de al menos 80 mg/mL. En algunas modalidades, la concentración de ácido nucleico es entre alrededor de 85 mg/mL y alrededor de 400 mg/mL. En algunas modalidades, la viscosidad de la formulación es: a) menos que alrededor de 70 cP; b) entre alrededor de 5 cP y 65 cP; o c) entre alrededor de 10 cP y alrededor de 65 cP. En algunas modalidades, la viscosidad se mide: a) a temperatura ambiente; b) entre alrededor de 15 °C y alrededor de 35°C; o c) entre alrededor de 21°C y alrededor de 23°C.

[006] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica de baja viscosidad comprende además glicilglicina. En algunas modalidades, la concentración de glicilglicina es a) entre alrededor de 5 mM y alrededor de 100 mM; b) entre alrededor de 5 mM y 60 mM; o c) entre alrededor de 10 mM y alrededor de 40 mM.

[007] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica de baja viscosidad tiene una osmolaridad de a) entre alrededor de 240 mOsm/kg y alrededor de 600 mOsm/kg; o b) entre alrededor de 300 mOsm/kg y alrededor de 550 mOsm/kg.

[008] En algunas modalidades, el ácido nucleico en la formulación farmacéutica de baja viscosidad comprende polinucleótidos u oligonucleótidos de ácido ribonucleico o ácido desoxirribonucleico. En algunas modalidades, el peso molecular del ácido nucleico es a) entre alrededor de 5.000 a alrededor de 50.000 daltons; b) entre alrededor de 13.000 a alrededor de 30.000 daltons; o c) entre alrededor de 16.000 a alrededor de 20.000 daltons.

[009] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende secuencias aleatorias polidispersas. En algunas modalidades, el ácido nucleico está presente como polidesoxirribonucleótidos predominantemente monocatenarios.

[0010] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica de baja viscosidad comprende polidesoxirribonucleótidos de cadena simple que son secuencias aleatorias que corresponden a la siguiente fórmula:

[0011]
$$P1-5,(dAp)12-24,(dGp)10-20,(dTp)13-26,(dCp)10-20$$

[0012] donde: P=radical fosfórico

[0013] dAp=monómero desoxiadenílico

[0014] dGp=monómero desoxiguanílico

[0015] dTp=monómero desoxitimidílico

[0016] dCp=monómero desoxicitidílico

[0017] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica de baja viscosidad comprende un amortiguador o excipiente seleccionado de citrato de sodio, succinato de sodio, histidina, amortiguador TRIS, amortiguador HEPES, cloruro de sodio, arginina, lidocaína y/o polisorbato 80. En algunas

modalidades, la formulación de baja viscosidad comprende un amortiguador o excipiente para que el ácido nucleico se encuentre en la forma de una sal de metal alcalina. En algunas modalidades, el amortiguador o excipiente incluye una sal de sodio. En algunas modalidades, el amortiguador o excipiente es citrato de sodio, succínico de sodio o cloruro de sodio. En algunas modalidades, el

5 amortiguador o excipiente es citrato de sodio, succínico de sodio o cloruro de sodio a una concentración de menos de alrededor de 80 mM de sal de sodio.

[0018] En algunas modalidades, el amortiguador o excipiente es citrato de sodio a una concentración de entre 20-34 mM.

[0019] En algunos aspectos, la presente descripción proporciona formulaciones farmacéuticas de baja viscosidad que comprenden entre 85 mg/mL a alrededor de 400 mg/mL de una composición que comprende más de 70 % de polidesoxirribonucleótidos polidispersos de cadena simple, donde cada polidesoxirribonucleótido comprende entre 45 y 65 bases y tiene un peso molecular medio entre 13 kDa y 20 kDa, y glicilglicina a una concentración de entre alrededor de 5 mM y alrededor de 100 mM.

15 **[0020]** En algunos aspectos, la presente descripción proporciona formulaciones farmacéuticas de baja viscosidad que comprenden entre 150 mg/mL a alrededor de 250 mg/mL de una composición de ácido nucleico que comprende más de 70 % de polidesoxirribonucleótidos polidispersos de cadena simple, donde cada polidesoxirribonucleótido comprende entre 45 y 65 bases y tiene un peso molecular medio entre 13 kDa y 20 kDa, y glicilglicina a una concentración de entre alrededor de 5 mM

20 y alrededor de 60 mM, donde la formulación tiene una viscosidad entre alrededor de 5 y alrededor de 70cP cuando se mide a entre 15°C y 25°C, y una osmolaridad entre alrededor de 300 mOsm/kg y 550 mOsm/kg, y donde la formulación se formula para administración parenteral a un paciente.

[0021] En algunos aspectos, la presente descripción proporciona formulaciones farmacéuticas de baja viscosidad que comprenden entre 100 mg/mL a alrededor de 400 mg/mL de defibrotide, y

25 glicilglicina a una concentración de entre alrededor de 5 mM y alrededor de 60 mM, donde la formulación tiene una viscosidad entre alrededor de 5 y alrededor de 60cP cuando se mide a entre 15°C y 25°C, y una osmolaridad entre alrededor de 240 mOsm/kg y 700 mOsm/kg, y donde la formulación se formula para administración parenteral a un paciente.

[0022] En algunas modalidades, la viscosidad en la formulación farmacéutica de baja viscosidad disminuye con el tiempo. En algunas modalidades, la viscosidad disminuye durante el almacenamiento. En algunas modalidades, la viscosidad disminuye bajo el aumento de fricción, agitación y/o presión. En algunas modalidades, la fricción aumenta durante la administración de la formulación farmacéutica. En algunas modalidades, la fricción aumenta durante la administración de la

30

formulación farmacéutica a través de una aguja o dispositivo.

[0023] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica de baja viscosidad es formulada para administración subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. En algunas modalidades, la formulación demuestra una semivida sistémica extendida en comparación con una formulación administrada mediante administración intravenosa. En algunas modalidades, la formulación administrada de forma subcutánea muestra relaciones de picos respecto a mínimos inferiores de concentraciones de plasma en comparación con una formulación administrada mediante administración intravenosa. En algunas modalidades, la formulación administrada de forma subcutánea muestra eficacia mejorada y/o un perfil de seguridad mejorado en comparación con una formulación administrada mediante administración intravenosa.

[0024] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica de baja viscosidad es isotónica o tixotrópica.

[0025] En algunas modalidades, la formulación farmacéutica de baja viscosidad puede ser autoadministrada por un paciente.

[0026] En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un dispositivo para administración subcutánea de formulaciones de baja viscosidad que comprende un ácido nucleico a una concentración de al menos 80 mg/mL.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona métodos para tratar una enfermedad que comprende administrar la formulación de baja viscosidad de cualquiera de las reivindicaciones 1-33, donde la enfermedad se selecciona de trombosis, complicaciones relacionadas con el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) que incluye síndrome de obstrucción sinusoidal o enfermedad venooclusiva hepática (VOD), enfermedad de injerto versus huésped (GvHD), Microangiopatía trombótica asociada con trasplante (TA-TMA) o Síndrome de neumonía idiopática, otras TMA que incluyen púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y síndrome urémico hemolítico (HUS), isquemia de miocardio aguda, accidente cerebrovascular isquémico, lesión por isquemia-reperfusión en trasplantes de órganos sólidos, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), crisis vasooclusiva de células falciformes (VOC), síndrome torácico agudo relacionado con células falciformes, coagulación intravascular diseminada (DIC), sepsis, Insuficiencia renal, otras enfermedades de arteria periférica o coronaria, neoplasias malignas hematológicas o tumores sólidos.

[0027] En algunas modalidades, la formulación de baja viscosidad se administra a un régimen de dosificación que proporciona una calidad de vida mejorada del paciente al requerir un volumen de administración reducido y/o permitir una administración menos frecuente.

[0028] Por lo tanto en una modalidad, se proporciona una formulación de baja viscosidad para

administración terapéutica a un paciente, que comprende un ácido nucleico; donde el ácido nucleico está presente en una concentración de al menos 80 mg/mL. En algunas modalidades, el ácido nucleico está presente en una concentración entre 85 y 400 mg/mL. En algunas modalidades, el ácido nucleico está presente en una concentración que es al menos 85, 90, 95, o 100 mg/mL. El ácido nucleico puede estar presente en una concentración entre 100 y 400 mg/mL, o 100 y 300 mg/mL. En algunas modalidades, el ácido nucleico tiene entre 45 y 65 bases y/o un peso molecular medio entre 13 y 20 kDa. En determinadas modalidades, el ácido nucleico es predominantemente de cadena simple. Por lo tanto preferentemente, el ácido nucleico es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % de cadena simple. En algunas modalidades, hasta 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, o hasta 30 % de las bases en el ácido nucleico están emparejadas. En otras modalidades, el ácido nucleico es hasta 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, o hasta 30 % de doble cadena.

[0029] En algunas modalidades, el ácido nucleico está presente como una sal de metal alcalino. En determinadas modalidades, la sal de metal alcalino es una sal de sodio. En modalidades específicas, el ácido nucleico es predominantemente polidesoxirribonucleótidos de cadena simple. En algunas modalidades preferidas, el ácido nucleico es predominantemente sales de sodio polidesoxirribonucleicas de cadena simple. En modalidades específicas, el ácido nucleico es defibrotide.

[0030] Para una conveniencia del paciente mejorada es importante que los inyectables sean administrados a pacientes como formulaciones terapéuticas tixotrópicas y/o isotónicas de baja viscosidad. En el caso de defibrotide, mientras la concentración aumenta un cambio muy pequeño en los resultados de la concentración es un gran cambio en la viscosidad y esta variación es afectada adicionalmente por la temperatura. La invención actual permite que la concentración aumente mientras aun cumple con los criterios para los elementos biológicos inyectables bien tolerados.

[0031] Por lo tanto, en una modalidad, las formulaciones anteriores tienen una viscosidad que es menor que 70 centipoise (cP). En una modalidad, la viscosidad es entre 5 y 65 cP, o 10 y 60 cP. Preferentemente la viscosidad se mide en condiciones de temperatura ambiente, tal como desde 15 °C a 35 °C. Más preferentemente, la viscosidad se mide entre 18°C y 25°C. Incluso más preferentemente, la viscosidad se mide a entre 21°C y 23°C.

[0032] En otra modalidad, las formulaciones anteriores tienen una osmolaridad de entre 240 y 700 mOsm/kg. En otras modalidades, las formulaciones anteriores tienen una osmolaridad de entre 300 y 500 mOsm/kg. En modalidades específicas, las formulaciones anteriores tienen un pH entre 6.8 y 8.5 o entre 7 y 8.

[0033] Determinados amortiguadores o excipientes se pueden usar para controlar la

estabilidad, viscosidad y/u osmolaridad. En una modalidad, las formulaciones anteriores comprenden uno o más amortiguadores o excipientes. En determinadas modalidades, el excipiente se selecciona del grupo que consiste en citrato de sodio, succinato, cloruro de sodio, arginina, lisina, lidocaína o polisorbato-80 ("PS-80"). En algunas modalidades, el amortiguador se selecciona del grupo que

5 consiste en glicilglicina, histidina, tris(hidroximetil)aminometano ("TRIS"), citrato de sodio, o amortiguador de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanesulfónico ("HEPES"). En una modalidad preferida, el amortiguador es un dipéptido, tal como por ejemplo L-Carnosina o glicilglicina. La glicilglicina sola y en combinaciones con otros excipientes mejora las propiedades de solución de la formulación al minimizar la viscosidad y/u osmolaridad para una concentración dada de ácido nucleico.

10 Las formulaciones que contienen glicilglicina manifiestan atributos de solución que se optimizan mejor en condiciones fisiológicamente relevantes que se sabe que mejoran la tolerabilidad y minimizan las molestias tras la inyección. Por lo tanto, en una modalidad, se proporciona una formulación de baja viscosidad para administración terapéutica a un paciente, que comprende un ácido nucleico; donde el ácido nucleico está presente en una concentración de al menos 80 mg/mL; y glicilglicina. En algunas

15 modalidades preferidas, el ácido nucleico es defibrotide. El defibrotide manifiesta pseudoplasticidad no newtoniana y comportamiento tixotrópico en formulaciones líquidas, y este comportamiento es visiblemente evidente en formulaciones líquidas de concentraciones elevadas. Por lo tanto, en determinadas modalidades, se proporciona una formulación de baja viscosidad para administración terapéutica a un paciente, que comprende al menos 80 mg/mL de una solución de defibrotide; y

20 glicilglicina. En algunas modalidades, la glicilglicina está presente en una cantidad entre 5 y 100 mM. Más preferentemente, la glicilglicina está presente en una cantidad entre 5 y 60 mM o 10 y 40 mM.

