

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE EFRUXIFERMINA

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS E INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DEL MATERIAL PROPORCIONADO ELECTRÓNICAMENTE

Esta solicitud reivindica la prioridad a la Solicitud de Patente Provisional Estadounidense No. 63/255,286, presentada el 13 de octubre de 2021, cuya descripción se incorpora de este modo como referencia en su totalidad.

Se incorpora como referencia en su totalidad un listado de secuencias de nucleótidos/aminoácidos legible por computadora presentado simultáneamente con el presente documento e identificado como sigue: 50011_Seqlisting.XML; Tamaño: 2,497 bytes; Creado: 9 de octubre de 2022.

CAMPO DE LA INVENCION

La descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende Efruxifermina (EFX), procesos para preparar una composición liofilizada, y métodos de uso.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) es una hormona endocrina que actúa sobre el hígado, el páncreas, los músculos y el tejido adiposo para regular el metabolismo de los lípidos, los carbohidratos y las proteínas. Al actuar como hormona paracrina, el FGF21 humano también desempeña un papel fundamental en la protección de las células contra el estrés. Estos atributos hacen del agonismo del FGF21 un mecanismo terapéutico convincente, pero el FGF21 nativo está limitado por su corta vida media en el torrente sanguíneo. La proteína de fusión Fc-FGF21, Efruxifermina (EFX), ha sido modificado genéticamente para aumentar la vida media del FGF21 humano (Hecht et al, PLoS One 2012; 7(11): e49345; Stanislaus et al., Endocrinology. 2017; 158(5):1314-1327). Sin embargo, las formulaciones de EFX son susceptibles a modificaciones post-traduccionales, incluida la formación de variantes de carga y tamaño, lo que resulta en limitaciones de estabilidad. Existe una necesidad en la técnica de formulaciones farmacéuticas que proporcionen una estabilización mejorada y modificaciones post-traduccionales reducidas de las proteínas de fusión Fc-FGF21, tales como Efruxifermina (EFX).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende Efruxifermina (EFX), un azúcar, aproximadamente 20 hasta aproximadamente 200 mM de arginina/arginina-HCl o arginina/ácido glutámico, y un tensioactivo. En varios aspectos, la composición tiene un pH desde aproximadamente 6,9 hasta aproximadamente 8,1. En varios aspectos, el azúcar de la composición es sacarosa, glucosa, fructuosa, o maltosa. Opcionalmente, el tensioactivo de la composición es polisorbato-20 o polisorbato-80. En varios aspectos, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 25-150 mg/mL de EFX; aproximadamente 120 mM de sacarosa; aproximadamente 120 mM de arginina/arginina-HCl; aproximadamente 0,06% en peso/volumen (p/v) de polisorbato-20; y aproximadamente 20 mM de Tris-HCl. Opcionalmente, el pH de la composición es aproximadamente 7,3.

La composición de la descripción es, en varios casos, liofilizada, aunque esto no se requiera. En este sentido, la descripción proporciona un método para reconstituir una composición liofilizada descrita en este documento dentro de cinco minutos, y administrar la composición reconstituida a un sujeto. En varias modalidades, la composición reconstituida se mantiene a temperatura ambiente por hasta 10 minutos. La descripción también proporciona un dispositivo de cámara dual que comprende cualquiera de las composiciones descritas en este documento y un diluyente. En ciertos aspectos, el diluyente es agua para inyección o un agente amortiguador (por ejemplo, amortiguador compuesto basado en las formulaciones descritas en este documento).

La descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende EFX, 2,9% de L-Lisina, 0,008% en peso/volumen (p/v) de polisorbato-20, y 10 mM de Tris. En varios aspectos, la composición tiene un pH de $7,8 \pm 0,3$.

La descripción también proporciona un proceso para preparar composiciones liofilizadas. En varios aspectos, el proceso comprende los siguientes pasos: (a) congelar una composición descrita en este documento; (b) hibridar la composición del paso (a) a una temperatura de aproximadamente -5 °C hasta aproximadamente -15 °C; (c) secado primario del producto del paso (b) y d) secado secundario del producto del paso (c).

La descripción proporciona además (a) un método para tratar esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o enfermedad de hígado graso no alcohólica

(NAFL), esteatohepatitis alcohólica (ASH), enfermedad de hígado alcohólica (ALD) o enfermedad de hígado graso alcohólica (AFL), diabetes tipo 2, obesidad, dislipidemia, enfermedades de mal plegado de la proteína, relacionadas con el alcohol y otros antojos o adicciones en un sujeto en necesidad del mismo; (b) un método para normalizar el contenido de hígado graso en un sujeto; (c) un método para revertir la cirrosis hepática o reducir la fibrosis asociada con NASH, ASH, ALD, AFL, o enfermedad de mal plegado de la proteína; (d) un método para reducir la glucosa en sangre y/o aumentar la sensibilidad de la insulina en un sujeto; y (e) un método para reducir los niveles de ácido úrico en un sujeto. El método comprende administrar una composición farmacéutica descrita en este documento a un sujeto en necesidad de la misma.

El sumario anterior no pretende definir todos los aspectos de la invención, y se describen aspectos adicionales en otras secciones, tales como la Descripción detallada. Se pretende que el documento completo se relacione como una descripción unificada, y debe entenderse que se contemplan todas las combinaciones de características aquí descritas, incluso si la combinación de características no se encuentran juntas en la misma oración, párrafo o sección de este documento. Además, la invención incluye, como un aspecto adicional, todos los aspectos de la invención de alcance más limitado que las variaciones específicamente mencionadas anteriormente.

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente solicitud tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben construirse como términos abiertos a menos que se indique lo contrario. Si se describen aspectos de la invención como “que comprenden” una característica, también se contemplan aspectos que “consisten de” o “que consisten esencialmente de” la característica. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, “tales como”) proporcionados en este documento, tiene como objetivo simplemente ilustrar mejor la descripción y no representa una limitación en el alcance de la descripción a menos que se indique lo contrario. Ningún lenguaje en la especificación debe

construirse de modo que indique que algún elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la descripción. Excepto en los ejemplos operativos, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades deben entenderse modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”, tal como ese término podría ser interpretado por el experto en la técnica relevante. Con respecto a los aspectos de la invención descritos o reivindicados con “un” o “uno”, debe entenderse que estos términos significan “uno o más”, a menos que el contexto requiera inequívocamente un significado más restringido. Con respecto a elementos descritos como uno o más dentro de un conjunto, debe entenderse que se contemplan todas las combinaciones dentro del conjunto.

También debe entenderse que cuando se describe un rango de valores, la descripción contempla valores individuales que se encuentran dentro del rango. Por ejemplo, “un pH desde aproximadamente pH 6 hasta aproximadamente pH 8,” podría ser, pero no se limita a, pH 6,1, 6,6, 7,2, 7,5, etc., y cualquier valor intermedio entre tales valores. En cualquiera de los rangos descritos en el presente documento, los puntos finales del rango están incluidos en el rango. Sin embargo, la descripción también contempla los mismos rangos en los que se excluye el punto final inferior y/o superior. Cuando se utiliza el término “aproximadamente”, significa el número mencionado más o menos el 5%, el 10% o más de ese número recitado. La variación actual propuesta se puede determinar a partir del contexto.

Las características y variaciones adicionales de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la totalidad de esta solicitud, incluidas las figuras y la descripción detallada, y todas esas características pretenden ser aspectos de la invención. Asimismo, las características de la invención descritas en el presente documento se pueden volver a combinar en aspectos adicionales que también pretenden ser aspectos de la invención, independientemente de si la combinación de características se especifica como un aspecto de la invención. Se pretende que el documento completo se relacione como una descripción unificada, y debe entenderse que todas las combinaciones de características aquí descritas (incluso si se describen en secciones separadas) están contempladas, incluso si la combinación de características no se encuentra junta en la misma oración, párrafo o sección de este documento. Además, sólo las limitaciones que se describen en el presente documento como críticas para la invención deben considerarse como tales;

las variaciones de la invención que carecen de limitaciones que no se han descrito en el presente documento como críticas se consideran aspectos de la invención. El uso de títulos de sección es simplemente para facilitar la lectura; debe entenderse que se contemplan todas las combinaciones de características descritas en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra la estructura esquemática de EFX con enlaces de disulfuro y cadenas polipeptídicas.

Las **Figuras 2A-2B** muestran la formación en gel visualmente observada y preparación de fase Schlieren de EFX en varias formulaciones a $\text{pH} \leq 6,5$.

La **Figura 3** muestra la viscosidad dinámica inicial de EFX 100 mg/mL en las formulaciones F1 a F20 (excepto F11) a velocidad de corte de 400 s^{-1} y tiempo cero.

Las **Figuras 4A-4B** muestran la viscosidad dinámica de EFX en las formulaciones F1 a F20 (excepto F11) después de 3 días a $40^\circ\text{C}/75\%$ de humedad relativa (RH) seguido por almacenamiento por 21 meses a $2-8^\circ\text{C}$ a velocidad de corte de 10 s^{-1} (La **Figura 4B** es una vista ampliada desde 0 hasta 50 cP).

Figuras 5A-5C. La **Figura 5A** muestran EFX en las formulaciones susceptible a formar geles y separación de fase, que demuestran el efecto de adelgazamiento de corte no Newtoniano. Las **Figuras 5B y 5C** muestran que, por el contrario, las formulaciones caracterizadas con viscosidades bajas a $\text{pH} \geq 6,5$, demostraron el comportamiento Newtoniano.

La **Figura 6** muestra un Ejemplo del Cromatograma de HPLC de AEX de EFX en la formulación de Tris/Lys F18.

La **Figura 7** muestra la distribución de variantes de carga en la formulación de EFX F18 separada por procedimiento isoeléctrico capilar de imagen (icIEF).

Figuras 8A-8C. La **Figura 8A** muestra la formación de variantes de carga EFX, medidas por AEX-HPLC en función del tiempo a 25°C en varias formulaciones. EFX en F33 demuestra las tasas más bajas de pérdida de pureza (como % del área del pico principal) a lo largo del tiempo. La **Figura 8B** muestra la abundancia relativa en porcentaje del área total de variantes de carga básica (pre-picos) mediante AEX-HPLC en el tiempo cero, 1 semana y 1 mes a $25^\circ\text{C}/60\%$ de HR

para las formulaciones F1 a F20. La **Figura 8C** muestra la abundancia relativa en porcentaje del área total de variantes de carga ácida (post-picos) mediante AEX-HPLC en el tiempo cero, 1 semana y 1 mes a 25 °C/60% de RH para las formulaciones F1 a F20.

La **Figura 9** muestra la formación de variantes de carga EFX, medidas por AEX-HPLC en función del tiempo. El ensayo se realizó a una temperatura objetivo de 5 °C, lo que proporcionó resultados representativos de un rango de temperatura de 2 a 8 °C. EFX en F33 demuestra la tasa más lenta de pérdida de pureza (como % de disminución del área del pico principal) a lo largo del tiempo.

La **Figura 10** muestra un perfil de HPLC de Exclusión de Tamaño de EFX en la Formulación F18.

La **Figura 11** muestra la formación de variantes de tamaño (HMWS, LMWS) de EFX cuando se almacena a 25 °C, cuantificado por SE-HPLC de varias formulaciones. EFX en F33 demostró la tasa más baja de pérdida de pureza por semana de las formulaciones examinadas.

La **Figura 12** muestra la formación de variantes de tamaño (HMWS, LMWS) de EFX cuando se almacena a 2-8 °C, cuantificado por SE-HPLC de varias formulaciones. EFX en F33 demostró la tasa más baja de pérdida de pureza en las formulaciones examinadas.

La **Figura 13** es un electroferograma de ejemplo de CE-SDS no reducido de EFX (F18).

La **Figura 14** muestra variantes de tamaño (HMWS, LMWS) de EFX por CE-SDS (no reducido) en varias formulaciones durante el almacenamiento a 25 °C. EFX en F33 demostró la tasa más baja de pérdida de pureza en las formulaciones probadas.

La **Figura 15** muestra las variantes de tamaño de EFX por CE-SDS (no reducido) en varias formulaciones durante el almacenamiento a 2-8 °C.

La **Figura 16** muestra análisis de EFX por HPLC de Fase Inversa.

La **Figura 17** muestra la formación de variantes de tamaño (HMWS, LMWS) en varias formulaciones de EFX almacenada a 25 °C, según lo medido por RP-HPLC. EFX en F18 y F33 demostró las tasas más lentas de pérdida de pureza.

La **Figura 18** muestra la formación de variantes de tamaño (HMWS, LMWS) en varias formulaciones de EFX a 2-8 °C, medidas por RP-HPLC. EFX en F18

y F33 demostró las tasas más lentas de pérdida de pureza.

La **Figura 19** muestra el cromatograma SEC-MALLS de EFX en F18 que muestra el pico principal y los picos correspondientes al dímero y a las especies de HMW.

La **Figura 20** muestra un perfil de distribución del coeficiente de sedimentación de EFX en F18 y F33 analizado por SV-AUC.

La **Figura 21** muestra una curva de respuesta de concentración para EFX en F18 medida mediante el bioensayo de potencia basado en células iLite FGF21. Los datos mostrados son RLU (unidades relativas de luminiscencia) medias de diluciones de EFX colocadas por triplicado en una sola placa. Las barras de error indican la desviación estándar de valores de RLU por triplicado.

La **Figura 22** muestra la potencia de EFX mediante bioensayo celular en varias formulaciones almacenadas a 25 °C en función del tiempo y en comparación con el estándar EFX. EFX en F33 demostró las tasas más bajas de pérdida de potencia.

La **Figura 23** muestra la potencia de EFX mediante bioensayo basado en células en varias formulaciones almacenadas a 2-8 °C en función del tiempo y en comparación con el estándar EFX. EFX en F33 demostró las tasas más bajas de pérdida de potencia de las formulaciones probadas.

La **Figura 24** muestra el espectro FTIR de la segunda derivada de EFX en formulaciones F18 y F33.

La **Figura 25** muestra el espectro CD de UV lejano de EFX en las formulaciones F18 y F33.

La **Figura 26** muestra el espectro CD cercano al UV de EFX en F18 y F33.

Las **Figuras 27A-27B** muestran el termograma μ DSC de EFX en F18 (**Figura 27A**) y F33 (**Figura 27B**) después de la corrección de la línea de base.

La **Figura 28** muestra termogramas μ DSC de EFX F18 y F33 calentados dos veces a 50 °C.

La **Figura 29** muestra un ejemplo de un diseño de proceso de liofilización sin hibridación (vial).

Las **Figuras 30A-30B** muestran un ejemplo de un diseño de proceso de liofilización con un paso de proceso de hibridación realizado durante 5 horas a -10 °C

(**Figura 30A**: vial) y un paso de proceso de hibridación durante 10 horas a -15°C (**Figura 30B**: dispositivo de cámara dual).

La **Figura 31** muestra los tiempos de reconstitución de EFX liofilizado en formulaciones seleccionadas.

La **Figura 32** muestra los tiempos de reconstitución de F33 liofilizado en viales, después de la incorporación de un paso de hibridación en el proceso de liofilización (10 horas a -5°C).

Las **Figuras 33A-33B** muestran los tiempos de reconstitución de F33 liofilizado en dispositivos de doble cámara, después de la incorporación de un paso de hibridación en el proceso de liofilización (10 horas a -15°C).

La **Figura 34** muestra el área de superficie específica de la torta liofilizada producida a partir de formulaciones que incluyen los mismos componentes que F33 pero con diferentes concentraciones de EFX (F1: 50 mg/ml EFX; F2: 28 mg/ml EFX), mediante liofilización con y sin un paso de hibridación, medida por BET (método de Brunauer, Emmett y Teller). Las tortas liofilizadas se produjeron utilizando un paso de hibridación de -5°C durante 10 horas o -10°C durante 5 horas y se compararon con las tortas producidas sin un paso de hibridación durante la liofilización (diseño de proceso NA).

La **Figura 35** muestra secciones de torta liofilizada para análisis SEM-EDX.

La **Figura 36** muestra la distribución y el área de sección transversal mediana de los poros de la torta liofilizada mediante SEM-EDX presentados como diagramas de caja y bigotes.

La **Figura 37** muestra que la estructura de la torta liofilizada por SEM mejora mediante la incorporación de un paso de hibridación en el ciclo de liofilización. FR1 y FR2 representan la formulación F33 a una concentración de proteína de 50 mg/ml y 28 mg/ml, respectivamente.

La **Figura 38** muestra una tabla de estabilidad a largo plazo de EFX liofilizado a 25°C en las formulaciones F15, F16, F17 y F33.

La **Figura 39** es un gráfico de líneas que ilustra la persistencia de EFX administrada en varias formulaciones a ratas como se describe en el Ejemplo 7. La concentración (ng/mL) se indica en el eje y, mientras que el tiempo (horas) se anota en el eje x.

La **Figura 40** es un gráfico que resume los parámetros de farmacocinética indicativos de la exposición sistémica general (AUC) y la concentración más alta en circulación sistémica (C_{máx}) de EFX administrada en varias formulaciones descritas en los Ejemplos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La EFX es una variante de FGF21 fusionada a un dominio Fc. De manera sorprendente, la EFX muestra propiedades únicas que complican la formulación y el almacenamiento de la proteína. Los productos biológicos inyectables parentales se formulan con frecuencia a un pH ligeramente ácido a neutro (por ejemplo, pH de 5,2 a pH 6,9) para minimizar las modificaciones post-traduccionales, como la desamidación. De manera inesperada, la EFX adopta propiedades viscoelásticas dramáticamente diferentes a un pH inferior a 6,5, lo que manifiesta un comportamiento similar al de un gel, separación de fases y pérdida de fluidez. Estas características desafían la administración subcutánea del producto y el desarrollo de productos biológicos inyectables. Además, a pH 6,9 o menos, las composiciones de EFX demostraron una propensión a la agregación y recorte/fragmentación de proteínas, junto con la formación de partículas visibles y subvisibles. Estos cambios tampoco son deseables para los productos biológicos inyectables, ya que pueden estar asociados con problemas de seguridad (particularmente inmunogenicidad) y estabilidad. Los materiales y métodos descritos en el presente documento proporcionan una ventaja técnica significativa al proporcionar formulaciones de EFX que son adecuadas para inyección y estables cuando se almacenan, por ejemplo, como líquido en condiciones refrigeradas (2-8 °C) y como lífilo en condiciones ambientales y de refrigeración (25°C). En varios aspectos de la descripción, la formulación descrita en el presente documento proporciona estabilidad conformacional EFX mejorada (mediante, por ejemplo, previniendo o minimizando la separación de fases, la formación de gel rígido, el comportamiento viscoelástico no newtoniano y la agregación y/o formación de partículas), reduce las modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, variantes de carga y/o tamaño), e imparte propiedades de solución beneficiosas a las composiciones EFX.

Definiciones

La terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir modalidades particulares únicamente y no pretende ser limitante.

“AEX HPLC” se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico.

“ASH” se refiere a esteatohepatitis alcohólica.

“ALD” se refiere a enfermedad de hígado alcohólica.

“AFL” se refiere a enfermedad de hígado graso alcohólica.

“BET” se refiere al método de Brunauer, Emmett y Teller.

“CE-SDS” se refiere a electroforesis capilar con dodecilsulfato de sodio.