[0034] En otra modalidad, se proporciona una formulación de baja viscosidad para administración terapéutica a una paciente, que comprende: entre 100 y 300 mg /mL de un ácido nucleico que contiene más de 70 % polidesoxirribonucleótidos polidispersos de cadena simple que

25 tienen entre 45 y 65 bases y un peso molecular medio entre 13 y 20 kDa; y un excipiente que comprende glicilglicina en una cantidad entre 10 y 60 mM. En aun otra modalidad, se proporciona una formulación de baja viscosidad para administración terapéutica a una paciente, que comprende: entre 150 y 250 mg /mL de un ácido nucleico que contiene más de 70 % polidesoxirribonucleótidos polidispersos de cadena simple que tienen una longitud media entre 45 y 65 bases y un peso

30 molecular medio entre 13 y 20 kDa; un excipiente que comprende glicilglicina en una cantidad entre 10 y 100 mM; y donde la formulación tiene una viscosidad entre 5 y 70 cP, y/o una osmolaridad de entre 240 y 550 mOsm/kg y es adecuada para la administración parenteral a un paciente. En algunas modalidades preferidas, el ácido nucleico es defibrotide.

[0035] En una modalidad, se proporciona una formulación de baja viscosidad para administración terapéutica a una paciente, que comprende: entre 100 y 300 mg defibrotide/mL, que comprende más de 70 % polidesoxirribonucleótidos polidispersos de cadena simple que tienen una longitud media entre 45 y 65 bases y un peso molecular medio entre 13 y 20 kDa; un excipiente que comprende glicilglicina en una cantidad entre 10 y 100 mM; donde la formulación tiene una viscosidad entre 5 y 70 cP, una osmolaridad de entre 240 y 500 mOsm/kg y es adecuada para la administración parenteral a un paciente.

[0036] En una modalidad, se proporciona un método para administrar una formulación de baja viscosidad de la invención de forma parenteral. En algunas modalidades, la formulación es adecuada para la administración subcutánea. En determinadas modalidades, las formulaciones comprenden un dispositivo para la administración subcutánea que incluye la autoadministración. En una modalidad preferida, se proporciona un método para administrar de forma subcutánea una dosis de defibrotide durante 5 minutos hasta 3 horas en medio de 5 y 50 mL de fluido acuoso.

[0037] En otros aspectos, se proporcionan en la presente métodos para elaborar las formulaciones descritas en la presente. En aspectos adicionales, se proporcionan métodos para empacar una formulación de la invención. En determinados aspectos, se proporcionan métodos para empacar una formulación de la invención en un dispositivo que es capaz de administración subcutánea.

[0038] En una modalidad, las formulaciones anteriores se pueden usar para la autoadministración por parte de los pacientes. En determinadas modalidades, las formulaciones anteriores se pueden usar para su administración fuera de un ámbito hospitalario.

[0039] En algunas modalidades, la afección o enfermedad es VOD hepática con disfunción renal o pulmonar luego del trasplante de células madres hematopoyéticas.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0040] La FIGURA 1A es una gráfica que muestra la viscosidad de varias formulaciones como una función de concentración de defibrotide que usa 3 amortiguadores de formulación diferentes: citrato de sodio (rombos), glicilglicina (cuadrados) o una mezcla de citrato de sodio y glicilglicina (triángulos).

[0041] La Figura 1B es una gráfica que muestra la viscosidad como una función de temperatura de formulaciones que contienen citrato de sodio (rombos azules), GlyGly (cuadrados rojos), o GlyGly y citrato de sodio (triángulos verdes).

[0042] La Figura 1C es una gráfica que muestra la disminución de la viscosidad en el tiempo

en formulaciones que contienen GlyGly 20 mM (círculos azules), GlyGly 20 mM y citrato de sodio 34 mM (cuadrados naranjas), GlyGly 20 mM y succinato de sodio 100 mM (triángulos azules) y GlyGly 20 mM y cloruro de sodio 20 mM (rombos rojos).

[0043] La FIGURA 1D es una gráfica que muestra la osmolaridad de varias formulaciones como una función de la concentración de defibrotide que usa ya sea citrato de sodio (rombos) o glicilglicina (cuadrados).

[0044] La FIGURA 2A es una gráfica que muestra la viscosidad de 200 mg/mL de formulaciones de defibrotide en la presencia de varios amortiguadores o excipientes.

[0045] La FIGURA 2B es una gráfica que muestra la osmolaridad de 200 mg/mL de formulaciones de defibrotide en la presencia de varios amortiguadores o excipientes.

[0046] La FIGURA 3A es una gráfica que muestra el aumento de la osmolaridad como una función de las sales de sodio.

[0047] La FIGURA 3B es una gráfica que muestra la viscosidad en función del tiempo de formulaciones de defibrotide de 180 mg/mL en la presencia de amortiguadores de glicilglicina y soluciones de citrato de sodio (que contienen 0, 20, 34, 80, o 100 mM de citrato de sodio).

[0048] La FIGURA 4 es una gráfica que muestra los efectos de la temperatura en función del tiempo en la viscosidad de formulaciones de defibrotide de 200 mg/mL que contienen amortiguador de glicilglicina.

[0049] La FIGURA 5A es una gráfica que muestra los efectos de la temperatura en función del tiempo en la osmolaridad de formulaciones de defibrotide de 200 mg/mL que contienen amortiguador de citrato.

[0050] La FIGURA 5B es una gráfica que muestra los efectos de la temperatura en función del tiempo en la osmolaridad de formulaciones de defibrotide de 200 mg/mL que contienen amortiguador de glicilglicina.

[0051] La FIGURA 6 es una gráfica que muestra la farmacocinética de tres formulaciones de defibrotide de 200 mg/mL diferentes de la invención administradas de forma subcutánea usando un modelo animal en comparación con la administración subcutánea e intravenosa de Defitelio® disponible comercialmente.

[0052] La FIGURA 7 es una gráfica que muestra perfiles farmacocinéticos simulados de defibrotide luego de infusiones de 2 horas 4 veces al día de 6,25 mg/kg y la administración subcutánea 2 veces al día de 18 mg/kg asumiendo un 70 % de biodisponibilidad.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0053] El defibrotide (número CAS 83712-60-1) es una sustancia derivada de materiales de origen natural. Es la sal de sodio de polidesoxirribonucleótidos de peso molecular relativamente bajo que se obtienen mediante extracción de mucosa animal. El defibrotide tiene un rango de tamaño diverso y se conoce por tener un peso molecular (MW, por su sigla en inglés) medio entre 13 y 20 kDa.

5 El Defibrotide se puede obtener de acuerdo con la patente estadounidense n.º 4.985.552 y la patente estadounidense n.º 5.223.609 y/o presenta las características físicas/químicas descritas en la misma patente estadounidense n.º 4.985.552 y la patente estadounidense n.º 5.223.609, cada una de las cuales se incorpora a la presente mediante esta referencia. El defibrotide sintético, presentado como oligonucleótidos de fosfodiéster que imitan la acción terapéutica de defibrotide se describen en
10 US20110092576 la cual se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

[0054] El defibrotide tiene aplicaciones terapéuticas numerosas, que incluye el uso de un agente anti-trombótico (patente estadounidense n.º 3.829.567), tratamiento de arteriopatías periféricas, tratamiento de insuficiencia renal aguda (patente estadounidense n.º 4.694.134), y el tratamiento de isquemia de miocardio agudo (patente estadounidense n.º 4.693.995). Más recientemente, el
15 defibrotide ha sido usado para el tratamiento y prevención del síndrome de obstrucción sinusoidal/enfermedad venooclusiva (ensayo clínico EU EudraCT:2004-000592-33, ensayo clínico US 2005-01 (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00358501). Los pacientes son tratados con una dosis de 6,25 mg/kg dosis proporcionada por una infusión intravenosa de dos horas cada seis horas hasta que los signos y síntomas de VOD se mitiguen. Como se menciona anteriormente, el Defibrotide se vende
20 actualmente bajo el nombre Defitelio® como un solo vial para inyección (comercialmente disponible de Gentium S.r.L., Villa Guardia, Italia; ver el prospecto del paquete disponible en dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/search.cfm?labeltype=all&query=defibrotide). Defitelio® se prepara como una infusión intravenosa mediante una dilución en inyección de Dextrosa al 5 %, USP o inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP. La preparación intravenosa se usa dentro de 4 horas si
25 se almacena a temperatura ambiente o dentro de 24 horas si se almacena bajo refrigeración. Se administra durante un total de 8 horas en 4 infusiones intravenosas.

[0055] El desarrollo de formulaciones de defibrotide novedosas y/o formas de dosificación para administración mediante vías de administración intravenosa (IV), subcutánea (SC), intramuscular (IM), u oral (PO) pueden ofrecer calidad mejorada de vida para los pacientes que están siendo sometidos a
30 tratamiento. Por ejemplo, disminuir la frecuencia de 4 veces al día a una o dos veces por día así como disminuir la duración de las infusiones puede ofrecer calidad de vida mejoradas a los pacientes mientras son tratados. La vía SC de administración de defibrotide puede ofrecer una reducción considerable de tiempo para la administración clínica y permitir la dosificación al paciente ambulatorio

del producto durante el tiempo que sea necesario. Los productos de combinación que incluyen dispositivos de administración SC de grandes volúmenes pueden también ofrecer una mayor conveniencia y administración más rápida por profesionales de la salud (HCP, por su sigla en inglés), cuidadores o incluso la autoadministración por los pacientes. La vía oral de administración se puede asociar con la facilidad de preparación de dosis y administración, dolor reducido y generalmente es preferido por los pacientes. Los ejemplos de estudios de desarrollo de la formulación, administración de fármacos y formas de dosificación enumeradas anteriormente se enfocan en mejorar la calidad de vida y la experiencia de los pacientes mientras están en tratamiento con defibrotide.

[0056] En algunas modalidades, la vía de administración afecta la eficacia y/o longevidad de las formulaciones de la presente descripción. En algunas modalidades, la administración subcutánea, intramuscular y/o intraperitoneal se asocia con una semivida sistémica extendida en comparación con la misma formulación administrada de forma intravenosa. En algunas modalidades, la administración subcutánea de la formulación proporciona relaciones de picos respecto a mínimos inferiores de concentraciones de plasma en comparación con la misma formulación administrada de forma intravenosa. En algunas modalidades, la administración subcutánea proporciona una eficacia mejorada y/o mejora el perfil de seguridad de la formulación en comparación con la misma formulación administrada de forma intravenosa.

5.1 DEFINICIONES

Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de la presente invención:

[0057] Tal como se usa en la presente, el término “ácido nucleico” incluye “ácidos nucleicos y sus sales” y se refiere a moléculas que comprenden nucleótidos, que incluyen polímeros o biomoléculas grandes compuestas de unidades de nucleótidos juntos en una cadena; esto incluye polinucleótidos y oligonucleótidos que incluyen aquellos que comprenden monómeros de ribosa y/o desoxirribosa; pueden ser uniformes en tamaño y/o secuencia o pueden ser polidispersos; pueden ser de cualquier longitud, que incluye una mezcla de diferentes longitudes, pero algunas modalidades tienen generalmente entre 10-400 bases, 20-200 bases, o 45-60 bases de largo; en algunas modalidades el MW medio es entre 5 y 50 kilodaltons (“kDa”), entre 13 y 30 kDa, o entre 13 y 20 kDa, o entre 16 y 20 kDa; pueden ser modalidades que son mayormente sales de polidesoxirribonucleótido de cadena simple dentro de los límites mencionados en otra parte en la presente solicitud. Esto también incluye secuencias de ADN que se obtienen de la despolimerización controlada de ADN genómico de mucosa intestinal de animal y, como una modalidad, incluye defibrotide.

[0058] Tal como se usa en la presente, el término “defibrotide” se refiere a fuentes tanto naturales como sintéticas de defibrotide, que incluye oligonucleótidos de fosfodiéster sintético tal como

se describe en la solicitud de patente estadounidense número 20110092576. El término defibrotide identifica un polidesoxirribonucleótido que se obtiene mediante la extracción de los tejidos vegetales y/o animales pero que pueden ser producidos de forma sintética; el polidesoxirribonucleótido normalmente se usa en la forma de una sal de metal alcalino, generalmente una sal de sodio, y
 5 generalmente tiene un peso molecular de 13 to 30 kDa (número de registro CAS: 83712-60-1). Preferentemente, el defibrotide se obtiene de acuerdo con la patente estadounidense n.º 4.985.552 y la patente estadounidense n.º 5.223.609 y/o presenta las características físicas/químicas descritas en la misma patente estadounidense n.º 4.985.552 y la patente estadounidense n.º 5,223,609, que se incorpora a la presente mediante referencia. Más en particular, el defibrotide es una mezcla de
 10 polidesoxirribonucleótidos que tienen la fórmula de la secuencia aleatoria: P1-5, (dAP)₁₂₋₂₄, (dGP)₁₀₋₂₀, (dPp)₁₃₋₂₆, (dCP)₁₀₋₂₀, donde: P=radical fosfórico; dAp=monómero desoadenílico; dGp=monómero desoguanílico; dTp=monómero desoxitimidínico; dCp=monómero desoxicitidínico; y/o muestra las siguientes características químicas/físicas: electroforesis = movilidad anódica homogénea, y/o coeficiente de extinción, $E_1 \text{ cm}^{1\%}$ a $260 \pm 1 \text{ nm}$ $\text{nm} = 220 \pm 10$, y/o $E_{230}/E_{260} = 0.45 \pm 0.04$, y/o coeficiente de
 15 extinción molar (referido como fósforo) $\epsilon(P) = 7.750 \pm 500$, y/o poder rotatorio $[\alpha]_D^{20} = 53^\circ \pm 6$; y/o hipercromicidad reversible, que se indica como % en ADN nativo y/o $h = 15 \pm 5$.

[0059] Tal como se utiliza en la presente, el término “polidesoxirribonucleótido” hace referencia a un polímero cuyo monómero constituyente es un desoxirribonucleótido.

[0060] Tal como se usa en la presente, el término “oligodesoxirribonucleótido” se refiere a
 20 cualquier oligonucleótido compuesto de monómeros de desoxirribosa.

[0061] Tal como se utiliza en la presente, el término “MW medio” se refiere al peso molecular promedio o medio del polímero.

[0062] El término “glicilglicina” o “Gly-Gly” o “GlyGly” o “glygly” tal como se utiliza en la presente, se refiere a un péptido simple, hecho de dos moléculas de glicina (la glicina es un
 25 aminoácido no esencial simple); el dipéptido se usa en la síntesis de péptidos más complicados. La glicilglicina, un anfolito, también a veces es referida como una diglicina, diglicocoll, dipéptido de glicina, *N*-glicilglicina. Se puede elaborar mediante métodos tales como aquellos descritos en la solicitud de patente CN 101759767, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

[0063] El término “excipiente”, tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier
 30 sustancia que se puede formular con defibrotide y puede ser incluida con el fin de mejorar la defibrotide en la forma de dosificación final, tal como facilitar su biodisponibilidad, reducir la viscosidad y/o osmolaridad, aumentar la solubilidad de la composición o aumentar la estabilidad a largo plazo. Los excipientes también pueden ser útiles en el proceso de fabricación, para ayudar en el manejo de la

sustancia activa. La selección de los excipientes apropiados también depende de la vía de administración y la forma de dosificación, así como el ingrediente activo y otros factores. Por consiguiente, el defibrotide se puede combinar con cualquier excipiente conocido en la técnica que permite personalizar su rendimiento durante la elaboración o administración así como su rendimiento in vitro e in vivo. Muchos de estos excipientes se pueden usar para personalizar los perfiles farmacocinéticos de formulaciones de defibrotide.

[0064] El término “amortiguador” o “agente amortiguador”, tal como se usa en la presente, se refiere a una solución que resiste cambios en la concentración de ion de hidrógeno en la adición de una pequeña cantidad de ácido o base. Esto incluye, por ejemplo, un ácido o base débil que se usa para mantener el pH de una solución cerca de un valor de pH elegido después de la adición de otro compuesto ácido o básico. La función de tal amortiguador o agente amortiguador es evitar un cambio en el pH de una solución cuando los ácidos o bases se agregan a dicha solución.

[0065] El término “agente de ajuste de pH”, tal como se usa en la presente, se refiere a un ácido o base usado para alterar el pH de una solución hasta un valor de pH elegido. La función de tal agente es alterar el pH de una solución al valor deseado posterior a la adición de compuestos ácidos o básicos.

[0066] El término “formulación”, tal como se usa en la presente, se refiere a composiciones para uso terapéutico, que incluye, por ejemplo, una preparación farmacéuticamente aceptable y estable de una composición o formulación farmacéutica descrita en la presente.

[0067] El término “formulación de baja viscosidad”, tal como se utiliza en la presente, se refiere a una formulación que tiene una viscosidad que es menor que alrededor de 70 centipoise (cP). La viscosidad normalmente se mide a temperaturas ambiente de (por ejemplo, 15 °C a 35 °C; entre 18 °C a 25 °C o entre 21 °C a 23 °C) según la región geográfica y/o condiciones ambientales de la habitación en la que se mide.

[0068] El término “formulación acuosa”, como se usa en la presente, se refiere a una formulación a base de agua, en particular, una formulación que se encuentra en una solución acuosa.

[0069] El término “formulación de alta concentración” o “formulación líquida de concentración elevada” o “HCLF” tal como se usa en la presente, se refiere a esas formulaciones donde la concentración del ácido nucleico es alrededor de 80 mg/mL o mayor; o alrededor de 85 mg/mL o mayor.

[0070] El término “formulaciones de defibrotide de alta concentración” tal como se usa en la presente, se refiere a aquellas formulaciones donde la concentración de defibrotide es alrededor de 80 mg/mL o mayor.

[0071] El término “farmacocinética” o “PK”(por su sigla en inglés) tal como se usa en la presente, se refiere al movimiento in vivo de un agente individual en el cuerpo, que incluye los perfiles de tiempo de la concentración de plasma y parámetros de cinética como la concentración máxima (C_{máx}), área bajo la curva (AUC), y tiempo hasta la concentración máxima de dicho agente (T_{máx}).

5 **[0072]** La frase “farmacéuticamente aceptable” o “aceptable”, tal como se usa con relación a las composiciones de la invención, se refiere a las entidades moleculares y otros ingredientes de tales composiciones que son fisiológicamente tolerables y que no producen típicamente reacciones adversas cuando se administran a un animal y/o ser humano. Preferentemente, tal como se usa en la presente, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del
10 gobierno federal o estatal o indicado en la farmacopea estadounidense o en otra farmacopea reconocida en términos generales para su uso en mamíferos y, más particularmente, en humanos.

[0073] El término “fisiológicamente relevante” tal como se usa en la presente, se refiere a una medición, nivel o cantidad que es adecuada para usar en una forma de dosificación farmacéutica, terapéutica u otra a ser administrada a un sujeto animal, particularmente un sujeto humano.

15 **[0074]** Tal como se usa en la presente, el término “parenteral” se refiere a cualquier medio de administración no oral. Incluye la inyección intravenosa (i.v. o IV), inyección de bolo IV, subcutánea (s.c. o SC) e intramuscular (i.m. o IM).

[0075] Tal como se utilizan en la presente, las expresiones “que se administra” o “administración” pretenden comprender todos los medios de administración directa o indirecta de un
20 compuesto a su sitio de acción previsto.

[0076] Tal como se usa en la presente, el término “animal” significa cualquier animal, que incluye mamíferos y, en particular, humanos.

[0077] Tal como se usa en la presente, el término “paciente” se refiere a un mamífero, particularmente, un ser humano. Los pacientes a ser tratados por lo métodos de las modalidades
25 descritas incluyen ambos sujetos humanos y sujetos animales (por ejemplo, perro, gato, mono, chimpancé, y/o similar) para fines veterinarios. Los pacientes pueden ser masculinos o femeninos y pueden tener cualquier edad adecuada, por ejemplo, neonatales, infantes, jóvenes, adolescentes, adultos o geriátricos.

[0078] Los términos “tratar”, “que trata” o “tratamiento” y similares tal como se usa en la presente, se refieren a un método para aliviar o abrogar una enfermedad y/o sus síntomas presentes.
30 Por ejemplo, dentro del significado de la presente invención, el término “tratar” también denota detener, retrasar la aparición (o sea, el período anterior a la manifestación clínica de una enfermedad) y/o reducir el riesgo de desarrollo o aumento de la gravedad de una enfermedad.

[0079] Los términos “un” y “una”, cuando se usan para modificar el ingrediente de una composición, tal como, agente activo, agente amortiguador, y Osmolite, no denotan una limitación de cantidad, sino que denotan la presencia de al menos uno de los artículos mencionados. El término “o” o “y/o” se usa como una palabra funcional para indicar que dos palabras o expresiones se deben 5 tomar juntas o individualmente. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan “que incluye, de modo no taxativo”). Los puntos finales de todos los intervalos dirigidos al mismo componente o propiedad son inclusivos y se pueden combinar independientemente.

[0080] A través de la presente memoria descriptiva, los término “alrededor de” y/o 10 “aproximadamente” se pueden utilizar junto con intervalos y/o valores numéricos. El término “alrededor de” se entiende que significa aquellos valores cercanos al valor mencionado. Por ejemplo, “alrededor de 1200 [unidades]” puede significar dentro de $\pm 10\%$ de 1200, dentro de $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 7\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, menos de $\pm 1\%$, o cualquier otro valor o intervalo de valores en este. Además, las frases “menor que alrededor de [un valor]” o “mayor que alrededor de [un valor]” 15 deben comprenderse en función de la definición del término “alrededor de” proporcionado en la presente. Los términos “alrededor de” y “aproximadamente” pueden usarse de forma indistinta.

[0081] A través de la presente memoria descriptiva, se proporcionan intervalos numéricos para determinadas cantidades. Debe entenderse que estos intervalos comprenden todos los subintervalos en estos. Por lo tanto, el intervalo “de 50 a 80” incluye todos los intervalos posibles en estos (por 20 ejemplo, 51-79, 52-78, 53-77, 54-76, 55-75, 70-70, etc.). Además, todos los valores dentro de un intervalo dado puede ser un criterio de valoración para el intervalo abarcado de esa manera (por ejemplo, el intervalo 50-80 incluye los intervalos con criterios de valoración tales como 55-80, 50-75, etc.).

25 5.2 FORMULACIONES FARMACÉUTICAS QUE COMPRENDEN ÁCIDOS NUCLEICOS

[0082] Una modalidad de la presente invención es el desarrollo de formulaciones líquidas de alta concentración, baja viscosidad (HCLF) de ácidos nucleicos y sus sales para la administración de fármacos convenientes a un paciente. En particular, se investigan las composiciones de ácido nucleico que se pueden administrar de forma subcutánea y/o que pueden requerir menos dosificación frecuente 30 que los productos de ácido nucleico actualmente en el mercado. En determinadas modalidades, las formulaciones de ácido nucleico de alta concentración se autoadministran en una base de paciente ambulatorio. Algunas formulaciones de la invención tienen comportamientos tixotrópicos y de pseudoplasticidad que son particularmente preferidos para administración subcutánea y/o

intramuscular. Las formulaciones como se proporcionan en la presente ofrecen tolerabilidad mejorada, conveniencia del paciente durante el tratamiento y oportunidad para la dosificación del paciente ambulatorio en comparación con las formulaciones de ácido nucleico comercialmente disponibles actualmente. En algunas modalidades, la viscosidad de formulaciones de ácido nucleico de alta

5 concentración proporcionada en la presente disminuye en el tiempo. En determinadas modalidades, la viscosidad y/o fluidez de formulaciones de ácido nucleico de alta concentración proporcionadas en la presente disminuye bajo un aumento en la tensión por fricción. Se debe entender que tales propiedades son preferibles para los dispositivos de administración e inyectables, tal como una jeringa o dispositivo subcutáneo precargado, en el que la tensión o fuerza de fricción a la que la formulación

10 está expuesta aumenta a medida que la formulación pasa del barril de la jeringa/dispositivo a través del orificio reducido de la aguja. En determinadas modalidades, el ácido nucleico es defibrotide. Las formulaciones de la invención, particularmente aquellas que comprenden defibrotide, se pueden usar para el tratamiento de numerosas condiciones que incluyen, por ejemplo, tratamiento de arteriopatías periféricas, tratamiento de insuficiencia renal aguda, tratamiento de isquemia miocárdica aguda,

15 tratamiento y prevención de la enfermedad de injerto versus huésped (GvHD), tratamiento y prevención de microangiopatía trombótica asociada con trasplante (TA-TMA), tratamiento de lesión por isquemia-reperfusión, tal como por ejemplo, en trasplante de órganos sólidos (IRI de riñón por ejemplo), tratamiento y prevención de síndrome de liberación de citocinas (CRS) o síndrome de encefalopatía relacionada con linfocitos T de receptor de antígeno quimérico (CAR) (CRES), y

20 tratamiento y prevención de síndrome de obstrucción sinusoidal o VOD. En algunas modalidades, las formulaciones de la invención, particularmente aquellas que comprenden defibrotide, se pueden administrar a pacientes que han sido sometidos, están siendo sometidos o están por ser sometidos a quimioterapia, ablación, y/o trasplante de célula madre hematopoyética (HSCT). Otros usos de defibrotide, métodos para su producción y evaluación se describen en las siguientes patentes,

25 solicitudes de patentes y artículos, cada una de las cuales se incorporan en la presente mediante referencia en su totalidad: las patentes estadounidenses n.º 3.770.720; 3.829.567; 3.899.481; 4.693.134; 4.693.995; 4.938.873; 4.985.552; 5.081.109; 5.116.617; 5.223.609; 5.646.127; 5.646.268; 5.977.083; 6.046.172; 6.699.985; 6.767.554; 7.338.777; 8.551.967; 8.771.663, las publicaciones de patentes estadounidenses n.º 20080194506; 20090131362; 20110092576; 20130231470;

30 20140005256, la solicitud de patente estadounidense n.º 14/019.674; 14/323.918; 14/408.272; 62/656.486; 62/657.161; 62/664.657; y las solicitudes internacionales WO 2013/190582 y PCT/EP2015/077355. Ver también Palmer yd Boa, Defibrotide. A Review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in vascular disorders, *Drugs*, 1993, Feb; 45(2):259-94;

que se incorpora a la presente mediante esta referencia. Otras referencias citadas a través de la presente también se incorporan mediante esta referencia en sus totalidades.