“EFX” se refiere a Efruxifermina.

“HMWS” se refiere a Especies de Alto Peso Molecular.

“icIEF” se refiere a procedimiento isoeléctrico capilar de imagen.

“LMWS” se refiere a Especies de Bajo Peso Molecular.

“NAFL” se refiere a enfermedad de hígado graso no alcohólica.

“NASH” se refiere a esteatohepatitis no alcohólica.

“RH” se refiere a humedad relativa.

“RP-HPLC” se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa.

“SE-HPLC” se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión de tamaño.

“SEM-EDX” se refiere a Microscopio Electrónico de Barrido con Espectroscopio de Rayos X de Dispersión de Energía.

“SV-AUC” se refiere a Ultracentrifugación Analítica de Velocidad de Sedimentación.

“pI” se refiere al punto isoeléctrico.

La descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende Efruxifermina. En varios aspectos, la composición comprende EFX, un azúcar, arginina/arginina-HCl o arginina/ácido glutámico (por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 20-200 mM), y un tensioactivo. La composición tiene un pH desde aproximadamente 6,9 hasta aproximadamente 8,1. En aspectos alternativos, la composición comprende EFX, L-Lisina, un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato-20), y Tris, a un pH de aproximadamente $7,8 \pm 0,3$. También se proporciona un proceso para preparar una composición liofilizada que comprende EFX. La descripción proporciona además método para usar las composiciones farmacéuticas descritas en este documento para tratar una variedad de trastornos,

tales como (pero no limitados a) esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFL), esteatohepatitis alcohólica (ASH), enfermedad de hígado alcohólica (ALD) o enfermedad de hígado graso alcohólica (AFL), diabetes tipo 2, obesidad, hipertrigliceridemia, dislipidemia, enfermedad de mal plegado de las proteínas, antojos y adicción, así como también reducir la fibrosis asociada con NASH, invertir la cirrosis hepática o reducir la fibrosis asociada con NASH, ASH, ALD, AFL o enfermedad de mal plegado de la proteína, normalizar el contenido de grasa en el hígado, reducir la glucosa en sangre, aumentar la sensibilidad de la insulina, y/o reducir los niveles de ácido úrico. Varios aspectos de la composición y métodos se describen en más detalle a continuación. El uso de subtítulos es simplemente para comodidad del lector y no debe interpretarse como una limitación de la descripción de ninguna manera. Se pretende que el documento completo se lea como una descripción unificada y se contemplan todas las combinaciones de características que se describen a continuación.

La EFX es un análogo del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) de acción prolongada de 92,1 kDa generado por la fusión del fragmento Fc de IgG1 de inmunoglobulina humana a través de un conector de poliglicina-serina con una variante de FGF21 humano. Cada molécula contiene un dominio Fc dimérico y dos cadenas polipeptídicas de FGF21 modificadas.

La EFX es un análogo del factor 21 del crecimiento del fibroblatos de acción prolongada de 92,1 kDa (FGF21) generado por la fusión del fragmento Fc de IgG1 inmunoglobulina humana mediante un enlazador de poli glicina-serina a una variante del FGF21 humano. Cada molécula contiene un dominio Fc dimérico y dos cadenas polipeptídicas de FGF21 modificadas. La EFX tiene 8 enlaces disulfuro, 6 intracadena y 2 intercadena, como se muestra en la Figura 1. Dos de los enlaces disulfuro intracadena se encuentran en el polipéptido FGF21 entre Cys318 y Cys336, uno para cada monómero. Se introdujeron tres modificaciones en la secuencia de FGF21 en L341R, P414G y A423E (correspondientes a L98R, P171G y A180E en relación con el FGF21 humano maduro). Estas modificaciones 1) disminuyen la susceptibilidad a la degradación proteolítica *in vivo*, 2) aumentan la afinidad por β -Klotho y 3) disminuyen la propensión a agregarse (Hecht et al., PLoS One 2012; 7(11): e49345; Stanislaus et al., Endocrinology. 2017; 158(5):1314-1327).

La EFX comprende la secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID

NO: 1. La EFX ha sido descrita además en las Patentes Estadounidenses Nos. 8,034,770; 8,410,051; 8,642,546; 8,361,963; 9,273,106; 10,011,642; 8,188,040; 8,835,385; 8,795,985; 8,618,053; y 11,072,640; o Publicaciones de Solicitudes de Patente Internacional Nos. WO2009149171 y WO2010129503, las descripciones de las cuales se incorporan en este documento por referencia en sus totalidades.

La EFX puede estar presente en la composición farmacéutica en cualquier cantidad adecuada. En varios aspectos, la concentración de EFX en la composición farmacéutica es aproximadamente 25 mg/ml hasta aproximadamente 150 mg/ml. Por ejemplo, la concentración de EFX en la composición farmacéutica es al menos aproximadamente 25 mg/ml, al menos aproximadamente 30 mg/ml, al menos aproximadamente 35 mg/ml, al menos aproximadamente 40 mg/ml, al menos aproximadamente 45 mg/ml, al menos aproximadamente 50 mg/ml, o al menos aproximadamente 70 mg/ml, y no mayor de aproximadamente 150 mg/ml, no mayor de aproximadamente 140 mg/ml, no mayor de aproximadamente 130 mg/ml, no mayor de aproximadamente 120 mg/ml, no mayor de aproximadamente 110 mg/ml, o no mayor de aproximadamente 100 mg/ml. En aspectos ejemplares, la composición comprende EFX en una concentración de aproximadamente 28 mg/ml. En aspectos ejemplares, la composición comprende EFX en una concentración de aproximadamente 50 mg/ml. En aspectos ejemplares, la composición comprende EFX en una concentración de aproximadamente 70 mg/ml. En aspectos ejemplares, la composición comprende EFX en una concentración de aproximadamente 100 mg/ml.

La composición farmacéutica que comprende EFX puede ser una formulación líquida, liofilizada, o gel.

Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento comprenden un azúcar. Los azúcares adecuados incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, fructuosa, maltosa, glucosa, galactosa, lactosa, sorbitol, manitol, o una combinación de los mismos. El azúcar puede estar presente en la composición en una concentración de aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 250 mM, o aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 220 mM, o aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 220 mM, o aproximadamente 80 hasta aproximadamente 220 mM, o aproximadamente 120 mM. En algunos aspectos, la concentración de azúcar en la composición farmacéutica es al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 20 mM, al menos aproximadamente 30 mM, al menos

aproximadamente 40 mM, al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 60 mM, al menos aproximadamente 70 mM, al menos aproximadamente 80 mM, al menos aproximadamente 90 mM, al menos aproximadamente 100 mM, al menos aproximadamente 110 mM, o al menos aproximadamente 120 mM, y no mayor de aproximadamente 250 mM, no mayor de aproximadamente 240 mM, no mayor de aproximadamente 230 mM, no mayor de aproximadamente 220 mM, no mayor de aproximadamente 210 mM, no mayor de aproximadamente 200 mM, no mayor de aproximadamente 190 mM, no mayor de aproximadamente 180 mM, no mayor de aproximadamente 170 mM, no mayor de aproximadamente 160 mM, no mayor de aproximadamente 150 mM, no mayor de aproximadamente 140 mM, o no mayor de aproximadamente 130 mM.

Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas descritas en este documento comprenden un azúcar en una concentración de aproximadamente 50 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 115 mM, aproximadamente 120 mM, o aproximadamente 125 mM, aproximadamente 130 mM, aproximadamente 135 mM, aproximadamente 140 mM, aproximadamente 145 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 155 mM, aproximadamente 160 mM, aproximadamente 165 mM, aproximadamente 175 mM, aproximadamente 180 mM, aproximadamente 185 mM, aproximadamente 190 mM, aproximadamente 210 mM, aproximadamente 215 mM, aproximadamente 220 mM, aproximadamente 225 mM, aproximadamente 230 mM, o aproximadamente 235 mM.

En varios aspectos, la composición farmacéutica es una forma líquida o liofilizada. Una composición farmacéutica líquida o liofilizada ejemplar (por ejemplo, una forma liofilizada preparada por liofilización de cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en este documento) comprende sacarosa en una concentración de aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 220 mM, tal como aproximadamente 80 mM o aproximadamente 120 mM.

En varios aspectos, el azúcar es trehalosa. Por ejemplo, en algunos aspectos, la composición farmacéutica es una formulación en gel y el azúcar es trehalosa. Una formulación en gel ejemplar comprende trehalosa en una concentración de aproximadamente 180 mM hasta aproximadamente 250 mM, tal como 220 mM.

En varios aspectos, la formulación farmacéutica comprende un aminoácido, tal como arginina, arginina/arginina-HCl, arginina/ácido glutámico, glicina,

glutamina, asparagina, o lisina. En varios aspectos, la composición comprende arginina/arginina-HCl. En varios aspectos, la arginina/arginina-HCl está presente a una tasa de aproximadamente 1:10 de arginina/arginina-HCl hasta aproximadamente 1:100 de arginina/arginina-HCl. En algunos aspectos, la arginina/arginina-HCl está en una tasa de aproximadamente 1:30 de arginina/arginina-HCl hasta aproximadamente 1:50 de arginina/arginina-HCl. En varios aspectos, la arginina/arginina-HCl está presente a una tasa de aproximadamente 1:10 de arginina/arginina-HCl, aproximadamente 1:20 de arginina/arginina-HCl, aproximadamente 1:30 de arginina/arginina-HCl, aproximadamente 1:40 de arginina/arginina-HCl, aproximadamente 1:50 de arginina/arginina-HCl, aproximadamente 1:60 de arginina/arginina-HCl, aproximadamente 1:70 de arginina/arginina-HCl, aproximadamente 1:80 de arginina/arginina-HCl, aproximadamente 1:90 de arginina/arginina-HCl, o aproximadamente 1:100 de arginina/arginina-HCl. En varios aspectos, la composición comprende aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 200 mM de arginina/arginina-HCl. Por ejemplo, la concentración de arginina/arginina-HCl en la composición farmacéutica es, en varios aspectos, al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 55 mM, al menos aproximadamente 60 mM, al menos aproximadamente 65 mM, al menos aproximadamente 70 mM, al menos aproximadamente 75 mM, al menos aproximadamente 80 mM, al menos aproximadamente 85 mM, al menos aproximadamente 90 mM, al menos aproximadamente 95 mM, o al menos aproximadamente 100 mM, y no mayor de aproximadamente 200 mM, no mayor de aproximadamente 180 mM, no mayor de aproximadamente 175 mM, no mayor de aproximadamente 160 mM, no mayor de aproximadamente 155 mM, no mayor de aproximadamente 150 mM, no mayor de aproximadamente 145 mM, no mayor de aproximadamente 140 mM, no mayor de aproximadamente 135 mM, no mayor de aproximadamente 130 mM, no mayor de aproximadamente 125 mM no mayor de aproximadamente 120 mM, no mayor de aproximadamente 110 mM, no mayor de aproximadamente 100 mM, no mayor de aproximadamente 90 mM, no mayor de aproximadamente 80 mM, no mayor de aproximadamente 70 mM, o no mayor de aproximadamente 60 mM. En un aspecto representativo de la descripción, la composición comprende aproximadamente 120 mM de arginina/arginina-HCl. En otro aspecto representativo de la descripción, la composición comprende aproximadamente 80 mM de arginina/arginina-HCl. En varios

aspectos, la composición farmacéutica es una forma de gel. Una composición farmacéutica en gel ejemplar está libre de uno o más aminoácido(s) (es decir, no contiene un aminoácido, tal como arginina, arginina/arginina-HCl, arginina/ácido glutámico, glicina, glutamina, asparagina, o lisina).

En varios aspectos, la composición comprende arginina/ácido glutámico o arginina/glutamato. Como se usa en este documento, “ácido glutámico” y “glutamato” pueden ser usados de manera intercambiable. En varios aspectos, la arginina/ácido glutámico está presente a una tasa de aproximadamente 1:10 de arginina/ácido glutámico hasta aproximadamente 1:100 de arginina/ácido glutámico. En varios aspectos, la arginina/ácido glutámico está presente a una tasa de aproximadamente 1:10 de arginina/ácido glutámico, aproximadamente 1:20 de arginina/ácido glutámico, aproximadamente 1:30 de arginina/ácido glutámico, aproximadamente 1:40 de arginina/ácido glutámico, aproximadamente 1:50 de arginina/ácido glutámico, aproximadamente 1:60 de arginina/ácido glutámico, aproximadamente 1:70 de arginina/ácido glutámico, aproximadamente 1:80 de arginina/ácido glutámico, aproximadamente 1:90 de arginina/ácido glutámico, o aproximadamente 1:100 de arginina/ácido glutámico. En algunos aspectos, la arginina/ácido glutámico está presente a una tasa de aproximadamente 1:30 de arginina/ácido glutámico hasta aproximadamente 1:50 de arginina/ácido glutámico.

En varios aspectos, la composición comprende desde aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 200 mM de arginina/ácido glutámico. Por ejemplo, la concentración total de arginina/ácido glutámico en la composición farmacéutica es opcionalmente al menos aproximadamente 20 mM, al menos aproximadamente 30 mM, al menos aproximadamente 35 mM, al menos aproximadamente 40 mM, al menos aproximadamente 45 mM, o al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 55 mM, al menos aproximadamente 60 mM, al menos aproximadamente 65 mM, al menos aproximadamente 70 mM, al menos aproximadamente 75 mM, al menos aproximadamente 80 mM, al menos aproximadamente 85 mM, al menos aproximadamente 90 mM, al menos aproximadamente 95 mM, o al menos aproximadamente 100 mM, y no mayor de aproximadamente 200 mM, no mayor de aproximadamente 180 mM, no mayor de aproximadamente 175 mM, no mayor de aproximadamente 170 mM, no mayor de aproximadamente 165 mM, no mayor de aproximadamente 160 mM, no mayor de

aproximadamente 155 mM, no mayor de aproximadamente 150 mM, no mayor de aproximadamente 145 mM, no mayor de aproximadamente 140 mM, no mayor de aproximadamente 135 mM, no mayor de aproximadamente 130 mM, no mayor de aproximadamente 125 mM, no mayor de aproximadamente 120 mM, no mayor de aproximadamente 115 mM, no mayor de aproximadamente 110 mM, no mayor de aproximadamente 105 mM, no mayor de aproximadamente 100 mM, no mayor de aproximadamente 90 mM, no mayor de aproximadamente 80 mM, no mayor de aproximadamente 70 mM, o no mayor de aproximadamente 60 mM. En aspectos ejemplares, la composición comprende arginina/ácido glutámico en una concentración total dentro del rango de 80-150 mM o 90-150 mM, tal como aproximadamente 80 mM o aproximadamente 120 mM.

En varios aspectos, el aminoácido es lisina (por ejemplo, L-Lisina o L-Lisina-HCl). Cualquier descripción en este documento que se refiere a L-Lisina también aplica a Lisina-HCl. En varios aspectos, la composición comprende aproximadamente 0,1%-10% lisina. Por ejemplo, la concentración de lisina en la composición farmacéutica es opcionalmente al menos aproximadamente 0,1%, al menos aproximadamente 0,5%, al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 1,5%, o al menos aproximadamente 2%, y no mayor de aproximadamente 10%, no mayor de aproximadamente 9%, no mayor de aproximadamente 8%, no mayor de aproximadamente 7%, no mayor de aproximadamente 6%, no mayor de aproximadamente 4%, o no mayor de aproximadamente 3%. En aspectos ejemplares, la composición comprende lisina en una concentración de aproximadamente 2,9%. En varios aspectos, la composición comprende aproximadamente 6,8 mM-684,0 mM de L-Lisina. Por ejemplo, la concentración de L-Lisina en la composición farmacéutica es opcionalmente al menos aproximadamente 6,8 mM, al menos aproximadamente 34,2 mM, al menos aproximadamente 68,4 mM, al menos aproximadamente 102,6 mM, o al menos aproximadamente 136,8 mM, y no mayor de aproximadamente 684,0 mM, no mayor de aproximadamente 615,6 mM, no mayor de aproximadamente 547,2 mM, no mayor de aproximadamente 478,8 mM, no mayor de aproximadamente 410,4 mM, no mayor de aproximadamente 273,6 mM, o no mayor de aproximadamente 205,2 mM. En aspectos ejemplares, la composición comprende L-Lisina en una concentración de aproximadamente 198,3 mM. En varios aspectos, la composición comprende

aproximadamente 5,5 mM -547,5 mM de Lisina-HCl. Por ejemplo, la concentración de Lisina-HCl en la composición farmacéutica es opcionalmente al menos aproximadamente 5,5 mM, al menos aproximadamente 27,4 mM, al menos aproximadamente 54,8 mM, al menos aproximadamente 82,1 mM, o al menos aproximadamente 109,5 mM, y no mayor de aproximadamente 547,5 mM, no mayor de aproximadamente 492,7 mM, no mayor de aproximadamente 438,0 mM, no mayor de aproximadamente 383,2 mM, no mayor de aproximadamente 328,5 mM, no mayor de aproximadamente 218,0 mM, o no mayor de aproximadamente 164,2 mM. En aspectos ejemplares, la composición comprende Lisina-HCl en una concentración de aproximadamente 158,8 mM.

En varios aspectos, la composición comprende un agente amortiguador alcalinizante, tal como Tris (trometamina) y/o Tris-HCl. Como se usa en este documento, "Tris" y "trometamina" pueden ser usados de manera intercambiable. En varios aspectos, la composición comprende aproximadamente 1-50 mM de Tris. Por ejemplo, la concentración de Tris en la composición farmacéutica es opcionalmente al menos aproximadamente 1 mM, al menos aproximadamente 5 mM, al menos aproximadamente 10 mM, y no mayor de aproximadamente 15 mM, no mayor de aproximadamente 20 mM, no mayor de aproximadamente 25 mM, no mayor de aproximadamente 30 mM, no mayor de aproximadamente 35 mM, no mayor de aproximadamente 40 mM, no mayor de aproximadamente 45 mM, o no mayor de aproximadamente 50 mM. En aspectos ejemplares, la composición comprende Tris en una concentración de aproximadamente 10 mM. En varios aspectos, la composición comprende aproximadamente 1-50 mM de Tris-HCl. Por ejemplo, la concentración de Tris-HCl en la composición farmacéutica es opcionalmente al menos aproximadamente 1 mM, al menos aproximadamente 5 mM, al menos aproximadamente 10 mM, y no mayor de aproximadamente 15 mM, no mayor de aproximadamente 20 mM, no mayor de aproximadamente 25 mM, no mayor de aproximadamente 30 mM, no mayor de aproximadamente 35 mM, no mayor de aproximadamente 40 mM, no mayor de aproximadamente 45 mM, o no mayor de aproximadamente 50 mM. En aspectos ejemplares, la composición comprende Tris-HCl en una concentración de aproximadamente 10 mM. En varios aspectos, la composición comprende ambos aproximadamente 1-50 mM de Tris y 1-50 mM de Tris-HCl.

La composición farmacéutica descrita en este documento comprende, en varios aspectos, un tensioactivo. Opcionalmente, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico. Tensioactivos ejemplares incluyen, pero no se limitan a polisorbato 20 (PS20), polisorbato 40 (PS40), polisorbato 60 (PS60), polisorbato 80 (PS80), poloxámero 188, poloxámero 407, polioxietileno, o una combinación de los mismos. En varios aspectos, el tensioactivo es polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, o polisorbato 80. En un aspecto ejemplar, el tensioactivo es polisorbato 80. En otro aspecto ejemplar, el tensioactivo es polisorbato 20.

En varias modalidades, la formulación comprende además polietilenglicol (PEG) de cualquier peso molecular, tal como PEG 3350, PEG 4000, PEG 6000, o PEG1000 (por ejemplo, PEG 3350 o PEG 4000). Por ejemplo, la formulación, en varios aspectos, comprende aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 5% de PEG (por ejemplo, PEG 4000), opcionalmente aproximadamente 0,15% hasta aproximadamente 1,5% de PEG (por ejemplo, PEG 4000), tal como aproximadamente 0,1% hasta aproximadamente 1% de PEG (por ejemplo, PEG 4000) o aproximadamente 0,5% de PEG (por ejemplo, PEG 4000). Alternativamente, en varias modalidades, la formulación comprende hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) o carboximetil celulosa (CMC) o una sal de las mismas, tal como hidroxipropil metilcelulosa de sodio (Na-HPMC) o carboximetil celulosa de sodio (Na-CMC). En este sentido, la formulación opcionalmente comprende aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 5% de CMC o HPMC (o sal del mismo), opcionalmente aproximadamente 0,15% hasta aproximadamente 1,5% de HPMC (por ejemplo, Na-HPMC) o CMC (por ejemplo, Na-CMC), tal como aproximadamente 0,1% hasta aproximadamente 1% de HPMC (por ejemplo, Na-HPMC) o CMC (por ejemplo, Na-CMC) o aproximadamente 0,5% de HPMC (por ejemplo, Na-HPMC) o CMC (por ejemplo, Na-CMC). En varios aspectos, la formulación comprende una mezcla de PEG y CMC (o sal del mismo) o HPMC (o sal del mismo), tal como estos componentes en cualquiera de las cantidades descritas en este documento. Opcionalmente, la formulación comprende PEG, HPMC (o sal del mismo), y CMC (o sal del mismo).

La composición farmacéutica descrita en este documento puede comprender un tensioactivo o múltiples tensioactivos en diferentes relaciones. En algunos aspectos, un tensioactivo se incluye en una concentración de aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 1% en p/v (o aproximadamente

0,002% hasta aproximadamente 0,5%). En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende un tensioactivo en una concentración de al menos aproximadamente 0,001%, al menos aproximadamente 0,002%, al menos aproximadamente 0,003%, al menos aproximadamente 0,004%, al menos aproximadamente 0,005%, al menos aproximadamente 0,007%, al menos aproximadamente 0,01%, o al menos aproximadamente 0,05%, y no más de aproximadamente 0,1%, no más de aproximadamente 0,2%, no más de aproximadamente 0,3%, no más de aproximadamente 0,4%, no más de aproximadamente 0,5%, no más de aproximadamente 0,6%, no más de aproximadamente 0,7%, no más de aproximadamente 0,8%, no más de aproximadamente 0,9%, o no más de aproximadamente 1,0% en p/v. En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende un tensioactivo en una concentración de aproximadamente 0,001%, aproximadamente 0,002%, aproximadamente 0,003%, aproximadamente 0,004%, aproximadamente 0,005%, aproximadamente 0,006%, aproximadamente 0,007%, aproximadamente 0,008%, aproximadamente 0,009%, aproximadamente 0,01%, aproximadamente 0,05%, aproximadamente 0,1%, aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,4%, aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,6%, aproximadamente 0,7%, aproximadamente 0,8%, aproximadamente 0,9%, o aproximadamente 1% en p/v. En un aspecto ejemplar, la composición comprende un tensioactivo en una concentración de aproximadamente 0,004% hasta aproximadamente 0,1% en p/v. En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende polisorbato 20 o polisorbato 80, opcionalmente en una concentración de 0,004% hasta aproximadamente 0,1% en p/v. En algunos aspectos, el tensioactivo es polisorbato 20, y el polisorbato 20 está presente en una concentración de aproximadamente 0,06% en p/v. Alternativamente, el polisorbato 20 está presente en una concentración de aproximadamente 0,008% (p/v).

En varios aspectos, la composición también puede comprender un agente amortiguador. Amortiguadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, un amortiguador de Tris-HCl, un amortiguador de glutamato de sodio/ácido glutámico, un amortiguador de glicilglicina/glicilglicina-HCl, un amortiguador de histidina, o un amortiguador de citrato (o una combinación de los mismos). En varios aspectos, la composición comprende aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 200 mM de

amortiguador. Por ejemplo, la concentración de amortiguador de Tris-HCl en la composición farmacéutica es opcionalmente al menos aproximadamente 5 mM, al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 15 mM, al menos aproximadamente 20 mM, al menos aproximadamente 25 mM, o al menos aproximadamente 30 mM, y no mayor de aproximadamente 200 mM, no mayor de aproximadamente 180 mM, no mayor de aproximadamente 160 mM, no mayor de aproximadamente 140 mM, no mayor de aproximadamente 120 mM, no mayor de aproximadamente 100 mM, no mayor de aproximadamente 80 mM, no mayor de aproximadamente 60 mM, o no mayor de aproximadamente 50 mM. En varios aspectos, el amortiguador es un amortiguador de Tris-HCl, el cual es opcionalmente incluido en una concentración de aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 50 mM. En un aspecto representativo de la descripción, la composición comprende aproximadamente 20 mM de amortiguador de Tris-HCl. Para una composición farmacéutica la cual es una formulación en gel, en varias modalidades, la composición farmacéutica puede comprender un amortiguador de fosfato de sodio, un amortiguador de succinato de sodio/ácido succínico, o un amortiguador de acetato de sodio/ácido acético.

Opcionalmente, el pH de la composición farmacéutica es aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8,1. En varios aspectos, el pH de la composición farmacéutica es desde aproximadamente 6,9 hasta aproximadamente 8,1. En varios aspectos, el pH de la composición farmacéutica es desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 8, tal como desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,8, o aproximadamente 7,2 hasta aproximadamente 7,4, o aproximadamente 7,5 hasta aproximadamente 8. En algunos aspectos, el pH de la composición farmacéutica es aproximadamente 7,3 (por ejemplo, $7,3 \pm 0,3$). En algunos aspectos, el pH de la composición farmacéutica es aproximadamente 7,8 (por ejemplo, $7,8 \pm 0,3$).

La estabilidad de una composición de proteína se caracteriza examinando una o más propiedades de la composición farmacéutica, y se puede examinar en cualquier momento deseado después de la formulación, incluidos puntos de tiempo después de que la composición se almacene bajo cualquiera de una variedad de temperaturas o condiciones. Las composiciones estables en el contexto de la descripción en general exhiben, por ejemplo, separación de fases mínima o

reducida, formación mínima o reducida de gel con consistencia rígida, comportamiento viscoelástico Newtoniano, productos de degradación EFX mínimos o reducidos y/o modificaciones post-traduccionales mínimas o reducidas a EFX (por ejemplo, carga mínima o reducida y/o variantes de tamaño). Opcionalmente, la composición farmacéutica exhibe una o más de estas propiedades cuando se almacena como líquido en refrigeración (2-8 °C) (opcionalmente almacenamiento durante 21 meses) y como liófilo en condiciones ambientales más estresantes (25 °C).

La composición farmacéutica descrita en este documento minimiza las especies variantes cargadas no deseadas y las especies variantes de tamaño de EFX, lo que proporciona una ventaja técnica significativa para la fabricación, almacenamiento, distribución y auto-administración del producto por parte de los pacientes en casa. Las variantes de carga son formas de EFX con diferente distribución de carga (es decir, variantes más ácidas o básicas de EFX) que pueden formarse como resultado de modificaciones post-traduccionales. En varios aspectos, la composición incluye no más de aproximadamente el 40% de especies variantes cargadas cuando se almacenaba entre -30 °C y -20 °C durante un máximo de 24 meses. Las variantes de carga de EFX se pueden medir utilizando cualquiera de varias técnicas, tales como AEX-HPLC e icIEF. Usando AEX-HPLC, las variantes de carga EFX se caracterizan por el porcentaje de abundancia de picos previos en los cromatógrafos (variantes básicas o variantes de carga EFX con menos cargas negativas en su superficie), pico principal y picos posteriores (variantes ácidas o variantes de carga EFX con más cargas negativas en su superficie). AEX-HPLC se describe con más detalle en el Ejemplo 3. Alternativamente, las variantes de carga de EFX pueden resolverse usando icIEF en función del punto isoeléctrico (pI) de EFX o variantes de carga y medirse como el porcentaje de abundancia de pre-picos (variantes ácidas), pico-principal y post-picos (picos básicos) en electroferogramas icIEF. Los materiales y métodos que se refieren a icIEF se describen además en el Ejemplo 3. En varios aspectos, la composición es una composición líquida y no comprende más de aproximadamente 40%, no más de aproximadamente 35%, no más de aproximadamente 30%, no más de aproximadamente 25%, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 1%, no más de aproximadamente 0,1%, o no más de aproximadamente 0,01% de variantes cargadas, opcionalmente

cuando se almacenan entre -30 °C a -20 °C por hasta 24 meses (es decir, la composición líquida no comprende más de este nivel de variantes cargadas cuando se prueban entre el tiempo 0 y 24 meses bajo condiciones de almacenamiento que comprenden una temperatura entre -30 °C a -20 °C). En aspectos ejemplares, la composición líquida no comprende más de aproximadamente 40% de especies variantes cargadas ácidas cuando se almacenan entre -30 °C a -20 °C por hasta 24 meses.

En varios aspectos, la composición farmacéutica es una composición líquida o liofilizada y preferiblemente no comprende más de aproximadamente 40%, no más de aproximadamente 35%, no más de aproximadamente 30%, no más de aproximadamente 25%, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 1%, no más de aproximadamente 0,1%, o no más de aproximadamente 0,01% de variantes cargadas cuando se almacenan entre 2 °C a 8 °C por hasta 9 meses (es decir, la composición líquida o liofilizada no comprende más de este nivel de variantes cargadas cuando se prueban entre el tiempo 0 y 9 meses bajo condiciones de almacenamiento que comprende una temperatura entre 2 °C a 8 °C). En aspectos ejemplares, la composición líquida o liofilizada no comprende más de aproximadamente 40% de especies variantes cargadas ácidas cuando se almacena a aproximadamente 2-8 °C por hasta 9 meses.

En varios aspectos, la composición farmacéutica es una composición líquida o liofilizada y no comprende más de aproximadamente 40%, no más de aproximadamente 35%, no más de aproximadamente 30%, no más de aproximadamente 25%, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 1%, no más de aproximadamente 0,1%, o no más de aproximadamente 0,01% de variantes cargadas cuando se almacenan a aproximadamente 20-30 °C por hasta 4 semanas (es decir, la composición líquida o liofilizada no comprende más de este nivel de variantes cargadas cuando se prueban entre el tiempo 0 y 4 semanas bajo condiciones de almacenamiento que comprende una temperatura de aproximadamente 20-30 °C/60% de humedad relativa). En aspectos ejemplares, la composición líquida o liofilizada no comprende más de aproximadamente 40% de especies variantes cargadas ácidas cuando se almacena

a aproximadamente 25 °C por hasta 4 semanas.

En varios aspectos, la composición farmacéutica es una composición liofilizada y no comprende más de aproximadamente 40%, no más de aproximadamente 35%, no más de aproximadamente 30%, no más de aproximadamente 25%, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 1%, no más de aproximadamente 0,1%, o no más de aproximadamente 0,01% de variantes cargadas cuando se almacenan a aproximadamente 20-30 °C por hasta 14 meses (es decir, la composición liofilizada no comprende más de este nivel de variantes cargadas cuando se prueban entre el tiempo 0 y 14 meses bajo condiciones de almacenamiento que comprende una temperatura de aproximadamente 20-30 °C/60% de humedad relativa). En aspectos ejemplares, la composición liofilizada no comprende más de aproximadamente 40% de especies variantes cargadas ácidas cuando se almacena a aproximadamente 25 °C por hasta 14 meses.

Variantes de tamaño en el contexto de la descripción se refiere a la agregación o formación de Especies de Alto Peso Molecular (HMWS) y fragmentación o formación de Especies de Bajo Peso Molecular (LMWS) de EFX. Variantes de tamaño de EFX se pueden medir utilizando cualquiera de un número de técnicas, tal como por cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión de tamaño (SE-HPLC), electroforesis capilar con dodecilsulfato de sodio (CE-SDS, reducida y no reducida), o HPLC de fase inversa (RP-HPLC), ultracentrifugación analítica de velocidad de sedimentación (SV-AUC) y electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Utilizando SE-HPLC, las variantes de tamaño de EFX se caracterizan detectando el homodímero de EFX como especie principal, el pico cromatográfico predominante y niveles bajos de dímero (que comprende dos homodímeros de EFX) y variantes de tamaño de EFX de alto peso molecular (HMW) en un perfil de HPLC. Los materiales y métodos relacionados con SE-HPLC se describen con más detalle en el Ejemplo 3.

Utilizando CE-SDS en condiciones desnaturalizantes, las variantes de tamaño de EFX se caracterizan por la migración de picos en un electroferograma, como se detecta mediante absorbancia UV a 220 nm. Utilizando este análisis, el EFX

desnaturalizado y no reducido muestra proteínas intactas como pico principal, mientras que las especies de cadena sencilla y de bajo peso molecular migran antes del pico principal como picos previos y las variantes de tamaño de agregados/HMW aparecen después del pico principal como picos posteriores. Los materiales y métodos relacionados con CE-SDS se describen con más detalle en el Ejemplo 3.

Utilizando RP-HPLC, las variantes de tamaño de EFX se caracterizan mediante la detección de picos de proteína EFX eluidos con un detector de absorbancia UV a 280 nm. Con este análisis, las variantes de tamaño son visibles como picos previos o posteriores resueltos a partir del pico principal en el cromatograma. Los materiales y métodos relacionados con RP-HPLC se describen con más detalle en el Ejemplo 3.

En varios aspectos, la composición farmacéutica es una composición líquida o liofilizada y preferiblemente no comprende más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 9%, no más de aproximadamente 8%, no más de aproximadamente 7%, no más de aproximadamente 6%, no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 4%, no más de aproximadamente 3%, no más de aproximadamente 2%, no más de aproximadamente 1%, no más de aproximadamente 0,1%, o no más de aproximadamente 0,01% de EFX variantes de tamaño cuando se almacena a una temperatura de aproximadamente 20-30 °C, tal como aproximadamente 25 °C, por hasta 20 semanas (es decir, la composición líquida no comprende más de este nivel de especies variantes de tamaño cuando se prueban entre el tiempo 0 y 20 semanas bajo condiciones de almacenamiento a esta temperatura). En aspectos ejemplares, la composición líquida no comprende más de aproximadamente 10% de especies variantes de tamaño de EFX cuando se almacena a aproximadamente 25 °C por hasta 20 semanas. En aspectos ejemplares, la composición liofilizada comprende aproximadamente 0% de especies variantes de tamaño de EFX (es decir, no se detectaron especies de variantes de tamaño de EFX) cuando se almacena a aproximadamente 25 °C por hasta 20 semanas.

En varios aspectos, la composición farmacéutica es una composición líquida o liofilizada y preferiblemente no comprende más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 9%, no más de aproximadamente 8%, no más de aproximadamente 7%, no más de aproximadamente 6%, no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 4%, no más de aproximadamente 3%, no más de

aproximadamente 2%, no más de aproximadamente 1%, no más de aproximadamente 0,1%, o no más de aproximadamente 0,01% de EFX variantes de tamaño cuando se almacena a una temperatura entre aproximadamente 2-8 °C por hasta 14 meses (es decir, la composición líquida no comprende más de este nivel de especies variantes de tamaño cuando se prueban entre el tiempo 0 y 14 meses bajo condiciones de almacenamiento que comprende una temperatura de entre aproximadamente 2-8 °C). En aspectos ejemplares, la composición líquida no comprende más de aproximadamente 10% de especies variantes de tamaño de EFX cuando se almacena entre aproximadamente 2-8 °C por hasta 14 meses. En aspectos ejemplares, la composición liofilizada comprende aproximadamente 0% de especies variantes de tamaño de EFX (es decir, no se detectaron especies de variantes de tamaño de EFX) cuando se almacena entre aproximadamente 2-8 °C por hasta 14 meses.

En varios aspectos, la composición farmacéutica es una composición líquida o liofilizada y preferiblemente no comprende más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 15%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 4%, no más de aproximadamente 3%, no más de aproximadamente 2%, no más de aproximadamente 1%, no más de aproximadamente 0,1%, o no más de aproximadamente 0,01% de EFX variantes de tamaño cuando se almacena a una temperatura entre aproximadamente 20-30 °C (por ejemplo, aproximadamente 25 °C) por hasta 4 semanas (es decir, la composición líquida no comprende más de este nivel de especies variantes de tamaño cuando se prueban entre el tiempo 0 y 4 semanas bajo condiciones de almacenamiento que comprende una temperatura de aproximadamente 25 °C). En aspectos ejemplares, la composición líquida no comprende más de aproximadamente 20% de especies variantes de tamaño de EFX cuando se almacena a aproximadamente 25 °C por hasta 4 semanas. En aspectos ejemplares, la composición liofilizada comprende aproximadamente 0% de especies variantes de tamaño de EFX (es decir, no se detectaron especies de variantes de tamaño de EFX) cuando se almacena entre aproximadamente 25 °C por hasta 14 meses.

En varios aspectos de la descripción, la composición farmacéutica es una composición liofilizada. Cuando se liofiliza, el contenido de humedad residual del producto liofilizado es opcionalmente aproximadamente 1% o menos (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o menos). En varios aspectos, la formulación liofilizada es

reconstituida con un diluyente apropiado para formar una composición reconstituida de EFX liofilizada, la cual es contemplada por la descripción. En este sentido, la descripción también proporciona métodos para reconstituir las composiciones farmacéuticas descritas en este documento. El método comprende (a) reconstituir a composición farmacéutica liofilizada descrita en este documento dentro de aproximadamente cinco minutos y (b) administrar la composición reconstituida a un sujeto. Opcionalmente, el paso (b) comprende administrar subcutáneamente la composición reconstituida al sujeto. La descripción proporciona además una composición farmacéutica la cual es una composición reconstituida que resulta de la formulación liofilizada de la descripción mezclada con un diluyente.

La descripción proporciona además un proceso para preparar una composición liofilizada. El proceso comprende los siguientes pasos: (a) congelar la composición farmacéutica descrita en este documento; (b) hibridar la composición farmacéutica del paso (a) a una temperatura de aproximadamente -5 °C hasta aproximadamente -15 °C; (c) secado primario del producto del paso (b); y (d) secado secundario del producto del paso (c). De manera remarcable, el proceso descrito en este documento produce un producto de fármaco de EFX liofilizada con propiedades mejoradas. Por ejemplo, el producto resultante del proceso de liofilización puede ser reconstituido en una tiempo de manera remarcable corto (que varía de menos de 1 minuto hasta 10 minutos) comparado con el producto de otras condiciones de liofilización. En muchos casos, el tiempo de reconstitución es mejorado por aproximadamente 50% o más comparado con otras composiciones farmacéuticas y procesos de liofilización. Además, el proceso para preparar una composición liofilizada descrita en este documento reduce significativamente el área de superficie específica (tortas menos densas) de la torta resultante la cual está asociada con tiempos de reconstitución significativamente más cortos. Esto proporciona una ventaja significativa a especialistas y pacientes, ya que la reconstitución puede ser realizada prontamente antes de la administración, minimizar el tiempo para preparación de dosis en el punto de cuidado o previo a la auto-administración.