[0083] En determinadas modalidades, el defibrotide a ser evaluado por los métodos descritos en la presente se elabora mediante un proceso tal como el descrito en la patente estadounidense n.º 4.985.552 y 5.223.609, ambos de los cuales se incorporan a la presente mediante referencia en sus totalidades. En una modalidad preferida de la invención, el defibrotide es un polidesoxirribonucleótido que corresponde a la siguiente fórmula de secuencia aleatoria:

P1-5,(dAp)12-24,(dGp)10-20,(dTp)13-26,(dCp)10-20^{SEP}

donde: P=radical fosfórico

dAp=monómero desoxiadenílico

dGp=monómero desoxiguanílico

dTp=monómero desoxitimidílico

dCp=monómero desoxicitidílico

[0084] El defibrotide tal como se utiliza en la presente puede tener una o más de todas las siguientes propiedades físico-químicas: electroforesis=movilidad anódica homogénea; coeficiente de extinción, $E1\text{cm}1\%$ a $260\pm 1\text{nm}$ $=220\pm 10$; relación de extinción, $E230/E260=0.45\pm 0.04$; coeficiente de extinción molar (al que se hace referencia como fósforo), $\epsilon(P)=7.750\pm 500$; energía rotatoria $[\alpha]D20^\circ =53^\circ\pm 6$; hipercromicidad reversible, indicada como % en ADN nativo, $h=15\pm 5$; y una relación de purina:pirimidina de 0.95 ± 0.5 .

[0085] Una modalidad de la presente invención comprende una formulación de ácido nucleico con varios amortiguadores o excipientes, tal como aquellos encontrados en Remington, The Science and Practice of Pharmacy (Remington the Science and Practice of Pharmacy) Vigésimo segunda edición, 2013 Pharmaceutical Press, la cual se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad. Ver especialmente la monografía en Excipientes que comienza en la página 1837. Preferentemente, el ácido nucleico es defibrotide. En algunas modalidades, se usa un ácido nucleico diferente del defibrotide.

[0086] En algunas modalidades, la invención incluye un amortiguador de dipéptido (por ejemplo, L-Carnosina o glicilglicina). Una modalidad preferida de la invención incluye glicilglicina, que es un dipéptido de glicina. Se encuentra comercialmente disponible de casas de suministro, tal como Sigma-Aldrich, y es útil como un excipiente para sistemas biológicos. En modalidades específicas de la presente invención, la glicilglicina está presente en concentraciones entre alrededor de 1mM a alrededor de 50 mM. En algunas modalidades, la glicilglicina está presente a concentraciones entre alrededor de 5 mM a alrededor de 100 mM, alrededor de 10 a alrededor de 60 mM, o alrededor de 10

a alrededor de 40 mM. En algunas modalidades, la glicilglicina está presente a una concentración de alrededor de 1 mM, alrededor de 5 mM, alrededor de 10 mM, alrededor de 15 mM, alrededor de 20 mM, alrededor de 25 mM, alrededor de 30 mM, alrededor de 35 mM, alrededor de 40 mM, alrededor de 45 mM, o alrededor de 50 mM.

5 **[0087]** Otros amortiguadores o excipientes pueden estar presentes en la presente formulación. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica de baja viscosidad comprende un amortiguador o excipiente seleccionado de citrato de sodio, succinato de sodio, histidina, amortiguador TRIS, amortiguador HEPES, cloruro de sodio, arginina, lidocaína y/o polisorbato 80. En algunas modalidades, la formulación de baja viscosidad comprende un amortiguador o excipiente para que el
10 ácido nucleico se encuentre en la forma de una sal de metal alcalina. En algunas modalidades, el amortiguador o excipiente incluye una sal de sodio. En algunas modalidades, el amortiguador o excipiente es citrato de sodio, succínico de sodio o cloruro de sodio.

[0088] En algunas modalidades, el amortiguador o excipiente es citrato de sodio, succínico de sodio o cloruro de sodio a una concentración de menos de alrededor de 80 mM de sal de sodio. En
15 algunas modalidades, la formulación comprende alrededor de 1-80 mM de sal de sodio. En algunas modalidades, la formulación comprende alrededor de 1 mM, alrededor de 5 mM, alrededor de 10 mM, alrededor de 15 mM, alrededor de 20 mM, alrededor de 25 mM, alrededor de 30 mM, alrededor de 35 mM, alrededor de 40 mM, alrededor de 45 mM, o alrededor de 50 mM de sal de sodio.

[0089] En algunas modalidades, la formulación comprende citrato de sodio. En algunas
20 modalidades, el citrato de sodio está presente a concentraciones entre alrededor de 5 a alrededor de 50 mM entre alrededor de 5 a alrededor de 60 mM, alrededor de 10 a alrededor de 60 mM, o alrededor de 10 a alrededor de 40 mM. En algunas modalidades, la concentración de citrato de sodio es de alrededor de 1 mM, alrededor de 5 mM, alrededor de 10 mM, alrededor de 15 mM, alrededor de 20 mM, alrededor de 25 mM, alrededor de 30 mM, alrededor de 35 mM, alrededor de 40 mM, alrededor
25 de 45 mM, alrededor de 50 mM, alrededor de 55 mM, o alrededor de 60 mM.

[0090] Otros excipientes se pueden agregar a las formulaciones de la presente, tal como conservantes, sales o agentes que ajustan el pH.

[0091] En algunas modalidades de la invención, la viscosidad de la formulación de baja viscosidad es entre alrededor de 1 a alrededor de 70 cP. En algunas modalidades, la viscosidad de la
30 formulación de baja viscosidad es entre alrededor de 5 cP a alrededor de 65 cP, o alrededor de 10 cP a alrededor de 65 cP. En algunas modalidades, la viscosidad de la formulación de baja viscosidad es alrededor de 5 cP, alrededor de 10 cP, alrededor de 15 cP, alrededor de 20 cP, alrededor de 25 cP, alrededor de 30 cP, alrededor de 35 cP, alrededor de 40 cP, alrededor de 45 cP, alrededor de 50 cP,

alrededor de 55 cP, alrededor de 60 cP, alrededor de 65 cP, o alrededor de 70 cP.

[0092] En algunas modalidades de la invención, la viscosidad de la formulación de baja viscosidad disminuye con el tiempo. En algunas modalidades, la viscosidad disminuye durante el almacenamiento de la formulación. En algunas modalidades, la viscosidad de la formulación de ácido nucleico de baja viscosidad proporcionada en la presente disminuye con el peso molecular medio decreciente del ácido nucleico. En algunas modalidades, la viscosidad de la formulación de ácido nucleico de baja viscosidad proporcionada en la presente disminuye con el peso molecular medio decreciente del ácido nucleico a una concentración dada de dicho ácido nucleico. En algunas modalidades, la viscosidad de la formulación de ácido nucleico de baja viscosidad proporcionada en la presente disminuye con el peso molecular medio decreciente del ácido nucleico a una concentración dada de dicho ácido nucleico cuando la viscosidad se mide en condiciones de temperatura ambiente, tal como desde 15 °C a 35 °C. En algunas modalidades, la viscosidad disminuye bajo el aumento de fricción, agitación y/o presión. En algunas modalidades, la viscosidad disminuye durante la administración de la formulación de baja viscosidad (por ejemplo, cuando pasa a través de una aguja). En algunas modalidades, la determinación de la viscosidad de la formulación de baja viscosidad varía dependiendo de la temperatura en la que se mide. En algunas modalidades, la viscosidad de las formulaciones de ácido nucleico de alta concentración proporcionada en la presente disminuye con el peso molecular medio decreciente del ácido nucleico. En algunas modalidades, la viscosidad de las formulaciones de ácido nucleico de alta concentración proporcionada en la presente aumenta con un aumento en el peso molecular medio del ácido nucleico. En modalidades preferidas, la viscosidad se mide en condiciones de temperatura ambiente, tal como desde 15 °C a 35 °C. Más preferentemente, la viscosidad se mide entre 18°C y 25°C. Incluso más preferentemente, la viscosidad se mide a entre 21°C y 23°C.

[0093] En algunas modalidades, las formulaciones de baja viscosidad de la presente descripción tienen una osmolaridad entre alrededor de 200 mOsm/kg y alrededor de 1000 mOsm/kg. En algunas modalidades, las formulaciones de baja viscosidad de la presente descripción tienen una osmolaridad entre alrededor de 240 mOsm/kg a alrededor de 600 mOsm/kg o alrededor de 300 mOsm/kg a alrededor de 550 mOsm/kg. En algunas modalidades, las formulaciones de baja viscosidad de la presente descripción tienen una osmolaridad de alrededor de 200 mOsm/kg, alrededor de 240 mOsm/kg, alrededor de 250 mOsm/kg, alrededor de 300 mOsm/kg, alrededor de 350 mOsm/kg, alrededor de 400 mOsm/kg, alrededor de 450 mOsm/kg, alrededor de 500 mOsm/kg, alrededor de 600 mOsm/kg, alrededor de 650 mOsm/kg, alrededor de 700 mOsm/kg, alrededor de 750 mOsm/kg, alrededor de 800 mOsm/kg, alrededor de 850 mOsm/kg, alrededor de 900 mOsm/kg, o

alrededor de 950 mOsm/kg.

[0094] En algunas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para administrar las formulaciones de la descripción. En determinadas modalidades, las formulaciones de la presente invención se administran de forma subcutánea. En algunas modalidades, las formulaciones de la invención se administran de forma subcutánea por medio de un dispositivo que puede ser usado por el paciente. En algunas modalidades, la formulación de baja viscosidad es una formulación de defibrotide. En algunas modalidades, la formulación es una formulación líquida de concentración elevada (HCLF, por su sigla en inglés).

[0095] Los dispositivos para administración subcutánea pueden ser previamente llenados con por ejemplo un adulto predefinido o dosis pediátrica, o se pueden usar para administrar una dosis basada en peso específica para pacientes individuales. En algunas modalidades, el paciente determina la dosis y la administra. En determinadas modalidades, las formulaciones de la invención se administran de forma subcutánea por medio de un dispositivo que está comercialmente disponible, tal como por ejemplo, la bomba FREEDOM60[®] o similar (productos médicos RMS[™]). En algunas modalidades específicas, las formulaciones de la invención se administran de forma subcutánea en menos de alrededor de dos horas, menos de alrededor de una hora, o menos de alrededor de 30 minutos. En algunas modalidades específicas, las formulaciones de la invención se administran de forma subcutánea durante alrededor de 5 minutos a alrededor de 1 hora, alrededor de 10 minutos a alrededor de 1 hora o alrededor de 15 minutos a alrededor de 45 minutos.

[0096] La dosificación de la formulación se puede determinar mediante una variedad de factores que serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica. En algunas modalidades, la dosis se basa en el peso corporal de punto de referencia del paciente. En algunas modalidades, la formulación se administra en una cantidad de alrededor de 1 a alrededor de 100 mg por kilogramo de peso corporal por día. Por ejemplo, la formulación se administra en una cantidad de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 mg por kilogramo de peso corporal por día. En algunas modalidades, la formulación se administra en una cantidad de alrededor de 25 mg por kilogramo de peso corporal por día. En algunas modalidades, las dosis basadas en el peso corporal del paciente se redondean a lo más cercano a 10 mg para pacientes que pesan más de 35 kg. En algunas modalidades, las dosis basadas en el peso corporal del paciente se redondearon a lo más cercano a 5 mg para pacientes que pesan menos de 35 kg. En algunas modalidades, la formulación es una

formulación de defibrotide.