En varios aspectos, la congelación en el paso (a) del proceso de liofilización se conduce a una temperatura de entre aproximadamente -40 °C hasta aproximadamente -50 °C. En varios aspectos, la congelación en el paso (a) se conduce a una temperatura de aproximadamente -40 °C, aproximadamente -41 °C,

aproximadamente -42 °C, aproximadamente -43 °C, aproximadamente -44 °C, aproximadamente -45 °C, aproximadamente -46 °C, aproximadamente -47 °C, aproximadamente -48 °C, aproximadamente -49 °C, o aproximadamente -50 °C.

En varios aspectos, la hibridación en el paso (b) se conduce por aproximadamente 5 horas hasta aproximadamente 20 horas. En varios aspectos, la hibridación en el paso (b) se conduce por aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, o aproximadamente 10 horas.

En varios aspectos, la hibridación en el paso (b) se conduce a una temperatura de entre aproximadamente -5 °C hasta aproximadamente -20 °C. En varios aspectos, la hibridación en el paso (b) se conduce a una temperatura de aproximadamente -5 °C, aproximadamente -6 °C, aproximadamente -7 °C, aproximadamente -8 °C, aproximadamente -9 °C, aproximadamente -10 °C, aproximadamente -11 °C, aproximadamente -12 °C, aproximadamente -13 °C, aproximadamente -14 °C, aproximadamente -15 °C, aproximadamente -16 °C, aproximadamente -17 °C, aproximadamente -18 °C, aproximadamente -19 °C, o aproximadamente -20 °C.

En varios aspectos, el secado primario en el paso (c) se conduce a aproximadamente 0,08 a 0,2 mbar de presión de la cámara. En varios aspectos, el secado primario en el paso (c) se conduce a aproximadamente 0,08, aproximadamente 0,09, aproximadamente 0,10, aproximadamente 0,11, aproximadamente 0,12, aproximadamente 0,13, aproximadamente 0,14, aproximadamente 0,15, aproximadamente 0,16, aproximadamente 0,17, aproximadamente 0,18, aproximadamente 0,19, o aproximadamente 0,20 mbar de presión de la cámara.

En varios aspectos, el secado primario en el paso (c) se conduce a una temperatura desde aproximadamente -5 °C a -30 °C. En varios aspectos, el secado primario en el paso (c) se conduce a una temperatura de aproximadamente -10 °C, aproximadamente -11 °C, aproximadamente -12 °C, aproximadamente -13 °C, aproximadamente -14 °C, aproximadamente -15 °C, aproximadamente -16 °C, aproximadamente -17 °C, aproximadamente -18 °C, aproximadamente -19 °C, aproximadamente -20 °C, aproximadamente -21 °C, aproximadamente -22 °C, aproximadamente -23 °C, aproximadamente -24 °C, aproximadamente -25 °C,

aproximadamente -26 °C, aproximadamente -27 °C, aproximadamente -28 °C, aproximadamente -29 °C, o aproximadamente -30 °C.

En varios aspectos, el secado secundario en el paso (d) se conduce a una temperatura desde aproximadamente 35 a 55 °C. En varios aspectos, el secado secundario en el paso (d) se conduce a una temperatura de aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, o aproximadamente 55°C.

La composición farmacéutica de EFX descrita en este documento se puede usar para tratar, aliviar, prevenir o invertir un número de enfermedades, trastornos, o condiciones, que incluye, pero no se limita a trastornos metabólicos. En varios aspectos, la descripción proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno, en donde el método comprende administrar la composición farmacéutica que comprende EFX a un sujeto (por ejemplo, un humano) en necesidad de la misma. La enfermedad o trastorno puede ser cualquiera de los siguientes: esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFL), esteatosis hepática, esteatohepatitis alcohólica (ASH), enfermedad de hígado alcohólica (ALD) o enfermedad de hígado graso alcohólica (AFL), diabetes (por ejemplo, diabetes tipo 2), obesidad, antojos o adicciones (relacionados al alcohol u otros, tales como alimentos), hipertrigliceridemia, dislipidemia, enfermedad cardiovascular (tal como aterosclerosis), o envejecimiento. En varios aspectos, la descripción proporciona un método para revertir la cirrosis hepática o reducir la fibrosis asociada con NASH, ASH, ALD, AFL, o enfermedad de mal plegado de la proteína. En este sentido, siguiendo el tratamiento, la puntuación de fibrosis del sujeto, basado en el sistema de puntuación de histológica de Red de Búsqueda Clínica de NASH (CRN), (Kleiner D et al, 2005 Hepatology 41, 1313), preferiblemente regresa de F4 (cirrosis) a F3 (fibrosis avanzada) o menos. En modalidades ejemplares, la adicción abarca la dependencia persistente y compulsiva de un comportamiento o sustancia tal como alcohol, fármacos, o nicotina. En modalidades ejemplares, los antojos abarcan un deseo fuerte, urgente, o anormal para una cierta sustancia o actividad, tal como azúcar. La descripción también proporciona un método para normalizar el contenido de hígado graso, reducir los niveles de glucosa en sangre, aumentar la sensibilidad de la insulina, y/o reducir los niveles de ácido úrico, administrando la composición EFX farmacéutica descrita en este documento a un sujeto en necesidad de la misma. En modalidades ejemplares,

normalizar el contenido de grasa en el hígado se refiere a reducir el contenido de grasa en el hígado (por ejemplo, el contenido de grasa en hígado absoluto), preferiblemente reducir el contenido de grasa en el hígado con aquella de un sujeto no enfermo, sano, típico (es decir, un sujeto que no sufre de una o más de las enfermedades/trastornos descritos en este documento). En varias modalidades, el contenido de grasa de hígado se reduce a <5% de grasa de hígado absoluta. Un contenido de grasa en hígado absoluto de $\geq 5\%$ está asociado con esteatosis hepática (enfermedad de hígado graso), con <5% el contenido de grasa en hígado absoluto siendo considerado dentro de un rango clínicamente normal para sujetos no enfermos (véase, por ejemplo, Chalasani et al., 2018 *Hepatology*; 67(1):328-357).

En un ensayo clínico de fase 2 como un tratamiento para la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), Efruxifermina ha demostrado niveles de eficacia sin precedentes, incluida la normalización de la grasa hepática y la regresión de la fibrosis en aproximadamente la mitad de los pacientes después de sólo 16 semanas de dosificación. La singularidad del perfil clínico de EFX se subraya al restaurar también un perfil de lipoproteínas saludable, mejorar el control glucémico (reducción de la hemoglobina A1c en un 0,6-0,9% entre los pacientes con diabetes tipo 2 NASH) y reducir los niveles de ácido úrico (Harrison et al., 2021, *Nat Medicina* 27:1262-1271).

Un “sujeto en necesidad del mismo” es un sujeto, tal como un humano, que podría beneficiarse de la administración de la composición farmacéutica, y se puede diagnosticar con, o que sufre de síntomas de cualquiera de los trastornos descritos en este documento. Por ejemplo, el sujeto en necesidad de reducir los niveles de ácido úrico puede ser un sujeto que sufre de gota. El sujeto en necesidad de un método para revertir la cirrosis hepática o reducir la fibrosis asociada con NASH, ASH, ALD, ALF, o enfermedad de mal plegado de la proteína puede estar sufriendo de NASH, ASH, ALD, ALF, o enfermedad de mal plegado de la proteína, o recuperación de NASH, ASH, ALD, ALF, o enfermedad de mal plegado de la proteína.

En varios aspectos, el trastorno es una enfermedad de mal plegado de la proteína. Las proteínas malplegadas pueden activar una variedad de respuestas patogénicas, y se cree son responsables de, o al menos asociada con, un número de enfermedades humanas. Enfermedades ejemplares de mal plegado de las proteínas incluyen, pero no se limitan a, fibrosis quística, deficiencia de antitripsina alfa-1, y

cardiomiopatía amiloide transtiretina. El método comprende administrar a un sujeto en necesidad de la misma una composición farmacéutica de la descripción en una cantidad efectiva para lograr una respuesta biológica deseada. En aspectos relacionados, el método comprende administrar la composición EFX farmacéutica como parte de un régimen terapéutico el cual también incluye la administración de una molécula correctora de proteína malplegada o un terapéutico basado en el oligonucleótido para una enfermedad de mal plegado de la proteína (tal como deficiencia de antitripsina alfa-1).

El término “trata”, así como las palabras relacionadas con el mismo, no implican necesariamente un tratamiento o remisión completo o del 100%. Más bien, existen varios grados de tratamiento que un experto en la técnica reconoce que tiene un beneficio o efecto terapéutico potencial. A este respecto, los métodos para tratar una enfermedad o trastorno pueden proporcionar cualquier cantidad o nivel de tratamiento. Además, el tratamiento proporcionado por el método puede incluir el tratamiento de una o más afecciones o síntomas o signos de la enfermedad que se está tratando y/o mejorar la calidad de vida del sujeto con la afección o enfermedad. El método de tratamiento de la presente descripción puede inhibir uno o más síntomas de la enfermedad. Además, el tratamiento proporcionado por los métodos de la presente descripción puede abarcar ralentizar o revertir la progresión de la enfermedad.

El mejoramiento de la calidad de vida de un sujeto se puede medir determinando uno o más parámetros de calidad de vida utilizando, por ejemplo, la Herramienta Europea de 5 Preguntas Sobre Calidad de Vida (EQ-5D) para determinar la movilidad, el estado de ánimo y el impacto holístico en la calidad de vida de los pacientes, de conformidad con lo reportado por los pacientes. El cuestionario EQ-5D también incluye una Escala Visual Analógica (EVA), mediante la cual los encuestados pueden reportar su estado de salud percibido. Véase, por ejemplo, Balestroni et al., *Monaldi Arch Chest Dis.* 2012 Sep; 78(3):155-9, que se incorpora como referencia en su totalidad. El tratamiento también se puede controlar mediante un Cuestionario de enfermedad hepática. Véase, por ejemplo, Younossi et al., *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019 Sep; 17(10):2093-2100.e3, que se incorpora como referencia en su totalidad. El tratamiento hepático también puede controlarse midiendo parámetros objetivos tales como datos histológicos (por ejemplo, regresión de la fibrosis, resolución de NASH y similares) y biomarcadores de lesión hepática (por ejemplo, alanina aminotransferasa

(ALT), aspartato transaminasa (AST), gamma-glutamyl transferasa (GGT) y/o fosfatasa alcalina (ALP)). Se describen métodos ejemplares de puntuación histopatológica del hígado en pacientes con NASH, por ejemplo, en Kleiner et al, 2005 Hepatology 41, 1313, que se incorpora como referencia en su totalidad.

Con respecto a los métodos anteriores, la composición puede ser administrada por cualquier ruta adecuada de administración, que incluye rutas de administración intravenosa, intraperitoneal, intra-cerebral (intra-parenquimal), intramuscular, intra-ocular, intraarterial, intraportal, intramedularmente, intratecal, intraventricular, intradermal, transdermal, subcutánea, intranasal, inhalación (por ejemplo, vías respiratorias superior y/o inferior), entérica, epidural, uretral, vaginal, o rectal. En varios casos, la composición es administrada al sujeto intravenosamente, intramuscularmente, o subcutáneamente. Por ejemplo, en algunos aspectos, la composición es administrada subcutáneamente. La cantidad o dosis de EFX en la composición (es decir, la “cantidad efectiva”) administrada debe ser suficiente para lograr un efecto biológico deseado en el sujeto durante un marco de tiempo clínicamente razonable.

En jurisdicciones que prohíben patentar métodos que se practican en el cuerpo humano, el significado de “administrar” una composición a un sujeto humano puede restringirse a prescribir una sustancia controlada que un sujeto humano puede auto-administrarse mediante cualquier técnica (por ejemplo, inyección, inserción, etc.). La descripción contempla el uso de la composición farmacéutica para tratar cualquiera de las enfermedades o trastornos descritos en este documento. La descripción contempla además el uso de la composición en la preparación de un medicamento para tratar cualquiera de las enfermedades o trastornos descritos en este documento. La descripción proporciona además la composición descrita en este documento para uso en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades o trastornos referenciados en este documento. En jurisdicciones que no prohíben patentar métodos que se practican en el cuerpo humano, la “administración” de composiciones incluye tanto los métodos practicados en el cuerpo humano como también las actividades anteriores.

Como un aspecto adicional, se proporcionan kits que comprenden una composición farmacéutica descrita en el presente documento empaquetada de una manera que facilita la administración a los sujetos. En un aspecto, el kit incluye una composición/formulación farmacéutica descrita en el presente documento envasada en

un recipiente tal como una botella sellada, recipiente, vial de un solo uso o de uso múltiple, dispositivo precargado (por ejemplo, jeringa) o dispositivo de inyección precargado, opcionalmente con un etiqueta adherida al recipiente o incluida en el paquete que describe el uso de la composición farmacéutica en la práctica del método. En un aspecto, la composición farmacéutica es envasada en una forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir un dispositivo adecuado para administrar la composición farmacéutica de conformidad con una ruta específica de administración, aunque esto no se requiere. Por ejemplo, la descripción proporciona un dispositivo de cámara dual para suministrar la composición farmacéutica descrita en este documento a un sujeto en necesidad de la misma. Los dispositivos de cámara dual son productos de combinación que contienen una composición farmacéutica liofilizada descrita en este documento y un diluyente en dos cámaras separadas del dispositivo. Los dispositivos de cámara dual prellenada (DCDs) son productos de combinación que contienen fármaco liofilización y diluyente en dos cámaras separadas del dispositivo. Los DCDs brindan alta estabilidad y conveniencia a pacientes y médicos, mejorando así significativamente la calidad del producto, el cumplimiento del paciente y la competitividad del mercado. Los DCD también proporcionan integridad del sello, esterilidad y compatibilidad con productos biofarmacéuticos y evitan la lixiviación y las lesiones por pinchazos. Dispositivos de doble cámara adecuados para su uso con la presente descripción se describen en la técnica. Véase por ejemplo, Ingle R., Fang W. (2021). *Int. Journal of Pharmaceutics* 597, 12031.

Los Ejemplos siguientes ilustran características representativas de la descripción. A partir de la descripción de estos aspectos, se pueden elaborar y/o practicar otros aspectos de la invención basándose en la descripción proporcionada a continuación. Los métodos implican el uso de técnicas de biología molecular descritas en tratados tales como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; y *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., ed., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Formulaciones de Efruxifermina

Este ejemplo describe las formulaciones de EFX evaluadas en los estudios que se describen a continuación.

Los productos biológicos inyectables a base de proteínas se formularon con frecuencia a un pH ligeramente ácido a neutro en el rango de pH 5,2 hasta aproximadamente pH 6,9, para minimizar las modificaciones post-traduccionales, así como la desamidación u oxidación, que convierte los residuos de asparagina en una proteína en ácido aspártico o ácido isoaspártico como el intermediario de succinimida, y glutamina al ácido glutámico o ácido piroglutámico. Por arriba de pH 7,6, se observa con frecuencia desamidación (formación de variantes de carga ácida), lo que resulta en una pérdida de estabilidad, funcionalidad y/o potencia de la proteína. Por debajo de pH 7,0, también se observa la formación de variantes cargadas básicas.

Con el objetivo de minimizar la desamidación, la oxidación y la formación de variantes de carga, se desarrollaron formulaciones de EFX con una variedad de excipientes en el rango de pH de 4,5 a 7,0. De manera sorprendente, las propiedades viscoelásticas de EFX cambiaron drásticamente a un pH inferior a 6,5, manifestando un comportamiento similar a un gel, separación de fases y pérdida de fluidez. Estas características suponen un desafío para una formulación inyectable de un producto biológico. La alta viscosidad dinámica de estos geles (en algunos casos hasta 23,950 cP (centipoise)), así como la estabilidad prolongada de los geles (en algunos casos hasta 21 meses almacenados a 2-8 °C), indican la formación de una estructura tridimensional ordenada y estable, posiblemente como resultado de enlaces de hidrógeno entrecruzados, dispuestos en una red que forma patrones.

Además, la mayoría de las formulaciones probadas a pH 6,9 o menos demostraron una propensión a la agregación de proteínas, recorte/fragmentación y/o formación de partículas visibles y subvisibles. Tales cambios no son deseables para los productos biológicos inyectables, ya que pueden estar asociados con problemas de seguridad (particularmente inmunogenicidad), inestabilidad y pérdida de potencia.

De este modo, se diseñaron una serie de estudios para desarrollar una formulación de EFX, centrándose en minimizar las trayectorias de degradación y las modificaciones post-traduccionales (como una mayor formación de variantes de carga), al mismo tiempo que se supera la propensión única de EFX a formar retículas entrecruzadas de enlaces de hidrógeno, dando como resultado la formación de gel y una separación de fases significativas.

Las formulaciones de EFX que se evaluaron en el Ejemplo 1 y los ejemplos subsecuentes, se listan en la Tabla 1, y los excipientes y productos químicos

utilizados se listan en la Tabla 2.

Tabla 1: Formulaciones de EFX evaluadas*.

Formulación	Composición de formulación	Rango de concentración de EFX mg/mL
F1	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 4,5	Hasta 100±10
F2	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 160 mM de Lys-HCl, PS20, pH 5,0	Hasta 100±10
F3	20 mM de glutamato de Na/ácido glutámico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,0	Hasta 100±10
F4	20 mM de glutamato de Na/ácido glutámico, 200 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 5,0	Hasta 100±10
F5	20 mM de acetato de Na/ácido acético, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,2	Hasta 100±10
F6	20 mM de acetato de Na/ácido acético, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 5,2	Hasta 100±10
F7	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,2	Hasta 100±10
F8	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 120 mM de NaCl, PS20, pH 5,2	Hasta 100±10
F9	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 5,5	Hasta 100±10
F10	20 mM de glicilglicina/glicilglicina-HCl, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,5	Hasta 100±10
F11	20 mM de Histidina/His-HCl, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 6,0	Hasta 100±10
F12	20 mM de His/His-HCl, 180 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 6,5	Hasta 100±10
F13	20 mM de His/His-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 7,0	Hasta 100±10
F14	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de sacarosa, 40	Hasta 100±10

	mM de Met, PS20, pH 7,5	
F15	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,5	Hasta 100±10
F16	20 mM de fosfato de Na, 180 mM de sacarosa, 40 mM de Glu, 40 mM de Arg, PS20, pH 7,5	Hasta 100±10
F17	180 mM de sacarosa, 40 mM de Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,8	28 a 100±10
F18	20 mM de Tris/Tris-HCl, 160 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,8	28 a 150±15
F19	20 mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 8,3	Hasta 100±10
F20	20 mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 9,0	Hasta 100±10
F21	20 mM de Histidina, 220 sacarosa, 20 mM de Arg/Arg-HCl, PS20, pH 6,5	Hasta 100±10
F22	20 mM de Tris, 220 sacarosa, 20 mM de Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,5	Hasta 100±10
F23	20 mM de Histidina, 220 sacarosa, 20 mM de Arg/Glutamato, PS20, pH 6,5	Hasta 100±10
F24	20 mM de Tris, 220 sacarosa, 20 mM de Arg/Glutamato, PS20, pH 7,5	Hasta 100±10
F25	20 mM de Histidina, 100 sacarosa, 140 mM de Arg/Arg-HCl, PS20, pH 6,5	Hasta 100±10
F26	20 mM de Tris, 100 sacarosa, 140 mM de Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,5	Hasta 100±10
F27	20 mM de Histidina, 100 sacarosa, 140 mM de Arg/Glutamato, PS20, pH 6,5	Hasta 100±10
F28	20 mM de Tris, 100 sacarosa, 140 mM de Arg/Glutamato, PS20, pH 7,5	Hasta 100±10
F29	20 mM de Histidina, 160 sacarosa, 80 mM de Arg/Glutamato, PS20, pH 7,0	Hasta 100±10
F30	20 mM de Tris, 160 sacarosa, 80 mM de	50 to 100±10

	Arg/Glutamato, PS20, pH 7,5	
F31	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa, 0,02% en p/v de PS20, pH 7,3	Hasta 100±10
F32	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa, 0,02% en p/v de PS80, pH 7,3	Hasta 100±10
F33	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa, 0,06% en p/v de PS20, pH 7,3	Hasta 150±15
F34	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa, 0,06% en p/v de PS80, pH 7,3	Hasta 100±10
F35	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa, 0,1% en p/v de PS20, pH 7,3	Hasta 100±10
F36	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa, 0,1% en p/v de PS80, pH 7,3	Hasta 100±10
F37	120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa 0,06% en p/v de PS20, pH 7,3	Hasta 100±10
F38	120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa, 0,06% en p/v de PS80, pH 7,3	Hasta 100±10
F39	120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa, 0,06% en p/v de PS80, pH 6,9	Hasta 100±10
F40	120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa, 0,06% en p/v de PS80, pH 7,7	Hasta 100±10
F41	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa, pH 7,3	Hasta 100±10
F42	40 mM de Arg/Arg-HCl, 180 mM de sacarosa, 0,04% en p/v de PS20, pH 7,3	Hasta 100±10

*Designación de formulación (excipientes F1-F20/estudio de detección de pH; estudio de estabilidad de conformación de F21-F30 de Arg/Glu/pH así como también minimizando la agregación y formación de variantes de carga; estudio de tensioactivos F31-F42). La concentración de polisorbato 20 fue 0,04% en p/v a menos que se declare en la tabla. Todos los aminoácidos listados están en estado natural (es decir, isómeros-L).

Tabla 2: Generalidades de los excipientes y productos químicos utilizados en el desarrollo de la formulación de EFX.

Material
L-Histidina, excipiente Ph. Eur., USP, JP
Ácido succínico
Base Tris, ≥99,9%, EP, USP
Tris-HCl, Emprove Expert
D(+) sacarosa, USP-NF, BP, Ph. Eur., JP
Dihidrato de α,α – Trehalosa, Alta Pureza (Endotoxina Baja), USP/NF, EP, JP, ChP, 25 kg
Polisorbato 20
Base de L-arginina, Ph. Eur., USP
Ácido L-glutámico, Ph. Eur., USP
Ácido clorhídrico 1 N
Ácido clorhídrico 2 N
Dihidrato de dihidrogenofosfato de sodio, Ph. Eur., USP
Dodecahidrato de hidrogenofosfato Di-sódico, Ph. Eur., USP
Cloruro de sodio; Ph. Eur., USP
Solución de hidróxido de sodio 2 N
Solución de hidróxido de sodio 1 N
Monoclorhidrato de L(+)-lisina
L-metionina, Ph. Eur., USP
Ácido acético, glacial, Ph. Eur., USP
Glicilglicina
Dihidrogenofosfato de potasio, USP
Fosfato de Potasio Anhidro, USP
Citrato de Sodio, USP, EP, JP
Carboximetilcelulosa de Na
PEG-4000

Ejemplo 2: Formulaciones Caracterizantes: Formación de Gel y Separación de Fase (Separación de Fase Schlieren)

Este ejemplo describe las propiedades físicas de varias formulaciones descritas en el presente documento. De manera sorprendente, la EFX tiene propensión a formar geles y a separar fases cuando se formula y almacena en condiciones que son adecuadas para la mayoría de los otros productos biológicos.

Apariencia Visual

Las formulaciones de EFX se inspeccionaron para determinar la formación de gel, la separación de fases, la opalescencia y la presencia o ausencia de partículas visibles bajo agitación radial, manual y suave durante 5 segundos frente a un fondo blanco y durante 5 segundos frente a un fondo negro de conformidad con la Farmacopea Europea. (9ª edición; monografía 2.9.20) a 2,000 - 3,750 lux. Para clasificar las partículas visibles observadas, se aplicó una puntuación numérica basada en el “Deutscher Arzneimittel-Codex” (DAC 2006), como se lista en la Tabla 3. Las estructuras similares a fibras, las partículas que probablemente no sean inherentes y los atributos adicionales de la muestra se documentaron como se describe en la Tabla 4.

Tabla 3: Puntuación numérica para partículas visibles, excluyendo fibras y partículas que no son inherentes.

Puntuación para partículas visibles	Descripción
0	No hay partículas visibles en 5 segundos
1	Pocas partículas visibles en 5 segundos
2	Número medio de partículas visibles en 5 segundos
10	Gran cantidad de partículas directamente visibles.

Tabla 4: Código de letras para apariencia visual y observaciones adicionales.

Letra	Descripción
A	Burbujas de aire
C	Color
F	Fibra (simple)
FF	Múltiples fibras (más de una)
H	Huracán, tornado, por ejemplo, debido a sedimentación o

	partículas flotantes
L	Partículas que están al límite de ser visibles como partículas distintas.
S	Schlieren*, separación de fases
T	Turbidez, opalescencia, nubosidad, neblina.
V	Viscosidad
X	Partículas no inherentes: metal, purpurina, piezas de goma, deslaminación del vidrio.

* Schlieren son heterogeneidades ópticas que se pueden observar en medios con un índice de refracción no homogéneo, por ejemplo, medios líquidos que incluyen diferentes líquidos o fases líquidas que exhiben diferencias en densidad. El Schlieren puede deberse, por ejemplo, a una mezcla insuficiente o a una separación de fases.

Concentración de Proteína (Separación de fase, separación de fase Schlieren)

La concentración de EFX se determinó mediante espectroscopia UV/visible utilizando espectroscopia de pendiente con un instrumento SoloVPE que mide la absorbancia a 280 nm.

Viscosidad (Formación de Gel)

La viscosidad dinámica se midió utilizando un reómetro Kinexus ultra plus (Malvern Instruments). El reómetro está equipado con una configuración de placa cónica (diámetro del cono 40 mm, ángulo de 1°). Las dimensiones del cono de medición CP1/40 fijaron el espacio de medición en 0,024 mm, lo que requirió un volumen de muestra de ~310 µl. Para evitar el secado de la superficie de la muestra, se aplicó un bloqueador de evaporación. Las mediciones se realizaron a una velocidad de corte constante de 400 s⁻¹ a 25 °C durante un período de 3 minutos. Además, se generaron 11 tablas de puntos de datos con velocidades de corte crecientes de 10 s⁻¹ a 1000 s⁻¹ a 25 °C.

Espectrometría de Masas de Intercambio hidrógeno-Deuterio (H-D) de guanidinio/urea

La formación de gel y la separación de fases de EFX en las formulaciones F1, F2, F4, F7, F8, F9 y F11 es el resultado de enlaces de hidrógeno entrecruzados, que adoptan una redícula formadora de patrones. Los estudios con

intercambio de HD aclaran el mecanismo de formación de la red y la separación de fases de Schlieren.

Sumario de Datos: Formación de Gel y Separación de Fases (Separación de Fase Schlieren)

El punto isoeléctrico (pI) de EFX, teórico y medido por icIEF, es aproximadamente pH 6,6. Las formulaciones F1–F12 se formularon a un pH por debajo del pI, mientras que los valores de pH de las formulaciones F13–F20 están por arriba del pI (véase Tabla 1). La EFX en formulaciones compuestas por debajo de pH 6,5 (formulaciones de pH bajo a neutro) mostró una propensión a sufrir gelificación o separación de fases. En la Figura 2 se muestran imágenes de formulaciones de EFX formadas en gel. La formulación F11 formó un gel denso estructurado en 3D poco después de la composición. Después del almacenamiento a 40 °C/75% de HR durante tres días, las formulaciones F1, F2, F4, F7, F8 y F9 también demostraron formación de gel, separación de fases y/o precipitación. Se formó un gel translúcido en las formulaciones F1, F2, F4 y F7, que manifiesta una alta turbidez dentro del gel (Figura 7).

Las formulaciones F8, F9 y F12 aparecieron separadas en fases (separación de fases Schlieren) con una fase similar a un gel blanco en el fondo y un sobrenadante líquido turbio en la parte superior, observado después de 3 días a 40 °C/75% de HR. Como ejemplo, la concentración de proteína medida en la fase inferior de F12, evaluada por SoloVPE, fue de 163,1 mg/mL y en la fase de sobrenadante superior de 59,9 mg/mL. Además, después de dos semanas de almacenamiento a 40 °C/75% de humedad relativa, las formulaciones F5 y F6 mostraron cambios dramáticos similares en su apariencia visual y propiedades viscoelásticas.

A 25 °C/60% de humedad relativa, las formulaciones F2 y F8 formaron geles densos respectivamente después de 1 semana y 1 mes de almacenamiento. Además, se observó separación de fases y formación de partículas visibles para F14 después de un mes de almacenamiento a 25 °C/60% de RH, pero no para otras condiciones de temperatura (2-8 °C y 40 °C/75 % de RH).

Las viscosidades dinámicas de EFX a 100 mg/mL en las formulaciones F1 a F20 (excepto F11) a 400 s⁻¹ y tiempo cero se presentan en la Figura 3. Las viscosidades dinámicas medidas parecen depender del pH y aumentan a un pH más bajo. Por ejemplo, las viscosidades de las formulaciones de EFX F14 a F20 a 100

mg/mL y temperatura ambiente, todas a pH 7,0 y superior, fueron ≤ 5 cP. En comparación, las viscosidades dinámicas medidas estuvieron en el rango de 10 a 16 cP inmediatamente después de la combinación de las formulaciones F1 a F10 a pH 6,5 e inferior (Figura 3). En la formulación 11 (F11), la EFX formó instantáneamente una red de gel densa/rígida al formarse en compuestos, lo que hizo imposible una evaluación experimental adicional de la viscosidad dinámica.

Durante el almacenamiento de EFX bajo varias condiciones, otras formulaciones con un pH de 6,5 o menos se sometieron a separación de fases y formaron geles altamente viscosos (F1, F2, F4, F7, F8, F9, F10 y F11). La formación del gel parece ser el resultado de enlaces de hidrógeno entrecruzados, que daban forma a una red que formaba patrones, dando como resultado una estructura tridimensional muy rígida. La velocidad de formación del gel EFX depende de la temperatura de almacenamiento y ocurre en aproximadamente 3 días a 40 °C, pero después de semanas o meses a 25 °C y 2-8 °C respectivamente. Una vez formadas, las redes de gel tridimensionales parecen estables o irreversibles, como lo demuestran las formulaciones F1, F2, F4, F7, F8, F9 y F11 que conservan su apariencia de gel después de 21 meses en varias condiciones de almacenamiento.

La Figura 4 muestra las viscosidades dinámicas de EFX a 100 mg/mL para F1 a F20 (excepto F11) a una velocidad de corte de 10 s^{-1} después de 3 días a 40 °C. Aquellas formulaciones que formaron geles parecen tener una viscosidad dinámica de decenas de miles de cP. Las viscosidades dinámicas de EFX permanecen sin cambios después del almacenamiento durante 21 meses a 2-8 °C (Figura 4 y Tabla 5). Por ejemplo, las viscosidades dinámicas medidas de F2 y F10 a baja velocidad de corte fueron tan altas como 23,950 cP y 10,560 cP, comparables al caucho de silicona vertible y al jarabe de chocolate, respectivamente.

Las formulaciones F1, F2, F4, F7, F8, F9 y F11 formaron geles irreversibles y se sometieron a separación de fases, demostrando propiedades viscoelásticas claramente diferentes en función de las velocidades de corte, en comparación con formulaciones líquidas homogéneas como F13 a F42. Como se ilustra en la Figura 5, las viscosidades dinámicas de EFX en las formulaciones F13 a F20, así como F21 a F42 (no se muestran), en función de las velocidades de corte crecientes, permanecieron constantes, demostrando así el comportamiento Newtoniano. Por el contrario, la viscosidad de F1, F2, F4, F7, F8, F9 y F11 pareció

disminuir en función del aumento de la velocidad de corte, manifestando así un efecto de adelgazamiento por corte no Newtoniano. A pesar de esto, permanecieron en forma de gel, lo que indica que las retículas unidas por enlaces de hidrógeno son suficientemente estables para soportar altas velocidades de corte (como 1000 s^{-1}). Además de la dependencia del pH, la formación de gel y la separación de fases también parecían depender de los excipientes que comprenden cada formulación. Para ilustrar este punto, diferentes composiciones de excipientes pero pH similar para F1, F2, F4, F7, F8, F9 y F11 se asociaron con una amplia gama de viscosidades dinámicas. Estas diferencias se observaron tanto a velocidades de corte bajas como altas, lo que demuestra que las propiedades viscoelásticas exhiben una fuerte dependencia de la naturaleza de los excipientes específicos. Las viscosidades dinámicas a una velocidad de corte baja se resumen en la Tabla 5A y a una velocidad de corte de 1000 s^{-1} en la Tabla 5B.

Tabla 5A: Viscosidad dinámica de 100 mg/mL de EFX en las formulaciones F1-F20 (excepto F11) a velocidad de corte 10 s^{-1} después de 3 días a 40°C seguido por almacenamiento por 21 meses a $2-8^\circ\text{C}$.

Formulación	Composición de formulación	Viscosidad [cP]
F1	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 4,5	12 770
F2	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 160 mM de Lys-HCl, PS20, pH 5,0	23 950
F3	20 mM de glutamato de Na/ácido glutámico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,0	21
F4	20 mM de glutamato de Na/ácido glutámico, 200 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 5,0	9 920
F5	20 mM de acetato de Na/ácido acético, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,2	41
F6	20 mM de acetato de Na/ácido acético, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 5,2	22
F7	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,2	9 279

F8	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 120 mM de NaCl, PS20, pH 5,2	10 560
F9	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 5,5	3 878
F10	20 mM de glicilglicina/glicilglicina-HCl, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,5	22
F11	20 mM de Histidina, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 6,0	UM*
F12	20 mM de His/His-HCl, 180 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 6,5	10,0
F13	20 mM de His/His-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 7,0	9,5
F14	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de sacarosa, 40 mM de Met, PS20, pH 7,5	5,1
F15	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,5	4,9
F16	20 mM de fosfato de Na, 180 mM de sacarosa, 40 mM de Glu, 40 mM de Arg, PS20, pH 7,5	5,1
F17	180 mM de sacarosa, 40 mM de Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,8	4,9
F18	20 mM de Tris/Tris-HCl, 160 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,8	4,4
F19	20 mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 8,3	6,0
F20	20 mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 9,0	3,9
F33	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa 0,06% en p/v de PS20, pH 7,3	3,7

Tabla 5B: Viscosidad dinámica de 100 mg/mL de EFX en formulaciones de F1-F20 (excepto F11) a velocidad de corte 1000 s⁻¹ después de 21 meses a 2-8 °C.

Formulación	Composición de formulación	Viscosidad [cP]
F1	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 4,5	206
F2	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 160 mM de Lys-HCl, PS20, pH 5,0	134
F3	20 mM de glutamato de Na/ácido glutámico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,0	16
F4	20 mM de glutamato de Na/ácido glutámico, 200 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 5,0	271
F5	20 mM de acetato de Na/ácido acético, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,2	21
F6	20 mM de acetato de Na/ácido acético, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 5,2	16
F7	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,2	344
F8	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 120 mM de NaCl, PS20, pH 5,2	50
F9	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 5,5	76
F10	20 mM de glicilglicina/glicilglicina-HCl, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,5	15
F11	20 mM de Histidina, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 6,0	UM*
F12	20 mM de His/His-HCl, 180 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 6,5	10,0
F13	20 mM de His/His-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 7,0	10,0
F14	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de sacarosa, 40	5,0

	mM de Met, PS20, pH 7,5	
F15	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,5	5,0
F16	20 mM de fosfato de Na, 180 mM de sacarosa, 40 mM de Glu, 40 mM de Arg, PS20, pH 7,5	5,0
F17	180 mM de sacarosa, 40 mM de Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,8	5,0
F18	20 mM de Tris/Tris-HCl, 160 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,8	5,0
F19	20 mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 8,3	5,0
F20	20 mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 9,0	5,0
F33	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa 0,06% en p/v de PS20, pH 7,3	4,0

En base a su comportamiento Newtoniano en función de la velocidad de corte, viscosidades muy bajas y ausencia de formación de gel o separación de fases Schlieren significativa, se seleccionaron las formulaciones F15, F16, F17, F18, F20 y F33 a F42 (pH $\geq$ 6,5) para mayor desarrollo

Ejemplo 3: Evaluación de la Formación de Variantes de Carga, Agregación de Proteínas, Recorte/Fragmentación, Potencia Basada en Células

Además de mantener el comportamiento Newtoniano y la baja viscosidad de la solución, las formulaciones de EFX descritas en el presente documento se evaluaron con respecto a la agregación en Especies de Mayor Peso Molecular (HMWS), el recorte o la fragmentación en Especies de Menor Peso Molecular (LMWS), la formación de especies subvisibles (SVP) y partículas visibles, y modificaciones post-traduccionales que resultan en la formación de variantes de carga más ácidas o básicas. La tasa de formación de especies cargadas es mayor para EFX en comparación con otras proteínas en general a temperaturas de refrigeración, y la tasa de formación aumenta a temperatura ambiente. El Ejemplo describe estudios realizados buscando minimizar, por ejemplo, la formación de especies cargadas, HMWS, y similares.

Modificaciones Post-traduccionales: Determinación de Variantes de Carga de EFX

La heterogeneidad de carga de EFX se evaluó mediante cromatografía de intercambio aniónico (AEX-HPLC) y procedimiento isoelectrico capilar con imágenes (icIEF). Estos dos métodos separan variantes de carga de proteínas mediante distintos mecanismos. La separación de AEX-HPLC se basa en cargas expuestas en la superficie de una proteína que interactúan con una matriz cromatográfica estacionaria cargada. La separación por icIEF se basa en que cada variante de carga de una proteína migra electroforéticamente a su punto isoelectrico a través de un gradiente de pH establecido en una separación capilar. Como resultado de sus distintos mecanismos de separación, AEX e icIEF se consideran métodos complementarios y ortogonales para evaluar la heterogeneidad de carga de las proteínas.