[0097] La formulación se puede administrar como una sola dosis diaria o en múltiples dosis por día. En algunas modalidades, la formulación se administra una vez al día. En algunas modalidades, la formulación se administra en múltiples dosis por día. Por ejemplo, la formulación se administra en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o en 10 dosis por día. En algunas modalidades, la formulación se administra en cuatro dosis por día. En algunas modalidades, la formulación se administra en cuatro dosis por día cada 6 horas.

[0098] En algunas modalidades, la dosis y frecuencia de administración varía dependiendo de la vía de administración. En algunas modalidades, la administración subcutánea de las formulaciones de baja viscosidad de la presente descripción permite una administración menos frecuente y/o dosis más bajas. En algunas modalidades, la administración subcutánea de la formulación de baja viscosidad de la presente descripción permite un volumen de administración reducido.

[0099] Tal como lo apreciará un experto en la técnica, el período de tratamiento puede variar en una base de paciente a paciente. Por ejemplo, en algunas modalidades, el período de tratamiento se determina al monitorear signos y síntomas de VOD hepático. Por ejemplo, si los signos y síntomas de VOD hepático aún están presentes después de un período de tratamiento inicial, el tratamiento de defibrotide se continúa hasta la resolución de VOD. En algunas modalidades, si los signos y síntomas de VOD hepático aún están presentes después de 21 días, el tratamiento de defibrotide se continúa hasta la resolución de VOD hasta un máximo de 60 días. Por lo tanto, en determinadas modalidades, el período de tratamiento puede durar desde 21 a 60 días. Por ejemplo, el período de tratamiento dura durante 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o 60 días. En algunas modalidades, el período de tratamiento dura 21 días.

[00100] En algunas modalidades, la administración de las formulaciones de la presente descripción trata o mejora el desarrollo de VOD y/o síntomas de VOD en comparación con un paciente no tratado o el mismo paciente antes de la administración de la formulación. En algunas modalidades, VOD y/o síntomas de VOD son tratados o mejorados en el paciente entre el día 1 y el año 10. En algunas modalidades, la administración de la formulación trata o mejora el desarrollo de VOD y/o síntomas de VOD en comparación con un paciente no tratado o el mismo paciente antes de la administración de defibrotide en alrededor del día 1, alrededor del día 2, alrededor del día 3, alrededor del día 4, alrededor del día 5, alrededor del día 6, alrededor de la semana 1, alrededor de la semana 2, alrededor de la semana 3, alrededor de la semana 4, alrededor de la semana 5, alrededor de la semana 6, alrededor de la semana 7, alrededor de la semana 8, alrededor de la semana 9, alrededor

de la semana 10, alrededor de la semana 20, alrededor de la semana 30, alrededor de la semana 40, alrededor de la semana 50, alrededor de la semana 60, alrededor de la semana 70, alrededor de la semana 80, alrededor de la semana 90, alrededor de la semana 100, alrededor del año 1, alrededor del año 2, o alrededor del año 3. En algunas modalidades, la administración de la formulación trata o mejora el desarrollo de VOD y/o síntomas de VOD en comparación con un paciente no tratado o el mismo paciente de la administración de la formulación durante alrededor de 1 día, alrededor de 1 semana, alrededor de 1 mes, alrededor de 2 meses, alrededor de 3 meses, alrededor de 4 meses, alrededor de 5 meses, alrededor de 6 meses, alrededor de 1 año, alrededor de 2 años, alrededor de 5 años, o alrededor de 10 años, o más.

- 10 **[00101]** En algunas modalidades, la administración de las formulaciones de la presente descripción trata o mejora el VOD y/o síntomas de VOD en alrededor de 1 %, alrededor de 5 %, alrededor de 10 %, alrededor de 20 %, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, o alrededor de 100 % en comparación con un paciente no tratado o el mismo paciente antes de la administración de la formulación. En algunas modalidades, la administración de la formulación trata o mejora el desarrollo de VOD y/o síntomas de VOD en comparación con un paciente no tratado o el mismo paciente antes de la administración de la formulación en alrededor de 1 %, alrededor de 5 %, alrededor de 10 %, alrededor de 20 %, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, o alrededor de 100 % en alrededor del día
- 20 1, alrededor del día 2, alrededor del día 3, alrededor del día 4, alrededor del día 5, alrededor del día 6, alrededor de la semana 1, alrededor de la semana 2, alrededor de la semana 3, alrededor de la semana 4, alrededor de la semana 5, alrededor de la semana 6, alrededor de la semana 7, alrededor de la semana 8, alrededor de la semana 9, alrededor de la semana 10, alrededor de la semana 20, alrededor de la semana 30, alrededor de la semana 40, alrededor de la semana 50, alrededor de la semana 60, alrededor de la semana 70, alrededor de la semana 80, alrededor de la semana 90, alrededor de la semana 100, alrededor del año 1, alrededor del año 2, o alrededor del año 3. En algunas modalidades, la administración de la formulación trata o mejora el desarrollo de VOD y/o síntomas de VOD en comparación con un paciente no tratado o el mismo paciente antes de la administración de la formulación en alrededor de 1 %, alrededor de 5 %, alrededor de 10 %, alrededor de 20 %, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, o alrededor de 100 % durante alrededor de 1, alrededor de 2 días, alrededor de 3 días, alrededor de 4 días, alrededor de 5 días, alrededor de 6 días, alrededor de 1 semana, alrededor de 2 semanas, alrededor de 3 semanas, alrededor de 4 semanas, alrededor
- 25
- 30

de 1 mes, alrededor de 2 meses, alrededor de 3 meses, alrededor de 4 meses, alrededor de 5 meses, alrededor de 6 meses, alrededor de 1 año, alrededor de 2 años, alrededor de 5 años, o alrededor de 10 años o más.

[00102] Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar modalidades preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deberían darse cuenta de que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas que el inventor descubrió que funcionan de manera correcta en la práctica de la invención y, por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su puesta en práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica, a partir de la presente descripción, deberían darse cuenta de que se pueden realizar diversos cambios en las modalidades específicas descritas y aun así obtener un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

6. EJEMPLOS

6.1 EJEMPLO 1 – IDENTIFICACIÓN DE ATRIBUTOS DE SOLUCIÓN LIMITANTES

[00103] Para desarrollar Formulaciones líquidas de alta concentración (HCLF) de un ácido nucleico, es importante identificar propiedades fisicoquímicas clave de la solución que pueden limitar la formulación. Para investigar esto, una cantidad de soluciones que varían en concentraciones de defibrotide de hasta aproximadamente 300 mg/mL se generaron usando dos formulaciones diferentes y las propiedades de la solución de cada uno se caracterizaron como una función de concentración de defibrotide. La apariencia visual, solubilidad, viscosidad, osmolaridad, estructura de polímero en solución (dicroísmo circular UV lejano y cercano), propiedades térmicas (calorimetría Diferencial de Barrido), y peso molecular/agregación (DLS, FTIR, y SEC-MALS) fueron algunas de las propiedades analizadas para las varias soluciones de defibrotide.

[00104] Preparación de muestra: se formuló defibrotide en citrato de sodio 34 mM, pH 7,3 o glicilglicina 34 mM ("Gly-Gly"), pH 7,5 mediante concentración centrífuga o al disolver API de defibrotide a 80, 150, 200, 250, y 300 mg/mL. La concentración de producto fue típicamente medida mediante espectroscopía ultravioleta-visible. Las muestras de defibrotide se diluyeron de forma gravimétrica en triplicado a una concentración objetivo de 0,1 mg/mL en sus amortiguadores de formulación respectiva usando 35 μ L de la muestra. A_{260} y A_{320} se midieron usando una longitud de pasaje de cubeta de 0.2 cm. Los valores A_{260} se corrigieron para ver la dispersión de la luz a 320 nm y la concentración se determinó usando un coeficiente de extinción de $22,2 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Una densidad de muestra de 1,08 g/mL y una densidad de diluyente de 1,0 g/mL se usó para corregir la masa de la muestra cuando se determina el factor de dilución. Las propiedades fisicoquímicas de cada solución se analizaron como una función de concentración mediante los siguientes métodos:

[00105] Apariencia visual y Turbidez: un robot Core Module 3 [de núcleo de módulo 3] ("CM3") robot realizó emparejamiento de color digital. El color de las muestras de defibrotide también se evaluó usando el análisis de emparejamiento de color de la Farmacopea Europea (EP, por su sigla en inglés) usando siete estándares de color EP, BY1 - BY7, donde BY1 es el estándar de color más intenso. El análisis se llevó a cabo bajo una caja de luz con un fondo blanco (lámpara de observación modelo MIH-DX de Eisai Machinery, modelo medidor de luz de Fisher Modelo 06-662-63). Las evaluaciones de color para las formulaciones de Gly-Gly y las formulaciones de citrato no fueron considerablemente diferentes; todas fueron soluciones amarillas - transparentes levemente amarillas, o marrones con la intensidad de la coloración que es más pronunciada que el estándar. Además, no se detectaron partículas visibles (se evaluaron tamaños de partícula de $\geq 80 \mu\text{m}$). La turbidez también se midió en comparación con siete estándares de turbidez. El color de todas las formulaciones cuando se comparó con los estándares de color de EP fue BY4 en el punto temporal inicial así como después de un mes de almacenamiento a $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$ que muestra que todas las formulaciones fueron estables durante hasta al menos tres meses a $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\% \text{ RH}$.

[00106] Solubilidad: la solubilidad de defibrotide en solución se evaluó mediante precipitación de polietilenglicol (PEG) con el uso del robot CM3 para análisis. A lo largo de los estudios, una cantidad minúscula de precipitado se observó incluso en la presencia de un PEG de alta cantidad, lo cual indica solubilidad de solución alta del producto.

[00107] Viscosidad de solución: la viscosidad de la solución de las muestras de defibrotide se analizaron a aproximadamente 80, 150, 200, 250, y concentraciones de 300 mg/mL. Típicamente un reómetro programable Brookfield DV-III Ultra se usó para medir la viscosidad. Las muestras se analizaron nítidas a 22°C usando aproximadamente 550 μL . La viscosidad de Defitelio[®] fue 3.9 cP sin dependencia en velocidad de fricción. Los resultados sugieren que Defitelio[®] mostró el comportamiento de fluido Newtoniano. Las formulaciones de defibrotide de la invención formuladas a 300 mg/mL en citrato y amortiguadores Gly-Gly demostraron que la viscosidad dependía de la velocidad de fricción y concentración de producto. La viscosidad del defibrotide formulado parecía aumentar de forma exponencial como una función de la concentración del producto. La viscosidad del defibrotide en Gly-Gly 34 mM, pH 7,5 como una función de concentración de producto fue considerablemente más bajo en comparación con el defibrotide en citrato de sodio 34 mM y pH 7,3 que demuestra la capacidad de Gly-Gly de mejorar las propiedades de solución de defibrotide en las HCLF de la invención.

[00108] Osmolaridad: La osmolaridad se midió en al menos dos métodos diferentes y los resultados se informan en las Figuras (ver, por ejemplo, Figura 1D). Típicamente, un osmómetro de presión de vapor Vapro se usó para una medición. La osmolaridad del defibrotide en Gly-Gly 34 mM,

pH 7,5 fue más baja en comparación con el defibrotide en citrato de sodio 34 mM y pH 7,3 que demuestra la capacidad de Gly-Gly de mejorar las propiedades de solución de defibrotide en las HCLF de la invención.

[00109] Dicroísmo circular ultravioleta lejano y cercano: la estructura secundaria y terciaria de las formulaciones de defibrotide en solución, como una función de la concentración del producto, se evaluó mediante dicroísmo circular y se analizó en un espectropolarímetro Jasco J-810.

[00110] Análisis de bases nucleicas libres: Las muestras se prepararon de forma cuantitativa a 1,6 mg/mL con fase móvil ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 50 mM, pH 5.0) y analizado mediante RP-HPLC usando una longitud de onda de detección de 254 nm. Una columna Synergi Fusion 4 μm -RP 80 Å se usó para separar la base nucleica usando una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se usó Defitelio® como una referencia y se preparó a 1,6 mg/mL en fase móvil.

[00111] Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier: Se realizó análisis FTIR usando técnicas estándar para evaluar la estructura de HCLF de defibrotide. El análisis de FTIR demostró que las dos formulaciones de defibrotide (citrato y Gly-Gly) a 300 mg/mL mostraron un perfil similar cuando se compararon con Defitelio®.

[00112] Calorimetría Diferencial de Barrido: las propiedades térmicas en solución de defibrotide se midieron mediante calorimetría diferencial de barrido usando técnicas estándar. Los resultados sugieren que la concentración y/o matriz de amortiguador, que incluye Gly-Gly, puede influenciar las propiedades térmicas de defibrotide.

[00113] Distribución de tamaño: medida para cada formulación como una función de la concentración del producto para justificar el peso molecular de las estructuras que contribuyen al promedio molecular ponderado. El índice de polidispersidad (M_w/M_n) se usó para medir la heterogeneidad de las formulaciones y, basado en los resultados, se concluyó que las muestras eran polidispersas. Los resultados mostraron que el defibrotide formulado a 300 mg/mL en citrato y Gly-Gly se puede comparar con Defitelio®.

[00114] En general, los resultados que usan los métodos anteriores indican que la osmolaridad de la solución y la viscosidad son atributos de la formulación importantes que juegan un papel fundamental en la limitación de cuánta concentración del producto se puede alcanzar que se tolere bien. Estos atributos en formulaciones que contienen Gly-Gly demostraron mejoras en las propiedades de solución notables que también se correlacionan con los atributos térmicos en la solución (ΔH , T_m).

[00115] La gráfica en la Figura 1A muestra la viscosidad de las formulaciones hecha usando concentraciones de defibrotide en aumento en la presencia de citrato de sodio, Gly-Gly o una mezcla de las dos. Los resultados muestran que la viscosidad de las formulaciones de defibrotide es

fuertemente dependiente de su concentración, y una solución de 200 mg/mL tiene apenas 10 veces más viscosidad en comparación con la solución de 80 mg/mL.

[00116] La gráfica en la Figura 1B muestra la viscosidad como una función de la temperatura en tres formulaciones diferentes que comprenden ya sea citrato de sodio, Gly-Gly o una mezcla de las dos.

[00117] La gráfica en la Figura 1C muestra la disminución de la viscosidad durante el transcurso de tiempo en estas formulaciones seleccionadas: GlyGly 20 mM (círculos azules; superpuestos por los cuadrados naranjas), GlyGly 20 mM y citrato de sodio 34 mM (cuadrados naranjas), GlyGly 20 mM y succinato de sodio 100 mM (triángulos azules) y GlyGly 20 mM y cloruro de sodio 20 mM (rombos rojos). Las formulaciones que contienen GlyGly muestran la viscosidad más baja durante un punto temporal dado.

[00118] La gráfica en la Figura 1D muestra la osmolaridad de las formulaciones hecha usando concentraciones de defibrotide en aumento en la presencia de Gly-Gly o amortiguadores de citrato de sodio.

6.2 EJEMPLO 2 – EFECTO DE LOS AMORTIGUADORES EN PROPIEDADES DE FORMULACIÓN

6.2.1 EJEMPLO 2.1 – Efecto de amortiguadores y excipientes en viscosidad y osmolaridad

[00119] En el Ejemplo 1 se mostró que aumentar la concentración de defibrotide aumenta tanto la viscosidad como la osmolaridad. Es importante para las preparaciones farmacéuticas para administración parenteral que sean de baja viscosidad y/o isotónicas. Para identificar los amortiguadores o excipientes que pueden disminuir la viscosidad y/o osmolaridad de las formulaciones de defibrotide, se realizó un análisis de panel amplio de varios amortiguadores y excipientes (que incluyen excipientes GRAS) usando una formulación de defibrotide de 200 mg/mL.

[00120] Las formulaciones de prueba se prepararon para dirigirse a 200 mg/mL tal como se muestra en la Tabla 1 más adelante.

Tabla 1: Las formulaciones de defibrotide que usa varios amortiguadores y excipientes

Formulación	Concentración de defibrotide (mg/mL)	Osmolaridad (mmol/kg)	Viscosidad promedio (cP)	Viscosidad (cP)	velocidad de fricción (s ⁻¹)
Defitelio DP, citrato de	80	No evaluado	4,2	4,21	113
				4,24	225

sodio 34 mM , pH 7,3				4,23	338
				4,28	525
Citrato de sodio 34 mM, pH 7,3	200	438	29,6	29,6	15
				29,4	30
				29,8	48,8
				29,7	71,3
Citrato de sodio 34 mM, pH 6,5		544	58	61,9	7,5
				57,9	22,5
				56,5	30
				55,5	37,5
Citrato de sodio 34 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3		636	51,9	51,8	7,5
				51,8	22,5
				52	30
				51,9	37,5
Citrato de sodio 34 mM, Arginina 100 mM, pH 7,3		643	46,1	46,6	3,45
				45,5	15
				46	30
				46,2	45
citrato de sodio 34 mM, PS-80 al 0,1 %, pH 7,3		542	53,6	52,9	11,3
				53,7	22,5
				53,9	33,8
				53,8	38,3
citrato de sodio 34 mM, HCl de lidocaína 250 mM, pH 7,0		994	38,3	38,3	15
				38,2	30
				38,4	37,5
				38,4	52,5
Citrato de sodio 34 mM, pH 8,0		435	46,4	46,1	15
				46,3	22,4
				46,4	30
				46,6	45

Gly-Gly 34 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5		566	38,5	38,6	15
				38,4	30
				38,5	37,5
				38,6	54
Gly-Gly 34 mM, Arginina 100 mM, pH 7,5	200	560	39,7	39,4	15
				39,5	30
				39,7	45
				40,3	52,5
Gly-Gly 34 mM, PS-80 al 0,1 %, pH 7,5		359	38,2	37,9	15
				38,2	30
				38,2	45
				38,4	54
Gly-Gly 34 mM, HCl de lidocaína 250 mM, pH 7,0		950	34,1	34	15
				34,1	37,5
				34,2	48,8
				34,6	60
Gly-Gly 34 mM, pH 7,5		323	27,7	27,9	16,5
				27,7	31,5
				27,6	51
				27,7	75
Gly-Gly 34 mM, pH 8,0		370	36,9	36,5	15
				37	33,8
				37	45
				37,2	56,3
Gly-Gly 34 mM, pH 8,5		375	34	33,7	15
				33,7	37,5
				34,1	48,8
				34,3	60,8
Tris 34 mM, pH 7,5		394	39,4	39,1	15
				39,2	30
				39,4	45

				39,8	52,5
HEPES 34 mM, pH 7,5	379	43,9		43,8	15
				43,8	30
				43,7	37,5
				44,2	46,5
His 34 mM, pH 7,3	364	37		36,9	15
				36,9	30
				37	45
				37,3	56,3

Tabla 2: Viscosidad de la solución y osmolaridad de defibrotide en amortiguador que contiene Gly-Gly en comparación con citrato de sodio como una función de concentración de producto

Formulación	Concentración (mg/mL)	Temperatura (°C)	Viscosidad (cP)	Viscosidad Media (cP)	Velocidad de fricción (s ⁻¹)	Osmolaridad Mmol/kg
Citrato de sodio 34 mM pH 7,3	80	2-8°C	11,5	11,6	37,5	
			11,6		75,0	
			11,6		113	
			11,8		150	
		22°C	4,9	4,9	60,0	230
			4,9		150,0	
			4,9		263,0	
			4,9		413,0	
		40°C	2,3	2,3	113,0	
			2,3		300,0	
			2,3		450,0	
			2,4		900,0	
		50 °C	1,56	1,6	225	
			1,58		450	
			1,58		900	
			1,60		1200	

	100	2-8°C	20,2	20,7	22,5	
			20,5		37,5	
			20,9		75,0	
			21,2		97,5	
		22°C	7,5	7,3	37,5	259
			7,2		75,0	
			7,2		150	
			7,2		300	
		40°C	3,0	3,0	113	
			3,0		263	
			3,0		413	
			3,1		675	
		50 °C	1,96	2,0	150	
			1,95		300	
			1,98		675	
			1,99		975	
	160	2-8°C	628,3	655,5	0,750	
			648,1		1,50	
			669,9		2,25	
			675,5		3,00	
		22°C	34,6	34,5	15,0	407
			34,4		22,5	
			34,4		37,5	
			34,4		60,0	
		40°C	8,2	8,6	37,5	
			8,3		75,0	
			8,4		150	
			9,4		225	
		50 °C	4,26	4,4	75,0	
			4,31		156	
			4,39		300	
			4,50		450	

	180	2-8°C	N/A	<600	N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
		22°C	61,8	61,3	4,50	451
			60,7		7,50	
			61,4		15,0	
			61,3		30,0	
		40°C	11,5	13,1	37,5	
			12,6		75,0	
			13,5		113,0	
			14,8		150,0	
		50 °C	5,85	6,2	75,0	
			6,01		150	
			6,31		225	
			6,47		300	
	200	2-8°C	N/A	<600	N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
		22°C	117,1	119,4	3,75	525
			119,2		6,00	
			119,9		11,3	
			121,5		15,0	
		40°C	17,3	18,3	22,5	
			17,9		52,5	
			18,4		75,0	
			19,5		113,0	
		50 °C	7,26	7,5	75,0	
			7,34		150	
			7,42		225	
			7,88		263	

	250	2-8°C	N/A	<600	N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
		22°C	N/A	<600	N/A	792
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
		40°C	N/A	<600	N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
		50°C	31,60	28,5	7,50	
			27,60		37,5	
			27,20		52,5	
			27,70		75,0	

Formulación	Concentración (mg/mL)	Temperatura (°C)	Viscosidad (cP)	Viscosidad Media (cP)	Velocidad de fricción (s ⁻¹)	Osmolaridad mmol/kg
Gly-Gly 20 mM pH 7,3	80	2-8°C	8,95	9,1	37,5	
			9,10		75,0	
			9,15		150	
			9,18		188	
		22°C	4,1	4,2	75,0	198
			4,1		150,0	
			4,2		225,0	
			4,2		413,0	
		40°C	2,3	2,4	113,0	
			2,3		300,0	

			2,4		450,0	
			2,4		825,0	
		50 °C	1,61	1,6	225	
			1,61		450	
			1,62		900	
			1,64		1200	
	100	2-8°C	14,2	14,3	37,5	
			14,3		75,0	
			14,4		113,0	
			14,4		150,0	
		22°C	6,0	6,0	75,0	231
			6,0		113,0	
			6,0		188,0	
			6,0		300,0	
		40°C	2,9	2,9	113,0	
			2,9		263,0	
			2,9		413,0	
			2,9		675,0	
		50 °C	2,02	2,1	156	
			2,05		300	
			2,08		675	
			2,11		900	
	160	2-8°C	88,1	88,0	6,00	
			86,7		7,50	
			88,5		11,3	
			88,6		22,5	
		22°C	20,8	20,8	15,0	331
			20,7		37,5	
			20,8		75,0	
			20,8		97,5	
		40°C	7,2	7,3	37,5	
			7,3		75,0	

		50 °C	7,3	4,2	188,0	
			7,5		263	
			4,10		150	
			4,09		300	
			4,18		450	
			4,27		488	
	180	2-8°C	N/A	<600	N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
		22°C	31,6	32,0	7,50	383
			32,2		15,0	
			32,0		37,5	
			32,2		60,0	
		40°C	9,6	9,8	37,5	
			9,7		75,0	
			9,9		113,0	
			10,2		188,0	
		50 °C	5,24	5,3	75,0	
			5,26		150	
			5,33		300	
			5,43		375	
	200	2-8°C	N/A	<600	N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
		22°C	54,0	54,9	7,50	438
			55,4		11,3	
			55,0		18,8	
			55,0		33,8	
		40°C	14,0	14,2	22,5	
			14,2		52,5	

			14,2		90,0	
			14,3		127,0	
		50 °C	7,17	7,4	75,0	
			7,31		150	
			7,43		22,5	
			7,56		263	
		2-8°C	N/A	<600	N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
	250	22°C	N/A	<600	N/A	680
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
			N/A		N/A	
		40°C	46,00	44,5	15,0	
			44,40		30,0	
			44,00		37,5	
			43,50		41,3	
		50 °C	23,00	22,6	37,5	
			22,00		52,5	
			22,40		75,0	
			22,80		90,0	

[00121] Como se muestra en las Tablas 1 y 2 así como las gráficas en las Figuras 1B, 1C y 2A, las formulaciones HCLF que contienen Gly-Gly tenían considerablemente menos viscosidad en general en comparación con otras formulaciones y cuando se evalúan en condiciones de temperatura, concentración de producto y pH diferentes (ver la Figura 2A) en comparación con el amortiguador de citrato. En particular, los amortiguadores de histidina y TRIS también tenían viscosidad inferior (menos de 40 cP) a 200 mg/mL defibrotide. Durante casi todas las formulaciones en Gly-Gly, la viscosidad fue hasta 50 % inferior en comparación con el amortiguador de citrato para la concentración de producto dada y condiciones de temperatura ambiente. Las temperaturas ambiente pueden cambiar dependiendo de la región y por lo tanto, la viscosidad es preferentemente medida entre alrededor de 15 °C a 30 °C; sin embargo, pueden ser apenas mayores o menores según diferentes condiciones del

clima. Por ejemplo, una formulación preferida que contiene 180 mg/mL de defibrotide (que tiene un peso molecular medio de 14 kDA), y que contiene Gly-Gly 20 mM y citrato de sodio 34 mM, pH 7,0, tenía una viscosidad de 12 cP cuando se midió a 25 °C. Otras formulaciones tenían una viscosidad de 27 cp cuando el defibrotide que tiene un peso molecular medio de 17 kDa estaba bajo las mismas condiciones. Fuera de los excipientes analizados, solo la lidocaína mostró un potencial para una reducción adicional de la viscosidad; sin embargo, aumentó la osmolaridad > 900 mOsm/kg (ver la Figura 2B) y por lo tanto no se consideró práctico para investigación adicional. El amortiguador Gly-gly que muestra la viscosidad menor general se identificó como un amortiguador preferido para formulaciones de defibrotide HCLF 200 mg/mL.