Evaluación de Variantes de Carga Mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico (AEX-HPLC)

La distribución de la heterogeneidad de carga en las formulaciones de EFX se evaluó utilizando una columna de resina de intercambio aniónico TSK-Gel Q-STAT (4,6 mm x 100 mm, tamaño de partícula de 7 μ m) con detección de absorbancia UV a 230 nm. La EFX cargada negativamente se une a la matriz de la columna cargada positivamente equilibrada en Tris 20 mM y amortiguada a pH 8 que contiene 20% (v/v) de acetonitrilo. Las variantes de EFX débilmente cargadas se desplazan fácilmente de la columna cromatográfica mediante una baja concentración de sal, mientras que las variantes de EFX con carga más negativa requieren una mayor concentración de sal para desplazarlas. El gradiente de sal fue un gradiente lineal de cloruro de sodio 0,7 M, pH 8,0 a un flujo de 0,5 mL/min. La temperatura de la columna cromatográfica se mantuvo a 30 °C durante todo el análisis.

Un cromatograma de AEX-HPLC representativo de EFX formulada en F18 se muestra en la Figura 6, con las áreas de los picos pre-, post- y principal cuantificadas y resumidas en la Tabla 6. A efectos del análisis cromatográfico, las variantes de carga en EFX se agrupan como Pre-picos (variantes más básicas, o variantes de carga EFX con menos cargas negativas en su superficie), Pico-principal y Post-picos (variantes más ácidas o variantes de carga EFX con más cargas negativas en su superficie).

Tabla 6: Distribución de Variantes de Carga en Formulación de EFX F18 Separada por AEX-HPLC.

Pico	Porcentaje de Abundancia [±] (%)
% de Pico Principal	62,0
% de Picos Básicos (Pre-Picos)	8,7
% de Picos Ácidos (Post-picos)	29,3

[±]Basado en el área pico total de cromatograma.

Evaluación de Variantes de Carga por Procedimiento Isoeléctrico Capilar de Imagen (icIEF)

Se desarrolló un método de procedimiento isoelectrico capilar con imágenes (icIEF) utilizando ProteinSimple iCE3 para confirmar experimentalmente el punto isoelectrico (pI) de EFX. Se preparó la EFX en varias formulaciones en una mezcla que contiene solución de anfólitos, urea 3 M y marcadores correspondientes a pI 5,85 y pI 8,18. La separación de variantes de carga se realizó en un capilar recubierto de 100 µm de diámetro interno y 50 mm de longitud a temperatura ambiente, con los picos de proteína monitoreados por absorbancia a 280 nm. Las variantes de carga se separaron mediante dos pasos de procedimiento distintos; inicialmente 1,000 V durante un minuto, seguido de 10 minutos de movilización a 3,000 V.

El pico principal de EFX en la formulación F18 migró con un pI aparente de 6,67, que concuerda bien con el pI teórico de aproximadamente 6,5 (Figura 7). Se detectaron picos de variantes de carga adicionales en niveles bajos en el electroferograma, migrando antes (variantes ácidas) o después (variantes básicas) del pico principal. En la Tabla 7 se muestra la distribución de los picos ácidos, principales y básicos expresada como porcentaje de abundancia en función del área del pico principal. La distribución de los picos previos, el pico principal y los picos posteriores del electroferograma icIEF refleja la informada para los picos previos, el pico principal y los picos posteriores mediante AEX-HPLC.

Tabla 7: Distribución de Variantes de Carga en la Formación de EFX F18 Separadas por icIEF.

Pico	pl	Porcentaje de abundancia[±] (%)
% de Pico Principal	6,67	57,4
% de Picos Ácidos	<6,60	32,7
% de Picos Básicos	>6,70	9,8

icIEF = procedimiento isoelectrico capilar de imagen. [±]Basado en el área pico total del electroferograma.

La formación de variantes de carga cuando se almacena a 25 °C/60% de RH, ilustrada como una disminución en el pico principal de EFX a lo largo del tiempo para F1-F20 en comparación con F33 se muestra en la Figura 8A. En particular, durante 4 semanas de almacenamiento, la EFX formulada en Tris-HCl que contiene Arg/Arg-HCl, sacarosa, PS20 o PS80 (F33 a F38) amortiguada en el rango de pH de 7,0 a 7,6 demostró una tasa de pérdida del pico principal aproximadamente un 60% más lenta que para EFX en F18 y una tasa de formación de variantes de carga más ácida más de 2 veces más lenta que para EFX en F20.

Además, la Figura 8B muestra la abundancia relativa como porcentaje del área total del pico del cromatograma para variantes de carga más básicas (pre-picos) medidas por AEX-HPLC, y la Figura 8C ilustra el porcentaje de post-picos, correspondientes a variantes más ácidas en el momento cero, 1 semana y 1 mes a 25 °C/60% de RH para las formulaciones F1 a F20. Como es evidente de la Figura 8B, las variantes de carga básica o pre-picos son significativamente más abundantes en las formulaciones F1 a F12, donde F1 muestra un 53% de variantes básicas, en comparación con las formulaciones F15 a F20 y F33 donde las variantes básicas permanecen relativamente constantes por debajo del 10% del área total del cromatograma. Por el contrario, las formulaciones F15 a F20 manifestaron una mayor formación de variantes ácidas después de un mes de almacenamiento a 25 °C/60% de RH (Tabla 8).

La estabilidad mejorada de F33 también fue evidente cuando se almacenó a 2-8 °C, siendo la tasa de formación de variantes de carga de EFX aproximadamente un 50% menor que en F18 y 3,2 veces menor que en F20 (Tabla 9).

En resumen, F33, con una combinación única de excipientes (es decir, un azúcar, un tensioactivo y Arg/Arg-HCl), fue la composición farmacéutica más

estable como formulación líquida (en comparación con las formulaciones probadas), con el pico principal de EFX permanece relativamente sin cambios con el tiempo cuando se almacena a 2-8 °C (Figura 9), como lo confirma la tasa más lenta de formación de variantes de carga a 25 °C/60% de RH en comparación con formulaciones que contienen otros excipientes comúnmente utilizados en biofarmacéuticos basados en proteína.

Tabla 8: Tasas de formación de variantes de carga EFX en formulaciones seleccionadas* almacenadas a 25 °C, expresadas como porcentaje de pérdida de pureza mediante AEX-HPLC (basado en el porcentaje de disminución del área del pico principal) por semana.

Formulación	Composición	Tasa de formación de variantes de carga [%/semana]
F33	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa 0,06% en p/v de PS20, pH 7,3	-4,68
F18	20 mM de Tris/Tris-HCl, 160 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,8	-7,66
F3	20 mM de glutamato de Na/ácido glutámico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,0	-5,55
F14	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de sacarosa, 40 mM de Met, PS20, pH 7,5	-8,25
F15	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,5	-5,38
F16	20 mM de fosfato de Na, 180 mM de sacarosa, 40 mM de Glu, 40 mM de Arg, PS20, pH 7,5	-5,85
F17	180 mM de sacarosa, 40 mM de Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,8	-5,36
F19	20 mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 8,3	-6,85
F20	20 mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 9,0	-9,97

*Se excluyeron formulaciones de EFX que forman geles o separación de fase.

Tabla 9. Tasas de formación de variantes de carga de EFX en formulaciones seleccionadas * almacenadas a 2-8 °C, expresadas como porcentaje de pérdida de pureza por AEX-HPLC (como % de disminución del área pico principal) por mes.

Formulación	Composición	Tasa de formación de variantes de carga [%/mes]
F33	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa 0,06% en p/v de PS20, pH 7,3	-1,52
F18	20 mM de Tris/Tris-HCl, 160 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,8	-3,28
F3	20 mM de glutamato de Na/ácido glutámico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,0	-1,70
F14	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de sacarosa, 40 mM de Met, PS20, pH 7,5	-1,80
F15	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,5	-2,00
F16	20 mM de fosfato de Na, 180 mM de sacarosa, 40 mM de Glu, 40 mM de Arg, PS20, pH 7,5	-2,00
F17	180 mM de sacarosa, 40 mM de Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,8	-2,00
F19	20 mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 8,3	-2,50
F20	M Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 9,0	-5,20

*Se excluyeron formulaciones de EFX que forman geles o separación de fase.

Evaluación de variantes de tamaño (agregación y formación) por SE-HPLC

Las variantes de tamaño molecular de EFX, que se originan de la

agregación (formación de especies de alto peso molecular (HMWS)) o de la fragmentación (formación de especies de bajo peso molecular (LMWS)), se caracterizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución con exclusión de tamaño (SE-HPLC) utilizando un gel de sílice. Columna de filtración (Tosho G3000 SWXL) con detección de absorbancia UV a 280 nm. La fase móvil estaba compuesta de fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 6,9. Las variantes de tamaño de EFX se eluyeron isocráticamente de la columna a 0,5 mL/min a temperatura ambiente y los picos se cuantificaron utilizando un detector de absorbancia UV. Las variantes de tamaño de EFX se separan en una especie principal, el pico cromatográfico predominante y niveles bajos de dímero (que comprende dos homodímeros de EFX) y variantes de tamaño de EFX de alto peso molecular (HMW), como se muestra en la Figura 10.

En la Figura 11 se muestra la formación de variantes de tamaño durante el almacenamiento de formulaciones seleccionadas, F1-F20 y F33 a 25 °C, que se manifiesta como un pico principal decreciente de EFX mediante SE-HPLC. Formulaciones que contienen amortiguador de Tris-HCl, Arg/Arg-HCl, sacarosa, PS20 o PS80 (F33 a F38) amortiguada en un rango de pH de 7,0 a 7,6 tuvo una tasa de pérdida de pico principal más lenta que otras formulaciones a 25 °C, notablemente un 70% más lenta que F18 y más de 19,5 veces más lenta que F14 por el contrario (Tabla 10). Cuando se almacenó a 2-8 °C, la tasa de formación de variantes de tamaño (HMWS y LMWS) de EFX en F33 también fue aproximadamente un 50% menor que para F18, y 20 veces menor que para F14 como ejemplos (Tabla 11). La combinación única de EFX con los excipientes contenidos en F33 (y en las concentraciones indicadas) aseguró que el perfil de variante de tamaño de EFX permaneciera relativamente sin cambios con el tiempo cuando se almacenó a 2-8 °C (Figura 12). Del mismo modo, cuando se almacenó en condiciones más estresantes a 25 °C, F33 demostró la tasa más lenta de formación de variantes de tamaño (Figura 11) en comparación con formulaciones basadas en otros excipientes comúnmente utilizados para productos biofarmacéuticos a base de proteínas.

Tabla 10. Tasas de formación de variantes de tamaño de EFX en formulaciones seleccionadas* almacenadas a 25 °C, expresadas como pérdida de pureza (como % de disminución del área del pico principal) mediante SE-HPLC por semana.

Formula ción	Composición de formulación	Tasa de formación de variantes de carga [%/semana]
F33	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa 0,06% en p/v de PS20, pH 7,3	-0,16
F18	20 mM de Tris/Tris-HCl, 160 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,8	-0,50
F3	20 mM de glutamato de Na/ácido glutámico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,0	-1,38
F14	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de sacarosa, 40 mM de Met, PS20, pH 7,5	-3,12
F15	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,5	-0,63
F16	20 mM de fosfato de Na, 180 mM de sacarosa, 40 mM de Glu, 40 mM de Arg, PS20, pH 7,5	-0,57
F17	180 mM de sacarosa, 40 mM de Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,8	-0,62
F19	20 mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 8,3	-0,89
F20	mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 9,0	-0,73

**Se excluyeron formulaciones de EFX que forman geles o separación de fase.

Tabla 11. Tasas de formación de variantes de tamaño de EFX en formulaciones seleccionadas* almacenadas a 2-8°C y expresadas como porcentaje de pérdida de pureza (como % de disminución del área del pico principal) mediante SE-HPLC por mes

Formulación	Composición de formulación	Tasa de formación de variantes de carga [%/mes]
F33	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa 0,06% en p/v de PS20, pH 7,3	-0,14
F18	20 mM de Tris/Tris-HCl, 160 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,8	-0,30
F3	20 mM de glutamato de Na/ácido glutámico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,0	-0,20
F14	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de sacarosa, 40 mM de Met, PS20, pH 7,5	-2,80
F15	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,5	-1,80
F16	20 mM de fosfato de Na, 180 mM de sacarosa, 40 mM de Glu, 40 mM de Arg, PS20, pH 7,5	-1,80
F17	180 mM de sacarosa, 40 mM de Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,8	-2,20
F19	20 mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 8,3	-1,70
F20	mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 9,0	-1,20

**Se excluyeron formulaciones de EFX que forman geles o separación de fase.

Evaluación de Variantes de Tamaño (HMWS y LMWS) mediante CE-SDS (No Reducido)

Se utilizó electroforesis capilar con dodecilsulfato de sodio (CE-SDS) para evaluar la pureza de EFX. El método empleó EFX desnaturalizada reducida así como EFX desnaturalizada no reducida.

Las variantes de tamaño de EFX se determinaron cuantitativamente mediante CE-SDS en condiciones desnaturalizantes y no reductoras. La EFX se mezcló con amortiguador de fosfato de sodio 100 mM a pH 6,5 y solución de SDS al 10 % (v/v) antes de la adición de N-etilmaleimida (NEM) 140 mM a temperatura ambiente. Luego, la muestra se analizó en un capilar de sílice sin recubrimiento de 20

cm (diámetro interno de 50 µm) con un sistema de análisis farmacéutico Beckman PA800 Plus conectado con un detector PDA que controla la absorbancia de 220 nm. Los datos de cada análisis electroforético se adquirieron con el software de adquisición de datos 32 Karat.

El análisis del EFX desnaturalizado y no reducido mostró la proteína intacta como pico principal. Las especies de cadena sencilla y de bajo peso molecular migran antes del pico principal como pre-picos. Los agregados de EFX se integraron después del pico principal como picos posteriores, como se muestra en un electroferograma representativo de EFX (Figura 13).

La formación de variantes de tamaño de EFX en formulaciones seleccionadas se almacenó a 25 °C, evidente como pico principal decreciente con el tiempo mediante CE-SDS (no reducido), como se muestra en la Figura 14, y cuando se almacenó a 2-8 °C en la Figura 15. Las variantes de tamaño en todas las formulaciones permanecieron relativamente sin cambios con el tiempo cuando las formulaciones de EFX se almacenaron a 2-8 °C (Figura 15). A 25 °C, la pérdida de pureza fue mayor, por ejemplo en F1 (-7,04%/semana). En comparación, F33 demostró una estabilidad mejorada en estas condiciones con variantes de tamaño formadas a un ritmo aproximadamente 10 veces más lento (-0,70 %/semana).

Evaluación de la formación de variantes de tamaño (HMWS y LMWS) mediante RP-HPLC

El método de RP-HPLC separa la EFX en una columna Zorbax 300SB C18 (4,6 mm x 150 mm, tamaño de partícula de 3,5 µm) usando una fase móvil de ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v) en agua sobre un gradiente bifásico de 70% N-propanol y acetonitrilo al 30% a 45 °C y un flujo de 0,5 mL/min. Los picos de proteína eluida se detectaron con un detector de absorbancia UV a 280 nm.

El cromatograma de RP-HPLC de EFX se muestra en la Figura 16. El contenido de los picos separados (numerados del 1 al 7) se caracterizó mediante espectrometría de masas de alta resolución en línea y se resume en la Tabla 12.

La formación de variantes de tamaño en formulaciones seleccionadas F1-F20 y F33 almacenadas a 25 °C se muestra en la Figura 17, evidente como pico principal decreciente con el tiempo medido por RP-HPLC. Formulaciones de EFX que contienen amortiguador de Tris-HCl, Arg/Arg-HCl, sacarosa, PS20 o PS80 (F33 a F38) amortiguadas en un rango de pH de 7,0 a 7,6 tienen una tasa de pérdida de pico

principal aproximadamente un 10% más lenta que la formulación F18 a 25 °C, y una tasa aproximadamente 6 veces más lenta que la formulación F14 (Tabla 10). Cuando se almacenó a 2-8 °C, la tasa de formación de variantes de tamaño (HMWS y LMWS) en F33 también fue aproximadamente la mitad que la de F18, y aproximadamente 30 veces menor que la tasa de F20 (Tabla 13).

Si bien varias formulaciones probadas proporcionaron efectos benéficos sobre la estabilidad de EFX, la combinación de EFX con los excipientes contenidos en F33 (es decir, un azúcar, un tensioactivo y Arg/Arg-HCl) fue superior, asegurando que el perfil de variante de tamaño de EFX se mantuviera relativamente sin cambios con el tiempo cuando se almacena a 2-8°C (Figura 18). Del mismo modo, cuando se almacenó en condiciones más estresantes a 25 °C, la F33 demostró la tasa más lenta de formación de variantes de tamaño (Figura 17) en comparación con formulaciones basadas en otras combinaciones de excipientes comúnmente utilizadas para productos biofarmacéuticos a base de proteínas.

Tabla 12: Tasas de formación de variantes de tamaño en formulaciones seleccionadas de EFX almacenadas a 25 °C, expresadas como pérdida de pureza (como % de disminución del área del pico principal) mediante RP-HPLC por semana.

Formulación*	Composición de formulación	Tasa de formación de variantes de tamaño [%/semana]
F33	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa 0,06% en p/v de PS20, pH 7,3	-0,75
F18	20 mM de Tris/Tris-HCl, 160 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,8	-0,83
F3	20 mM de glutamato de Na/ácido glutámico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,0	-2,77
F14	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de sacarosa, 40 mM de Met, PS20, pH 7,5	-4,66
F15	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,5	-1,41
F16	20 mM de fosfato de Na, 180 mM de sacarosa, 40 mM de Glu, 40 mM de Arg,	-1,53

	PS20, pH 7,5	
F17	180 mM de sacarosa, 40 mM de Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,8	-0,87
F19	20 mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 8,3	-1,09
F20	mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 9,0	-2,18

* Se excluyen las formulaciones EFX que forman geles o separan fases.

Tabla 13: Tasas de formación de variantes de tamaño en formulaciones seleccionadas de EFX almacenadas a 2-8 °C, expresadas como pérdida de pureza (como % de disminución del área del pico principal) mediante RP-HPLC por semana.

Formulación*	Composición de formulación	Tasa de variantes de formación de tamaño [%/mes]
F33	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de Arg/Arg-HCl, 120 mM de sacarosa 0,06% en p/v de PS20, pH 7,3	-0,08
F18	20 mM de Tris/Tris-HCl, 160 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,8	-0,23
F3	20 mM de glutamato de Na/ácido glutámico, 220 mM de trehalosa, PS20, pH 5,0	-2,30
F14	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de sacarosa, 40 mM de Met, PS20, pH 7,5	-2,20
F15	20 mM de fosfato de Na, 190 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, PS20, pH 7,5	-2,20
F16	20 mM de fosfato de Na, 180 mM de sacarosa, 40 mM de Glu, 40 mM de Arg, PS20, pH 7,5	-2,10
F17	180 mM de sacarosa, 40 mM de Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,8	-2,30
F19	20 mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa,	-3,20

	PS20, pH 8,3	
F20	mM de Tris/Tris-HCl, 220 mM de sacarosa, PS20, pH 9,0	-2,50

* Las formulaciones EFX que forman geles o separan fases se excluyeron del análisis RP-HPLC.