6.2.2 Ejemplo 2.2 – Efecto en diferentes fuentes de iones de sodio en la estabilidad y capacidad del amortiguador durante el almacenamiento

[00122] Para comparar la capacidad amortiguadora de varias soluciones de amortiguadores en formulaciones de defibrotide (“DF”, por su sigla en inglés) de alta concentración que contienen el sistema de amortiguador Gly-Gly, dieciséis diferentes amortiguadores, que usan tres fuentes de iones de sodio diferentes se usaron para evaluar la estabilidad, perfil de impureza, y propiedades de solución de las formulaciones de DF. Se muestra un resumen de estas formulaciones en la Tabla 3.

Tabla 3 - Resumen de formulaciones de defibrotide

Código de formulación	Key-753 (mg/mL)	Gly-Gly (mM)	Citrato de sodio (mM)	Succinato de sodio (mM)	NaCl (mM)
F1	180	20	---	---	---
F2	180	20	20	---	---
F3	180	20	34	---	---
F4	180	20	80	---	---
F5	180	20	100	---	---
F6	180	20	---	20	---
F7	180	20	---	34	---
F8	180	20	---	80	---
F9	180	20	---	100	---
F10	180	20	---	---	20
F11	180	20	---	---	34
F12	180	20	---	---	80

F13	180	20	---	---	100
F14	180	20	40	---	40
F15	160	20	40	---	40
F16	140	20	40	---	40

[00123] Basándose en los resultados de claridad, apariencia y color, el defibrotide formulado en los amortiguadores de Gly-Gly eran estables luego del almacenamiento a $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$ RH durante hasta al menos tres meses.

5 **[00124]** El análisis de pH y UV mostró que la concentración de defibrotide permanecía constante durante todas las formulaciones cuando se almacenaba a $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$ RH durante hasta tres meses.

10 **[00125]** La viscosidad de todas las formulaciones disminuyó como una función del tiempo (ver por ejemplo, Figura 3B). La viscosidad en el punto temporal inicial se encontraba dentro del intervalo de 23,8 cP – 34,4 cP para todas las formulaciones a 180 mg/mL y disminuyó hasta aproximadamente 52 % después del almacenamiento a $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$ RH durante tres meses. Las formulaciones F1-F5 enumeradas en la Figura 3B se describen en la Tabla 3 anterior.

15 **[00126]** Se observó una pequeña tendencia de aumento de osmolaridad en función del tiempo de almacenamiento que se correlacionó con la concentración de sal de sodio. A medida que la concentración de sal aumentó, el cambio en aumento en osmolaridad fue mayor (ver la Figura 3A). Las formulaciones con menos de 80 mM de sal de sodio total tuvieron el cambio más bajo en osmolaridad en función del tiempo y fue menor a 500 mOsm/kg.

20 **[00127]** La estabilidad que indica el ensayo de FNB demostró que el total de impurezas y las bases nucleicas libres aumentaron apenas después del almacenamiento durante un mes. En general, las formulaciones F2 y F3 tenían la cantidad más baja de bases nucleicas libres.

25 **[00128]** Se realizó análisis de dispersión de luz en múltiples ángulos (MALS, por su sigla en inglés) por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para determinar la distribución de tamaño y peso molecular de defibrotide como una función de la concentración del producto. Las formulaciones DF y material de referencia API se diluyeron hasta 4 mg/mL en fase móvil SEC en un tubo de tapa a rosca de vidrio (10 mL). La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante una hora sin agitación. Posteriormente, la solución de muestra se calentó hasta aproximadamente 100°C (agua hirviendo) y se mantuvo a esta temperatura durante 15 minutos. Finalmente, la solución de muestra se enfrió usando agua y hielo durante cinco minutos. Después de la estabilización a temperatura ambiente (alrededor de 15 minutos), las muestras se filtraron con un filtro de jeringa SFCA 0,20 μm . La

solución de muestra se analizó mediante SEC-MALS dentro de una hora de la preparación. El material de referencia se preparó a partir de API de defibrotide a 4 mg/mL en fase móvil. El análisis indicó que todas las formulaciones tienen tamaños similares y polidispersidad.

[00129] Basándose en estos resultados combinados 180 mg/mL de defibrotide en Gly-Gly 20 mM y menos de 80 mM de sal de sodio (y preferentemente citrato de sodio 20-34 mM) se prefieren combinaciones de amortiguador para formulaciones de HCLF.

6.3 EJEMPLO 3 – CAMBIO DE VISCOSIDAD EN EL TIEMPO Y COMO UNA FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA

[00130] Es importante para los productos farmacéuticos mantener su integridad en el tiempo para permitir una semivida adecuada. La viscosidad de formulaciones de defibrotide 200 mg/mL mediante el uso de amortiguador de Gly-Gly fue por lo tanto medida en función del tiempo y la temperatura.

[00131] Se prepararon las muestras de la forma descrita anteriormente.

[00132] La gráfica en la Figura 4 muestra que la viscosidad de las formulaciones de defibrotide 200 mg/mL que usan amortiguador de Gly-Gly 20 mM disminuye con el tiempo y también disminuye con el aumento de la temperatura (medido a 25 °C, 40 °C y 60 °C). La disminución de la viscosidad como una función de la temperatura en el tiempo es favorable para la administración de fármacos y elaboración de productos, particularmente para productos de alta concentración tal como las HCLF. La disminución de la viscosidad en el tiempo, el comportamiento tixotrópico, es especialmente favorable y lleva a una conveniencia de paciente mejorada y tolerabilidad de estas formulaciones. El defibrotide es un producto estable a la temperatura por lo tanto la disminución de la viscosidad a temperaturas más elevadas proporciona oportunidades adicionales para la conveniencia mejorada del paciente. Por ejemplo, si un paciente calienta la formulación antes de la administración, la viscosidad disminuirá permitiendo una facilidad continuada de administración particularmente para administración subcutánea y/o intramuscular.

6.4 EJEMPLO 4 - OSMOLARIDAD EN EL TIEMPO USANDO DEGRADACIÓN FORZADA

[00133] También es importante que los productos farmacéuticos mantengan una osmolaridad baja en el tiempo y en varias condiciones. La osmolaridad de formulaciones de defibrotide 200 mg/mL mediante el uso de amortiguadores de citrato de Gly-Gly fue por lo tanto medida en función del tiempo y la temperatura mediante el uso de estudios de degradación forzada.

[00134] Se prepararon las muestras de la forma descrita anteriormente. La osmolaridad de las formulaciones se midió a 25 °C, 40 °C y 60 °C.

[00135] La gráfica en la Figura 5A muestra la osmolaridad de formulaciones de defibrotide 200 mg/mL mediante el uso de amortiguador de citrato de sodio.

[00136] La gráfica en la Figura 5B muestra la osmolaridad de formulaciones de defibrotide 200 mg/mL mediante el uso de amortiguador de Gly-Gly. Como se ve en estas gráficas, la osmolaridad de las formulaciones Gly-Gly se reducen en comparación con las formulaciones con amortiguador de citrato. Lo que es más importante, la osmolaridad de las formulaciones Gly-Gly permanece consistentemente baja (debajo de alrededor de 400 mOsm/kg) sobre cada punto temporal y a cada temperatura.

6.5 **EJEMPLO 5 – ESTABILIDAD FÍSICA Y PERFIL DEL PRODUCTO BAJO DEGRADACIÓN FORZADA**

[00137] La estabilidad física y el perfil del producto de HCLF de la invención se evaluó usando estudios de degradación forzada. El defibrotide dentro del intervalo de concentración de 180 mg/mL y 220 mg/mL formulado en Gly-Gly y/o citrato de sodio a pH 3 hasta pH 10, se evaluó después de ser almacenado a $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$ humedad relativa (“RH”, por su sigla en inglés), $40\pm 2^{\circ}\text{C}/75\pm 5\%$ RH y 60°C durante hasta 3 meses. Las formulaciones evaluadas se enumeran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4: Compendio de las formulaciones

Código de formulación	Conc. de defibrotide (mg/mL)	Tipo de amortiguador	pH	Tensioactivo
FD1 (Control de Defitelio®)	80	Citrato de sodio 34 mM	7,3	N/A
FD2	200			
FD3		GlyGly 20 mM	7,5	
FD4	180			
FD5	200		3,0	
FD6			10,0	
FD7		GlyGly 20 mM, Citrato de sodio 10 mM	7,3	
FD8	220	GlyGly 34 mM	7,5	PS-80 al 0,02%
FD9		GlyGly 20 mM		N/A

[00138] Basándose en los resultados de apariencia, color, claridad, pH y conteos de partícula de los estudios de estabilidad de degradación forzada, el defibrotide formulado a 200 mg/mL (FD3) en Gly-Gly 20 mM, pH entre 7 y 8 fue la formulación más estable luego del almacenamiento pretendido a $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%$ RH y las condiciones de estrés durante hasta tres meses.

5

6.6 EJEMPLO 6 - FARMACOCINÉTICA DE FORMULACIONES DE ÁCIDO NUCLEICO USANDO VARIAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

6.6.1 Ejemplo 6.1 - Infusión intravenosa (IV), inyección de bolo IV, inyección subcutánea (SC), e inyección intramuscular (IM) de Defibrotide

10 **[00139]** Se comparó la farmacocinética (PK) de varias formulaciones de defibrotide cuando son administradas mediante una sola dosis de infusión intravenosa (IV) de 2 horas, inyección de bolo IV, inyección subcutánea (SC), inyección intramuscular (IM), o de sonda oral (PO) a cerdos Göttingen machos. Además, al biodisponibilidad de las varias vías extravasculares de administración se determinó respecto a la infusión IV.

15 **[00140]** Los cerdos Göttingen machos, o minicerdos, son el estándar en la industria para explorar la administración SC, es un modelo aceptable para explorar la formulación SC de defibrotide y opciones de administración. Cada animal recibió una sola administración de defibrotide tal como se enumeró en los grupos de tratamiento en la Tabla 5. Cerdos Göttingen, n = 3 machos por grupo, fueron asignados a los grupos de tratamiento tal como se muestra:

20 **Tabla 5:** Diseño del estudio

N.º de grupo	ROA	Dosis de Defibrotide (mg/kg)	Concentración de dosis (mg/mL) ^a	Puntos de tiempo de muestreo PK en plasma nominal
1	Infusión IV de 2 horas	25	4	predosis, 0,25, 0,5, 1, 2, 2,083, 2,25, 2,5, 3, 4, 6, 8, 12, y 24 hr luego del inicio de la infusión
2	Bolo IV	2,5	2,5	predosis, 0,03, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, y 24 hr luego de la dosis
3	SC	25	80	predosis, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4,
4	IM	25	80	5, 6, 8, 10, 12, y 24 hr luego de la
5	PO	100	80	dosis

^aLos volúmenes de dosis fueron 6,25, 1,0, 0,3125, 0,3125, y 1,25 mL/kg para los Grupos 1 hasta 5,

respectivamente.

[00141] Las muestras de sangre se recolectaron y procesaron hasta obtener plasma. Un kit de ensayo Quant-iT OliGreen ssDNA (Life Technologies) se usó para cuantificar la concentración de defibrotide en muestras de plasma de cerdo. Brevemente, la metodología de ensayo implica distribuir en alícuotas la muestra (en duplicado) en una placa de 96 pocillos, la adición del reactivo OliGreen, incubación con agitación (5 min, protegido de la luz), y dirigir la medición de la fluorescencia (485 excitación, 515 nm corte, y 525 nm emisión). Los intervalos del ensayo fueron 2,5 a 60 µg/mL (intervalo elevado) y 0,05 a 2,5 µg/mL (intervalo bajo). El límite inferior de cuantificación (LLOQ) del ensayo fue 0,05 µg/mL.

[00142] La concentración en plasma de defibrotide de animal individual versus los datos de tiempo se descargaron en software WinNonlin Phoenix versión 6.3 (Pharsight, Cary, NC) para análisis PK. Se usó una infusión IV no compartimental, bolo IV, o modelo de inyección extravascular según fue apropiado para determinar los parámetros PK de dosis única para cada animal. Los tiempos de recolección de muestras y dosis nominales (ver la Tabla 5) se usaron para estimar los parámetros PK. Los valores de fondo (intervalo = 0,115 a 0,903 µg/mL) se observaron en el punto de tiempo previo a la dosis en todos los animales. Por lo tanto, los valores de concentración debajo de 1 µg/mL se trataron como < LLOQ y no se usaron en los análisis. Los siguientes parámetros se estimaron cuando fue posible:

T_{máx}	Tiempo hasta la máxima concentración observada
C_{máx}	Máxima concentración observada
AUC_{0-t}	Área bajo la curva de concentración en el tiempo desde el tiempo = 0 hasta el punto de tiempo con la última concentración medible, estimada por la regla trapezoidal lineal
MRT_{0-t}	Tiempo de residencia medio desde el tiempo = 0 hasta el punto de tiempo con la última concentración medible
C_{máx}/D	Concentración máxima observada dividida por el nivel de dosis
AUC_{0-t}/D	Área bajo la curva de concentración en el tiempo desde el tiempo = 0 a la última concentración medible, estimada por la regla trapezoidal lineal dividida entre el nivel de dosis
CL	Calculado para los grupos IV como dosis dividida entre AUC _{0-t}

[00143] La fracción biodisponible (F), expresado como un porcentaje, se calculó para cada animal, respecto al grupo de dosis de infusión IV, como sigue basado en los valores AUC_{0-t}/D:

$(AUC_{0-t/D} \text{ SC, IM, o PO de animal individual}) / (AUC_{0-t/D} \text{ de infusión IV media de grupo}) \times 100 \%$

[00144] Análisis en plasma de defibrotide: las concentraciones en plasma de defibrotide resumidas luego de dosificación IV, SC, IM, o PO a cerdos Gottingen macho mostraron lo siguiente: después de una sola administración de infusión IV de 25 mg/kg o una sola administración de bolo IV de 2,5 mg/kg de defibrotide, las concentraciones en plasma media eran superiores a 1 µg/mL hasta 8 hr después de la dosis. Luego de la administración SC o IM de 25 mg/kg de defibrotide, las concentraciones en plasma fueron mayores que 1 µg/mL hasta 24 hr después de la dosis (el último punto de tiempo medido). Luego de una dosis PO de 100 mg/kg, las concentraciones en plasma de defibrotide fueron mayores que 1 µg/mL en un punto de tiempo en un animal (4 hr después de la dosis en el animal 14M) y en tres puntos de tiempo en un animal (5, 6, y 12 hr luego de la dosis en el animal 13M), pero fueron menos de 1 µg/mL en todos los puntos de tiempo en el tercer animal (15M).

[00145] Análisis farmacocinético: animal individual y parámetros PK resumidos también se midieron y se mostró lo siguiente: después de una infusión IV de 2 horas de 25 mg/kg de defibrotide, el $C_{m\acute{a}x/D}$ medio fue 1,52 (µg/mL)/(mg/kg) y el valor $AUC_{0-t/D}$ medio fue 3,56 (hr*µg/mL)/(mg/kg). Luego de la administración de bolo IV de 2,5 mg/kg de defibrotide, el $C_{m\acute{a}x/D}$ medio fue 14,4 (µg/mL)/(mg/kg) y el valor $AUC_{0-t/D}$ medio fue 8,30 (hr*µg/mL)/(mg/kg).

[00146] El $T_{m\acute{a}x}$ luego de la administración SC de 25 mg/kg de defibrotide varió de 0,25 a 8 hr luego de la dosis, aunque múltiples picos se observaron en los perfiles PK en plasma. La biodisponibilidad SC media (%F) fue 81,3 %. El $T_{m\acute{a}x}$ luego de la administración IM de 25 mg/kg de defibrotide varió de 0,25 a 0,50 hr después de la dosis. La biodisponibilidad IM media fue 108 %. En contraste, hubo muy pocas concentraciones medibles luego de la administración oral de 100 mg/kg de defibrotide. La biodisponibilidad media luego de la administración PO fue menor que 7,2 %.

[00147] Estos resultados muestran que la exposición a defibrotide fue prolongada después de la administración SC e IM, respecto a la administración IV. Los últimos valores MRT medios fueron 9,26 y 7,36 hr en los grupos de dosis SC e IM, respectivamente, en comparación con 1,30 y 2,16 hr en los grupos de dosis de infusión IV y de bolo IV, respectivamente.

6.6.2 Ejemplo 6.2 - Administración subcutánea de formulaciones de defibrotide HCLF

[00148] Para investigar adicionalmente la farmacocinética de formulaciones líquidas de concentración elevada administrada de forma subcutánea de defibrotide, tres formulaciones HCLF diferentes a 200 mg/mL se compararon con una única infusión intravenosa (IV) de 2 horas o inyección SC de Defitelio. Además, su biodisponibilidad mediante vías SC de administración se determinó respecto a la infusión IV.

[00149] Las formulaciones de HCLF a 200 mg/mL se prepararon tal como se describe anteriormente usando citrato de sodio, Gly-Gly o una combinación de estos amortiguadores como se indica. Se administró Defitelio a 4 mg/mL IV o 80 mg/mL SC usando las dosis mostradas en la Tabla 6 más adelante. Los cerdos Gottingen machos (n = 3 machos por grupo) recibieron una sola administración del artículo de prueba enumerado en la Tabla 6. Se analizó defibrotide usando el método analítico en el Ejemplo 6.1. Los parámetros PK se determinaron de forma similar como en el Ejemplo 6.1.

Tabla 6: Administración de varias formulaciones

Grupo	Vía/Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Concentración (mg/mL)	Volumen de dosis (mL/kg)
1	2-hr IV (Defitelio)	25	4	6,25
2	SC (Defitelio)	25	80	0,3125
3	SC (HCLF-1)	25	200	0,125
4	SC (HCLF-2)	25	200	0,125
5	SC (HCLF-3)	25	200	0,125

Nota: HCLF1: citrato de sodio 34 mM, pH 7,3; HCLF2: GlyGly 20 mM, pH 7,3; HCLF3: GlyGly 20 mM, citrato de sodio 10 mM, pH 7,3

[00150] La biodisponibilidad expresada como un porcentaje (%F) se calculó como se informó anteriormente y los resultados se muestran en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Parámetros PK de Defibrotide luego de la administración SC e IV

Tratamiento	C _{máx} μg/mL	T _{máx} h	AUC _{0-t} μg.h/mL	MRT _{0-t} h	F %
IV, infusión de 2 h	44,8 (5%)	0,500 (0,250-1,00)	91,6 (4%)	2,41 (64 %)	N/A
SC, Defitelio (80 mg/mL)	7,03 (17%)	0,500 (0,250-0,500)	56,1 (16%)	9,28 (7.6%)	61,3% (16 %)
SC HCLF1 (200 mg/mL)	6,40 (26%)	5,00 (4,00-12,0)	67,2 (42%)	9,91 (3%)	73,4% (42%)
SC HCLF2 (200 mg/mL)	7,45 (62%)	1,00 (0,500-12,0)	59,8 (30%)	10,9 (20%)	65,3% (30%)
SC HCLF3 (200 mg/mL)	5,80 (45%)	2,00 (1,00-4,00)	45,7 (24%)	9,47 (19%)	49,9% (24%)

Los valores medio y %CV informados excepto por T_{máx}, para el cual se informan la mediana y el intervalo de los valores observados (mínimo-máximo).

F (biodisponibilidad): calculado como AUC_{0-t} con dosificación SC dividida por la media geométrica AUC_{0-t} para el tratamiento IV

N/A: no aplica

[00151] Las concentraciones en plasma de defibrotide y los datos de concentración en plasma-tiempo se determinaron como anteriormente y se muestran en la Figura 6. Los perfiles PK en minicerdos individuales vistos en la Figura 6 muestran múltiples picos de absorción para todos los cuatro tratamientos SC (Defitelio y las 3 HCLF). Dado que defibrotide es una mezcla de oligonucleótidos, los múltiples picos se pueden deber a la variación en las tasas de absorción de los componentes individuales de defibrotide. Tomados juntos, los resultados indican que la biodisponibilidad de defibrotide es favorable con la dosificación SC a través de todas las formulaciones, que incluye las formulaciones líquidas de alta concentración.

[00152] Además, los tiempos de residencia promedio (MRT) de cuatro grupos SC variaban de 9,28 – 10,9 horas; mientras MRT del grupo IV fue solo 2,41 horas (Tabla 7); por lo tanto la administración SC proporcionaba liberación sostenida de defibrotide a aproximadamente cuatro veces y media aquella de la infusión IV. Esto es consistente con lo que se muestra en el Ejemplo 6.1, en que la administración SC de defibrotide en HCLF de baja viscosidad prolongaba la exposición en plasma de defibrotide en comparación con la administración IV.

[00153] Aunque no se desea estar limitado por ninguna teoría, el tiempo de circulación extendido mediante vía SC es probable debido a la naturaleza de defibrotide HCLF, que vuelve un patrón de liberación sostenida de absorción. La circulación extendida de defibrotide mediante administración SC de HCLF puede presentar una oportunidad para investigar regímenes alternos con menos dosificación menos frecuente y mejorar calidad de vida para los pacientes.

6.6.3 Ejemplo 6.3 – Comparación de perfiles farmacocinéticos de administraciones IV y SC

[00154] En un esfuerzo para demostrar la comparación PK de administración de HCLF SC, las simulaciones de perfiles PK luego de la infusión SC e IV se llevaron a cabo usando las técnicas de modelado compartimental. Un modelo simple de 1 compartimento con o sin un proceso de absorción de primer orden se usó para simular la infusión IV o el perfil PK de administración SC; respectivamente. En este ejercicio de modelado, los parámetros PK medio luego de una administración de infusión IV se tomaron del prospecto del paquete de Defitelio®. Para los estudios PK, la eliminación y volumen de distribución de un fármaco son informados típicamente como una función de biodisponibilidad; estos son el CL/F y V/F, respectivamente. Para la simulación PK usada en la presente, luego de la administración HCLF SC el V/F y CL/F medio se calcularon de los parámetros IV al asumir una biodisponibilidad de 70 %. Se asumió que la constante de velocidad de absorción era $0,22 \text{ h}^{-1}$, que es similar a la observada en los minicerdos. La dosis y régimen para la infusión IV fue 6,25 mg/kg/infusión (una dosis diaria total de 25 mg/kg/día), mediante una infusión IV de 2 horas, 4 veces al día. La dosis diaria y régimen para una administración SC fue 18 mg/kg/administración SC (una dosis diaria total de 36 mg/kg/día), 2 veces al día. La simulación se llevó a cabo para una persona con un peso corporal de 70 kg. Durante la simulación, el AUC total luego de una administración SC se mantuvo para que fuera igual a la de una infusión IV.

[00155] Tal como se muestra en la Figura 7, la concentración de plasma en función de los perfiles de tiempo demuestran la liberación lenta, constante de defibrotide luego de la administración SC en oposición a la eliminación rápida luego de cada infusión IV. Lo que es más importante, la mínima concentración de plasma de defibrotide luego de la administración SC fue mucho mayor que aquella de la infusión IV; mientras la $C_{\text{máx}}$ de administración SC fue similar a aquella de la infusión IV.

[00156] La farmacocinética de la administración SC representa un perfil que permite la exposición de plasma continua de defibrotide que puede ser importante para su actividad farmacológica. La relación de concentración pico respecto a plasma luego de la administración SC es alrededor de 8 en comparación con aquella de la infusión IV que es alrededor de 700.

[00157] Juntos, estos resultados demuestran que la administración subcutánea de defibrotide proporciona un perfil farmacocinético novedoso que difiere de forma considerable del PK de las

infusiones IV, tal como aquellos requeridos por las formulaciones de defibrotide actualmente disponibles. La liberación lenta y estable de defibrotide puede ser crítica para su perfil de beneficio respecto a riesgo y la farmacocinética subcutánea única permite el desarrollo de las nuevas dosis y/o regímenes de dosificación que pueden proporcionar una mejor eficacia y perfiles de seguridad

5 mejorados.