Evaluación de Variantes de Masa y Carga de EFX en las Formulaciones Más Estables mediante Espectrometría de Masas

Para dilucidar las variantes de masa y las modificaciones post-traduccionales asociadas con variantes de carga alteradas, varias formulaciones de EFX se caracterizaron por su masa intacta y por el mapeo de péptidos después de la digestión con tripsina. Para minimizar las modificaciones químicas como la desamidación u oxidación que se producen durante la preparación de péptidos tripticos, la digestión se realizó en condiciones reductoras. Los péptidos tripticos resultantes se separaron mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento de fase inversa C18 (RP-UPLC) con detección por absorción UV (280 nm), luego se caracterizaron mediante análisis de espectrofotometría de masas de alta resolución. Los tipos de variantes de masa de EFX en formulaciones no estresadas (almacenadas congeladas) se compararon con aquellas en formulaciones almacenadas durante 1 mes a 2-8 °C, 1 mes a 25 °C y 1 mes a 40 °C (datos no mostrados debido a similitud con 1 mes a 25 °C). La abundancia relativa del homodímero intacto no modificado de EFX y de otras variantes de masa (fragmentos y especies modificadas) en las formulaciones más estables, F18 y F33, se resume en la Tabla 14.

Tabla 14: Distribución de variantes de masa de EFX medidas por LC/MS en las formulaciones F18 y F33 almacenadas durante 1 mes a 25 °C, con referencia a las mismas formulaciones en condiciones sin estrés.

Variantes de Masa de EFX	Masa Intacta Teórica (Da)	Porcentaje de abundancia por MS de Variantes de Masa de EFX				
		EFX F18 No estresada	EFX F18 1 M 25 °C	EFX F33 No estresada	EFX F33 1 M 2-8 °C	EFX F33 1 M 25 °C
EFX (homodímero no modificado)	92108,8	89,3	78,7	88,6	89,3	87,6
EFX, 6-424	91496,10	1,7	1,0	1,9	1,0	1,8
EFX, 1-412	90915,70	5,1	ND	ND	ND	ND
EFX, 1-411	90816,50	0,6	3,6	4,7	4,7	4,8
EFX, 1-397	89408,00	1,1	ND	ND	ND	ND
EFX, 1-396	89336,90	0,3	ND	ND	ND	ND
EFX, 1-377	87376,50	ND	ND	ND	ND	ND
EFX, 1-370	86729,80	ND	0,4	0,8	0,9	0,9
EFX, 1-364	86009,00	0,2	1,5	ND	ND	0,4
EFX, 1-298	78704,70	ND	0,5	0,9	0,9	1,1
EFX, 1-296	78463,40	0,1	ND	0,1	0,2	0,1
EFX, 1-278	76679,60	0,2	ND	0,4	0,4	0,4
EFX, 1-276	76437,30	ND	ND	0,5	0,5	0,6
EFX, 1-274	76187,00	0,04	ND	0,5	0,5	0,6
EFX, 1-266	75328,20	0,2	ND	0,1	ND	ND
EFX, 1-255	74005,70	1,2	0,3	0,2	0,2	0,3
EFX (monómero único)	46054 ,40	0,4	ND	0,1	0,2	0,3
EFX+42Da ⁽¹⁾	NA	0,8	ND	1,0	1,1	1,0
EFX+34Da	NA	ND	ND	ND	ND	ND
EFX+16Da	NA	ND	14,0	ND	ND	ND

MS = espectrometría de masas; ND = no detectado

(1) Una impureza común de +42Da corresponde a la acetilación del N terminal o de un residuo básico.

Se identificaron los tipos de modificación post-traducciona para cada péptido tríptico. Se comparó la abundancia relativa de cada péptido que contiene un residuo de aminoácido modificado de las formulaciones más estables de EFX (F18 y F33) después de estresarse durante 1 mes a 25 °C con referencia a las mismas formulaciones sin estresarse, véase la Tabla 15.

Tabla 15: Análisis de mapa de péptidos por LC/MS de EFX de formulaciones estresadas y no estresadas, F18 y F33.

Porcentaje de Péptido Modificado						
Pép tido	Tipo	EFX F18 No estre sada	EFX F18 1 M 25 °C	EFX F33 No estre sada	EFX F33 1 M 2-8 °C	EFX F33 1 M 25 °C
TA	Oxidación	0,2	ND	ND	ND	ND
TB	Oxidación	1,8	3,8	1,3	1,4	1,8
TC	Succinimida	0,3	0,2	0,4	0,8	0,5
	Desamidación	0,8	0,7	ND	0,1	ND
TD	Desamidación	0,7	ND	ND	ND	ND
TE	Succinimida	ND	ND	0,3	0,2	0,2
	Desamidación	2,2	15,2	ND	ND	ND
TF	Succinimida	3,4	3,2	2,6	2,7	2,5
	Desamidación	3,9	1,9	2,0	2,5	2,0
TG	Succinimida	0,3	ND	0,1	0,1	0,1
	Desamidación	0,8	0,3	ND	ND	ND
TH	Desamidación	0,8	0,5	ND	ND	ND
TI	Succinimida	3,0	2,6	2,3	2,0	1,8
	Desamidación	5,7	7,9	2,0	4,0	4,5
TJ	Succinimida	ND	0,3	ND	ND	ND
	Desamidación	0,5	2,1	1,2	3,0	4,6
TK	Desamidación	ND	0,4	ND	0,2	ND
TL	Oxidación	0,7	2,1	0,4	0,4	1,1
TM	Succinimida	0,3	0,5	0,4	0,1	0,5
	Desamidación	2,0	0,4	0,3	0,1	0,5
TN	Desamidación	ND	ND	ND	ND	ND
TO	Desamidación	ND	ND	ND	ND	ND
TP	Desamidación	0,0	5,3	ND	ND	ND
TQ	Oxidación	1,9	10,1	1,2	1,5	2,0

ND = no detectado

La principal forma de modificación post-traducciona de EFX, formulada en F18 y F33, es la desamidación de asparagina (Asn) a residuos ácidos de ácido aspártico, incluidos niveles bajos del intermediario de succinimida de Asn, lo que da como resultado variantes de carga más ácidas. Ocho de nueve residuos de Asn en cada cadena monomérica de EFX mostraron algún grado de desamidación. Además, dos de los cuatro residuos de glutamina (Gln) también se desamidaron a ácido glutámico en cada cadena monomérica. La oxidación de metionina (Met) estuvo presente en niveles bajos en tres posiciones. Como se esperaba, un nivel significativamente menor de modificaciones post-traduccionales y formación de variantes de carga es evidente bajo estrés en las formulaciones más estables de EFX, F18 y F33, con F33 pareciendo menos susceptible que F18, especialmente los dos residuos de Asn más susceptibles a la desamidación y un Met susceptible a la oxidación (véase Tabla 15).

Evaluación de Variantes de Tamaño de EFX en las Formulaciones más Estables por Cromatografía de Exclusión de Tamaño: Dispersión de Luz Láser de Múltiples Ángulos (SEC-MALLS)

La distribución de especies por peso molecular en muestras sin diluir de EFX se evaluó por SEC-MALLS. El método SEC-MALLS monitorea la elución de especies de EFX de diferentes tamaños utilizando dos detectores en línea: 1) un detector UV que registra a 280 nm y 360 nm (1260 Infinity LC, Agilent Technologies) y 2) un detector de dispersión de luz (AMANECER HELEOS II, Wyatt Technology). El análisis de datos y los cálculos de peso molecular (MW) se realizaron en datos MALLS utilizando el software ASTRA 6 (Wyatt Technology). Se utilizó un coeficiente de extinción teórico de 0,97 ml mg⁻¹ cm⁻¹ para EFX para calcular los valores de peso molecular.

El análisis de inyecciones repetidas de formulaciones de EFX reveló que el pico principal representaba el 94,5% de la proteína, al que se le asignó un MW aparente de 88,0 a 88,4 kDa, en buena concordancia con el MW calculado de 92 kDa. También se encontraron cantidades relativamente bajas de tres especies adicionales, incluidas dos variantes de alto peso molecular: dímero y HMW, y una variante de bajo peso molecular (LMW). La Figura 19 muestra un cromatograma SEC-MALLS representativo de EFX en F18 (sin estrés). La determinación precisa de los pesos moleculares de las variantes de baja abundancia fue un desafío debido a la separación

relativamente incompleta de los distintos picos como resultado de la alta concentración de proteína requerida para SEC-MALLS. Sin embargo, las especies de dímero tenían un MW aparente de 136 kDa, y las especies de HMW un MW aparente de 292 kDa, lo que implica que las especies de HMW pueden representar un oligómero más grande, posiblemente un tetramero. La especie LMW no fue lo suficientemente abundante como para asignarle un MW.

Distribución de Tamaño por Ultracentrifugación Analítica de Velocidad de Sedimentación (SV-AUC) en la Mayoría de las Formulaciones Estables

Las propiedades conformacionales hidrodinámicas de EFX en diferentes formulaciones fueron analizadas por SV-AUC utilizando una ultracentrífuga analítica Optima (Beckman-Coulter). Las muestras se analizaron a 1,0 mg de proteína/mL. La corrida de SV-AUC se realizó a 20 °C, con celdas de muestra de pieza central de doble sector de carbón Epon de 12 mm en un rotor de titanio An50 de 8 orificios a 45,000 rpm. Se realizó un ajuste global de los datos brutos de los límites de sedimentación, seleccionados de un subconjunto de mediciones de escaneo radial, para cada muestra mediante el método de análisis de distribución continua $c(s)$ utilizando el programa de software SEDFIT V.11.71. Además de producir perfiles de distribución de coeficientes de sedimentación $c(s)$, se estimaron los coeficientes de sedimentación en condiciones estándar ($S_{20,w}$), la relación del coeficiente de fricción (f/f_0) y el peso molecular (MW).

Perfiles representativos de distribución del coeficiente de sedimentación de EFX en F18 y F33 se muestran en la Figura 20, donde el eje vertical del gráfico muestra la distribución de concentración y el eje horizontal muestra la separación de las especies en función de su coeficiente de sedimentación. La especie principal en la formulación F33, que representa aproximadamente el 100% del total de especies, tiene un coeficiente de sedimentación aparente de 4,06 S, f/f_0 de 1,8 y un MW aparente calculado de 89,7 kDa (Tabla 16). La especie principal en la formulación F18, que representa el 98,7% del total de especies, tiene un coeficiente de sedimentación aparente de 4,47 S, f/f_0 de 1,6 y un MW aparente calculado de 88,9 kDa (Tabla 16). Las especies de APM representan entre el 0,2% y el 1,3% del total de especies. No se observan especies de BPM en F18 (Figura 23 con inserto ampliado a escala). Los valores del coeficiente de sedimentación para las especies HMW son consistentes con el dímero (~6,5 S) y una especie oligomérica más grande, potencialmente un

tetrámero (~9 S).

Tabla 16: Parámetros Hidrodinámicos para Especies Principales de EFX en F18 y F33 mediante Análisis de SV-AUC.

Nombre de la Muestra	Análisis de SV-AUC mediante SEDFIT			
	Especies Principales			Contenido (%)
	f/f ₀	s _{20,w} (S)	MW Aparente (kDa)	
EFX F18	1,6	4,47	88,9	98,7
EFX F33	1,8	4,06	89,7	100,0

f/f₀ = relación del coeficiente de fricción; MW = peso molecular; S_{20,w} = coeficiente de sedimentación en condiciones estándar; SV-AUC = ultracentrifugación analítica de velocidad de sedimentación

Bioensayo de Potencia Basado en Células

El bioensayo de potencia basado en células EFX utiliza “Células Listas de Ensayo iLite FGF21” (Svar Life Sciences, Cat#BM3071), derivadas de la línea celular de riñón embrionario humano, HEK293. Estas células listas para el ensayo de FGF21 se han diseñado de forma recombinante para sobreexpresar: (1) dos correceptores obligados de FGF21 humano: el receptor 1c del factor de crecimiento de fibroblastos humano (FGFR1c) y el β Klotho humano (KLB), y (2) un sistema reportero diseñado para expresar luciferasa de luciérnaga en respuesta a la transducción de señales intracelulares posteriores del FGFR1c activado (Ogawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 7432–7437; Agrawal et al., Mol Metab. 2018; 13:45-55; Yie et al., FEBS Lett. 583, 19-24). Cuando se une como un complejo correceptor con KLB, el FGF21 activa la tirosina cinasa de FGFR1c, que a su vez fosforila las proteínas adaptadoras posteriores, lo que resulta en la activación de la cascada de sarcoma de rata– proteína cinasa activada por mitógenos (RAS-MAPK), incluida la fosforilación de ERK1/2 (proteína cinasa regulada por señales extracelulares). El ERK1/2 fosforilado se transloca al núcleo donde activa el factor de transcripción, la proteína Elk1 que contiene el dominio ETS (Ornitz and Itoh, Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2015; 4(3):215-66; Zou et al, Mol Med Rep 19(2):759–770). Por lo tanto, las células Listas del Ensayo iLite FGF21 permiten medir la potencia *in vitro* de EFX como agonista del

complejo correceptor de FGF21 de FGFR1c-KLB mediante un ensayo basado en células. El complejo trimérico de EFX que se une simultáneamente a los correceptores estimula la expresión de la enzima luciferasa en proporción al grado en que EFX activa la transducción de señales mediada por FGFR1c.

Las células del Ensayo Listo iLite FGF21 se sembraron en placas, luego se incubaron con diluciones en serie de muestras de prueba EFX y los controles positivos y negativos apropiados se ejecutaron en paralelo. Para medir la cantidad de luciferasa expresada, las células se lisaron con un reactivo que contiene detergente y el sustrato de luciferasa, luciferina. La escisión de luciferina por la luciferasa produce luminiscencia, medida con un luminómetro. La señal de luminiscencia se representa en función de la concentración de proteína del artículo de prueba, lo que produce una curva de concentración-respuesta que se ajusta a una ecuación logística de cuatro parámetros mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados no lineal. La potencia relativa de las muestras de prueba se determinó restringiendo las asíntotas inferior/superior y la pendiente de Hill a los valores de una curva ajustada a un gráfico de concentración-respuesta del Estándar de Referencia generado simultáneamente, y luego tomando la relación de EC50 del Estándar de Referencia al parámetro de EC50 de la muestra. En la Figura 21 se muestra una curva de concentración-respuesta representativa para EFX en F18.

La potencia relativa de EFX en formulaciones seleccionadas F1-F20 y F33, almacenadas a 25 °C, medida mediante el bioensayo celular i-Lite, se muestra en la Figura 22. La potencia relativa de EFX en formulaciones seleccionadas almacenadas a 2-8 °C se muestra en la Figura 23. En ambas condiciones de almacenamiento, las formulaciones de EFX que contienen amortiguador Tris-HCl, Arg/Arg-HCl, sacarosa, PS20 o PS80 (F33 a F38) amortiguadas en un rango de pH de 7,0 a 7,6 no muestran ninguna pérdida aparente de potencia relativa a lo largo del tiempo, en contraste con muchas de las otras formulaciones, como la F3, que mostró aproximadamente una pérdida de potencia del 80% durante 12 semanas de almacenamiento a 25 °C/60% de humedad relativa.

La combinación única de EFX con los excipientes contenidos en F33 aseguró que la potencia celular de EFX se mantuviera relativamente sin cambios con el tiempo cuando se almacenó a 25 °C en contraste con las formulaciones basadas en otros excipientes comúnmente utilizados para productos biofarmacéuticos a base de

proteínas (Figura 22).

Ejemplo 4: Estabilidad Térmica y Conformacional de las Formulaciones de EFX

Los espectros de Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR) de soluciones que contienen la proteína EFX se obtuvieron en un espectrómetro FTIR Tensor 27 (Bruker Optics) y un banco óptico de transmisión AquaSpec a una temperatura controlada de 25 °C. Los espectros de las muestras de proteínas medidas sin dilución se registraron en números de onda de 4,000 a 850 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} . Cada medición de haz único consistió en un promedio de 60 exploraciones y utilizó compensación atmosférica (eliminación de bandas perturbadoras de H_2O y/o CO_2 en los espectros). El espectro de absorbancia con corrección de fondo de cada muestra que contiene EFX se transformó en un espectro de segunda derivada después de la normalización del vector en la región del número de onda de 1,700 a 1,600 cm^{-1} y con 9 puntos de suavizado.

El espectro FTIR de la segunda derivada de EFX en F18 y F33 se muestra en la Figura 24. El espectro de absorción exhibe bandas fuertes alrededor de 1641 cm^{-1} y 1689 cm^{-1} correspondientes a láminas beta, lo que indica el predominio de láminas beta antiparalelas. Estructura en la proteína, típica de las proteínas que contienen un dominio Fc.

Estabilidad Conformacional Mediante Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) de UV Lejano

La estructura secundaria de EFX se analizó mediante espectroscopia de dicroísmo circular (CD) de UV lejano. El cromóforo principal para la espectroscopia CD de UV lejano (190–260 nm) es el enlace peptídico de una proteína. La señal CD, en función de la longitud de onda, se origina de la orientación de los enlaces peptídicos subyacentes a la estructura secundaria, que está determinada por la secuencia de una proteína. Por lo tanto, un espectro CD de UV lejano proporciona una medición sensible de la estructura secundaria de una proteína.

Se utilizó un espectrómetro de CD Chirascan Auto Q100 (Applied Photophysics Ltd.) para mediciones automatizadas de espectroscopia de CD de UV lejano (rango de longitud de onda: 190–260 nm). Los espectros se recolectaron a 20 °C con una concentración de proteína de 2,0 mg/mL y una longitud de trayectoria de 0,1 mm. El ancho de banda espectral se estableció en 1,0 nm, el tiempo de muestreo

por punto fue de 1,0 segundos y el tamaño del paso fue de 1,0 nm. Se promediaron diez exploraciones consecutivas para cada medición de una muestra de proteína. Se registró un espectro de referencia para el amortiguador de formulación antes de medir cada muestra de proteína y luego se restó del espectro de la proteína. Después de la resta, los valores de CD se convirtieron en valores medios de elipticidad residual ($[\Theta]_{mr}$).

Los espectros CD de UV lejano de EFX en las formulaciones F18 y F33 (195-260 nm) (Figura 25) son consistentes con los de otras proteínas que incorporan un dominio Fc (Li et al, 2012). El espectro tiene una pequeña característica de hombro a 230 nm que indica un dominio Fc plegado correctamente. La elipticidad negativa primaria del espectro de CD es típica de las proteínas de la superfamilia del factor de crecimiento de fibroblastos, que incluye FGF21, lo que indica que las cadenas polipeptídicas de FGF21 de EFX están plegadas correctamente (Xu et al, 2012). Sin embargo, cabe señalar que la presencia de algunos excipientes como L-lisina y polisorbato 20 en algunas formulaciones que contienen EFX aumenta sustancialmente la absorbancia de fondo en la región del espectro de longitud de onda del UV lejano, particularmente en longitudes de onda inferiores a 195 nm. Dado que esta alta absorbancia de fondo debe restarse del espectro de cada muestra de proteína, la diferencia resultante tiene una señal/ruido pobre y una mayor variabilidad en esta región de longitud de onda ($\lambda < 195$ nm).

Estabilidad conformacional mediante Espectroscopia de Dicroísmo Circular Cercano al UV (CD)

La estructura terciaria de EFX se evaluó mediante CD en UV cercano. Las señales en los espectros CD de proteínas en el UV cercano están asociadas con aminoácidos aromáticos, y con enlaces disulfuro ubicados en entornos conformacionales asimétricos, presentes solo cuando una proteína se pliega en su estructura 3-dimensional distintiva.

Las mediciones espectrales de CD en el UV cercano (250-350 nm) se obtuvieron en un espectrómetro de CD Chirascan Auto Q100 (Applied Photophysics Ltd.). Los espectros se recolectaron a 20 °C con una concentración de proteína de 2,0 mg/mL y una longitud de trayectoria de 5,0 mm. El ancho de banda espectral se estableció en 1,0 nm, el tiempo de muestreo por punto fue de 1,0 segundos y el tamaño del paso fue de 1,0 nm. Se promediaron diez exploraciones consecutivas para

cada medición de una muestra de proteína. Se registró un espectro de referencia del amortiguador de formulación antes de medir la muestra de proteína y se restó del espectro de la muestra. Después de la resta, los valores de CD se convirtieron en valores medios de elipticidad residual ($[\Theta]_{mr}$).

Los espectros CD de UV cercano para EFX en las formulaciones F18 y F33 se muestran en la Figura 26. Los espectros contienen señales significativas de 289 a 292 nm atribuibles a residuos de triptófano, de 270 a 285 nm correspondientes a residuos de tirosina y de 250 a 270 nm atribuibles a residuos de fenilalanina y tirosina superpuestos a una señal disulfuro amplia de 250 a 270 nm. La intensidad de estas características refleja la disposición estructural única de los enlaces disulfuro y los aminoácidos aromáticos dentro de la estructura plegada de EFX. Por ejemplo, si las muestras de EFX estuvieran completamente desplegadas, el espectro será una línea recta alrededor de cero, mientras que la proteína parcialmente desplegada mostrará intensidades disminuidas de las varias señales espectrales, particularmente en la región de 250 a 270 nm asociada con la disposición espacial de los enlaces disulfuro. La forma y la intensidad del espectro CD UV cercano indican que la EFX está plegada en una estructura terciaria bien definida.

Estabilidad Térmica mediante Microcalorimetría de Barrido Diferencial (μ DSC)

La estabilidad térmica de EFX se evaluó mediante microcalorimetría de barrido diferencial (μ DSC) utilizando un sistema MicroCal Auto VP-Capillary DSC (Malvern). Los termogramas se recolectaron utilizando una concentración de proteína de 2,0 mg/mL. Para caracterizar las endotermas asociadas con el despliegue de EFX, se calentaron muestras de formulaciones que contienen EFX o excipientes y amortiguador sin EFX de 10 a 110 °C a una velocidad de 60 °C/h. Para evitar la ebullición de las muestras durante el calentamiento a alta temperatura, se presurizó la celda μ DSC. Se realizó un análisis de referencia cargando las celdas de referencia y de muestra con amortiguador de formulación. El termograma inicial se restó de cada medición de una formulación que contiene EFX. Luego, el valor de la capacidad calorífica excesiva de una muestra se normalizó para la concentración de proteínas. Los valores de temperatura del punto medio de transición térmica (T_m) se determinaron en el centro de los picos o salientes mediante el análisis derivativo del escaneo de calentamiento. Para determinar los valores de los parámetros de

estabilidad térmica, se realizaron análisis de datos y desconvoluciones de picos con el software Origin 7,0 DSC.

Los termogramas representativos para EFX en F18 y F33 se muestran en la Figura 27. Revelan tres picos endotérmicos discretos con valores de T_m respectivos de aproximadamente 33,8-38,8, 62,7-65,1 y 81,1-81,7 °C (Tabla 17). El pico a 65 °C incluye un hombro izquierdo prominente, lo que indica la presencia de dos eventos de despliegue térmico; sin embargo, los dos picos no pudieron resolverse mediante procedimientos de desconvolución. La primera endotermia, a 38,8 °C, que corresponde al despliegue de los dominios FGF21, es totalmente reversible. La Figura 28 muestra un termograma inicial de EFX cuando se calienta a 50 °C, superpuesto con un segundo termograma obtenido después de enfriar a 10 °C y luego recalentar a 50 °C. Los termogramas superponibles de estos dos derretimientos térmicos consecutivos confirman que el primer despliegue (T_{m1} = 38,8 °C) es completamente reversible.

Tabla 17: Resultados de las Mediciones de μ DSC de EFX F18 y F33.

Muestra	resultados de μ DSC			
	T_{m1} [°C]	T_{m2} [°C]	T_{m3} [°C]	ΔH [kcal/mol]
F18	38,8	65,1	81,1	412
F33	33,8	62,7	81,7	408

T_m = temperatura del punto medio de transición térmica. ΔH = cambio de entalpía.

El método μ DSC demostró el inicio del despliegue a aproximadamente 28 °C, lo que sugiere que la EFX es conformacionalmente inestable. A medida que una proteína se desarrolla, los residuos de aminoácidos pueden quedar más expuestos en una superficie externa, lo que podría provocar la desamidación de Asp y Gln y la oxidación de Met, mientras que la exposición de más aminoácidos hidrofóbicos puede desencadenar la agregación de proteínas. Las formulaciones que contienen Arg/Arg-HCl, Glu y Lys parecen mejorar la estabilidad conformacional de EFX, reduciendo así la degradación física, la agregación y la formación de variantes de carga. Las formulaciones que contienen sacarosa también parecen tener mejores propiedades viscoelásticas y estabilidad conformacional y térmica que las que contienen trehalosa.

Ejemplo 5. Proceso de Liofilización

Este ejemplo describe el desarrollo de una formulación que es estable a temperatura ambiente y permite a los pacientes auto-administrarse EFX. Once formulaciones de EFX, incluidas F2, F3, F7, F9, F12, F14, F15, F16, F17, F18 y F33, se liofilizaron en viales y dispositivos de doble cámara. Se evaluaron varios diseños/ciclos (parámetros) de procesos de liofilización para mejorar/optimizar la robustez del proceso, la consistencia de los atributos críticos de calidad (CQA) y la estabilidad a largo plazo a temperatura ambiente. Para garantizar la facilidad de auto-administración por parte de los pacientes, se midió el tiempo para reconstituir el liófilo para varias formulaciones y parámetros establecidos del proceso de liofilización.

Descripción del Proceso de Liofilización

El proceso/ciclo de liofilización por liofilización se varió para evaluar el efecto de los pasos del proceso y los parámetros de rendimiento del proceso en CQA, incluido el tiempo de reconstitución, la apariencia de la torta liofilizada, los conteos de partículas subvisibles después de la reconstitución y la estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo.

Proceso/Ciclo de Liofilización Inicial

Un ejemplo de un proceso de liofilización para viales sin un paso de hibridación se muestra en la Figura 29. Los anaqueles del liofilizador se pre-enfriaron a 5 °C y el ciclo de congelación inicial sigue a -45 °C. Subsecuentemente, el secado primario se realizó a una temperatura del anaquel de -25 °C y una presión de cámara de 0,08 mBar. Durante el secado primario, se aplicó calor al producto para convertir el hielo separado en fases directamente en vapor de agua mediante sublimación. El final del secado primario (indicado con una flecha en la Figura 29) se define como el punto en el que el medidor de capacitancia y el sensor de vacío Pirani están alineados con la temperatura del producto estabilizada por arriba de la temperatura del anaquel. Mientras que el secado primario elimina los cristales de hielo por sublimación, se requiere un secado secundario para eliminar los cristales de hielo unidos al agua EFX por difusión. Si bien el secado secundario ocurre hasta cierto punto durante la sublimación, la tasa de desorción del agua a bajas temperaturas (típicas del secado primario) es baja. Al elevar la temperatura del anaquel a 40 °C durante un ciclo de secado secundario posterior, el agua adsorbida se elimina por completo después de 10 horas.

Desarrollo del Proceso de Liofilización

Se exploraron variaciones del proceso de liofilización. En particular, el ciclo de congelación inicial se adaptó para incluir una paso de hibridación en la que la temperatura del anaquel sube y baja durante el ciclo de congelación. La hibridación tiene dos propósitos diferentes, dependiendo del diseño de la formulación: a) permite el crecimiento de cristales para excipientes cristalizantes separados en fases, y b) aumenta el tamaño de los cristales de hielo a través de la maduración de Ostwald, lo que da como resultado tamaños de poro más grandes, aumentando así la tasa de sublimación durante el secado primario. Los pasos de hibridación en este estudio exploraron la hibridación a -10 °C durante 5 h (Figura 33), la hibridación a -7 °C o -5 °C durante 10 h (no se muestra). Al finalizar el paso de hibridación, los anaqueles se enfriaron a -45 °C y el proceso de liofilización continuó con el paso de secado primario a -25 °C (Figura 30).

Impacto de la Incorporación de un Ciclo de Hibridación en el Proceso de Liofilización en el Tiempo de Reconstitución del EFX Liofilizado

Las tortas de polvo seco liofilizado de formulaciones que contienen EFX se reconstituyeron con agua para inyección y diluyente compuesto basado en la formulación F33. Para facilitar su uso por parte de los pacientes, lo ideal es que el tiempo de reconstitución sea de 5 minutos o menos (aunque esto no es necesario en el contexto de la descripción).

Para tener en cuenta el diferente contenido de sólidos secos de las formulaciones, se realizó una determinación gravimétrica de la pérdida de agua durante la liofilización. Para ello, se pesaron 10 viales de cada formulación antes y después de la liofilización y se calculó la pérdida de agua. Subsecuentemente, se utilizó el volumen determinado de agua para inyección para reconstituir las tortas de polvo seco. Se añadió agua al centro de los cierres del recipiente (vial o dispositivo de cámara dual, DCD) usando una pipeta. Se agitó cuidadosamente el cierre del recipiente (se evitó agitación). Se registró el tiempo necesario para que la torta liofilizada se reconstituyera completamente (horas: minutos: segundos o minutos: segundos).

Al finalizar el proceso de liofilización sin un paso de hibridación (Figura 29), se registraron los tiempos de reconstitución para diez formulaciones liofilizadas correspondientes a 100 mg/mL de EFX, incluidas F2, F3, F7, F9, F12, F14, F15, F16,

F17 y F18, véase la Figura 31.

Los tiempos de reconstitución medidos de las diez formulaciones seleccionadas variaron ampliamente, desde 1 hora: 20 min: 58 segundos para F2 hasta 7 min: 55 segundos para F16, lo que indica dependencia de la composición y el pH de las formulaciones. En particular, los tiempos de reconstitución fueron significativamente más largos en formulaciones como F2, en las que EFX es susceptible de formar redes de gel estructuradas con el tiempo. Estas formulaciones se caracterizan por altas viscosidades (Figura 4) y comportamiento no Newtoniano (Figura 5). También fueron evidentes tiempos de reconstitución más prolongados con formulaciones compuestas a un pH por debajo del punto isoeléctrico de EFX.

La incorporación de un paso de hibridación en el proceso de liofilización (Figura 30) mejoró significativamente la estructura de la torta liofilizada al disminuir el área de superficie específica (tortas menos densas) y maximizar el área del tamaño de los poros (Figura 37), y aceleró la reconstitución en aproximadamente un 50% para una formulación dada, por ejemplo, F33, en viales (Figura 32) y dispositivos de doble cámara (Figura 33).

Área de Superficie Específica (BET)

El efecto de un paso de hibridación sobre la estructura de la torta liofilizada se evaluó mediante análisis BET de área de superficie específica. El área de superficie específica de las formulaciones liofilizadas seleccionadas se analizó mediante el método BET (teoría de Brunauer, Emmett y Teller) utilizando un Autosorb-1 (Quantachrome Instruments). El método BET es el procedimiento más utilizado para la determinación del área de superficie de materiales sólidos y utiliza la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{W \left(\left(\frac{p_0}{p} \right) - 1 \right)} = \frac{1}{W_m * C} + \frac{C-1}{W_m * C} \left(\frac{p}{p_0} \right)$$

W : peso de gas adsorbido a una presión relativa (p/p_0) [g];

p : presión de vapor parcial [Pa] del gas adsorbato en equilibrio con la superficie a -195,85 °C (77,3 Kelvin);

p_0 : presión saturada [Pa] del gas adsorbato;

W_m : peso del adsorbato que constituye una monocapa de cobertura de superficie [g];

C : constante BET, está relacionada con la energía de adsorción en la

primera capa adsorbida.

La ecuación BET requiere una gráfica lineal de $1/[W(p_0/p)-1]$ contra p/p_0 que, para la mayoría de los sólidos, está restringida a una región limitada de la isoterma de adsorción, en general en el rango de p/p_0 de 0,05 a 0,35. El procedimiento BET multipunto estándar requiere un mínimo de tres puntos en el rango de presión relativa apropiado.

El peso (W_m) de la monocapa se puede obtener a partir de la(s) pendiente(s) y la intersección (i) del gráfico de BET:

$$W_m = \frac{1}{s + i}$$

El segundo paso en la aplicación del método BET es el cálculo de la superficie. Esto requiere conocimiento del área de la sección transversal molecular (A_{cs}) de la molécula de adsorbato. El área de superficie total (St) de la muestra se puede expresar como:

$$St = \frac{W_m * N * A_{cs}}{M}$$

N : Número de Avogadro ($6,0221415 \times 10^{23}$ moléculas/mol)

M : Masa molecular del adsorbato [g/mol]

El área de superficie específica (S) [m^2/g] de sólido se puede calcular a partir del área de superficie total (St [m^2]) y el peso de la muestra (w [g]):

$$S = St/w$$

Preparación y análisis de muestra

Se trituraron cuidadosamente aproximadamente 100 mg de producto liofilizado en trozos pequeños con una espátula y se transfirieron al recipiente de medición. Antes de medir el área por adsorción de criptón, todo el gas adsorbido del medio ambiente debe eliminarse de la superficie de la muestra. Se conectó el recipiente de medición a una estación desgasificadora y se conectó el vacío. Se interrumpió el vacío después de 16 horas de desgasificación a temperatura ambiente.

Subsecuentemente se llenaron los recipientes de medición (celdas) durante unos 5 segundos con helio (0,7 – 1,0 bar). La adsorción de criptón se midió a una temperatura del baño de $-195,8^\circ\text{C}$ (77,3 K). Se recolectaron siete puntos de datos que cubren la región p/p_0 de 0,05 a 0,35. El $1/[W^*(p_0/p)-1]$ se trazó contra p/p_0 .

El Área de Superficie Específica (BET) de la torta liofilizada producida a partir de la formulación F33, con y sin pasos de hibridación incorporados al proceso de

liofilización, se presenta en la Figura 34. Los valores numéricos para el Área de Superficie Específica fueron 50% y 75% menores, respectivamente, para tortas producidas usando un paso de hibridación de -5 °C durante 10 horas (diseño de proceso A1) o -10 °C durante 5 horas (diseño de proceso A2) en comparación con las tortas producidas sin un paso de hibridación durante la liofilización (diseño de proceso NA), véase Figura 34. Los datos demuestran que la incorporación de un paso de hibridación en el proceso de liofilización disminuye significativamente el área de superficie específica de la torta resultante (tortas menos densas), lo que se asocia con tiempos de reconstitución significativamente más cortos, como para F33. (Figuras 33A y 33B).

Evaluación de la Morfología y Estructura de Tortas Liofilizadas Mediante Microscopio Electrónico de Barrido con Espectroscopia de Rayos X de Dispersión de Energía (SEM-EDX)

La morfología de la formulación liofilizada que contiene EFX se analizó mediante el método SEM-EDX, utilizando un sistema JSM-IT 200 (Jeol). La preparación de la muestra se realizó en una caja de guantes con humedad controlada ($\leq 10\%$ de rh). Se contó el número de poros en la torta liofilizada, así como el área de poros utilizando la señal del detector de electrones secundario (SED). La tensión de aterrizaje y la corriente de la sonda se fijaron en 5 kV y 20%, respectivamente. Todas las mediciones se realizaron bajo alto vacío no controlado después de 20 minutos de equilibrio. Se ajustaron el brillo y el contraste para lograr un alto contraste en las imágenes resultantes. La enumeración de poros y la cuantificación del área de los poros se realizaron utilizando el software de análisis de partículas Jeol V3. Para identificar los poros se aplicó una binarización de dos niveles (conversión de una imagen multitono a blanco y negro), basada en el valor de brillo de las imágenes adquiridas (que se ajustó para cada muestra). Se excluyeron del análisis los poros con un área inferior a $20 \mu\text{m}^2$.

Los análisis SEM también se completaron utilizando el microscopio electrónico de barrido (SEM) de mesa Phenom (Phenom-World BV). El instrumento está equipado con una cámara CCD y una bomba de vacío de diafragma. Se confirmó la iluminación de la muestra, así como la resolución de las partículas esféricas de la muestra de referencia.

Para recuperar la torta liofilizada, se cortaron viales de vidrio que

contienen la torta horizontalmente por la mitad usando un Micromot 50/E equipado con una muela de diamante, Proxxon. Se prepararon rebanadas horizontales y verticales de torta liofilizada usando una hoja de afeitar, como se muestra en la Figura 35.

Las rebanadas se colocaron sobre cemento conductor de carbono en un retenedor de muestras, presentando el corte de la sección transversal como la superficie superior como se lista en la Tabla 18.

Tabla 18: Generalidades de las secciones de torta liofilizada analizada por SEM-EDX.

Número de Sección	Descripción
I	Parte superior de la torta liofilizada
II	corte horizontal
III	corte vertical
IV	Fondo de la torta liofilizada

Las tortas de polvo seco EFX se analizaron al vacío con un aumento óptico de luz de 20 x y un voltaje de aceleración de 5 kV. El aumento óptico de los electrones se ajustó entre 340x y 10,000x, y se recolectaron imágenes de secciones representativas de cada muestra. El aumento más bajo dependía de la altura de la muestra y de la posición dentro del SEM.

Los diagramas de caja y bigotes de la distribución del área de poros de las secciones transversales de las tortas liofilizadas producidas a partir de la formulación F33 se muestran en la Figura, con y sin un paso de hibridación en el proceso de liofilización y analizadas por SEM-EDX. 36. Las distribuciones más amplias del área de los poros son evidentes en las tortas producidas mediante liofilización con un paso de hibridación en comparación con un proceso sin un paso de hibridación.

Consistente con esto, las imágenes SEM en la Figura 37 demuestran que la incorporación de un paso de hibridación en el proceso de liofilización mejora significativamente la estructura y morfología de la torta de polvo seco al disminuir el área de superficie específica (tortas menos densas) y maximizar el tamaño de los poros, lo que facilita los pasos de secado primario y secundario del proceso y mejorando los tiempos de reconstitución.

Ejemplo 6: Estabilidad a Largo Plazo de Formulaciones Liofilizadas de EFX Almacenadas en Condiciones de Estrés

Se seleccionaron formulaciones liofilizadas en el rango de pH 7,3-7,8 (F15, F16, F17 y F33) y se almacenaron en condiciones de temperatura ambiente (25 °C/60% de humedad relativa). Para evaluar la estabilidad después del almacenamiento durante hasta 12 meses, las formulaciones se evaluaron frente a un panel de pruebas empleadas para la liberación de control de calidad del fármaco EFX. La Figura 38 resume los datos de las pruebas indicativas de la estabilidad a largo plazo de EFX liofilizado a 25 °C en las Formulaciones F15, F16, F17 y F33.

Comparación de variantes de carga, variantes de tamaño (agregación, recorte/fragmentación), formación de partículas subvisibles por MFI y potencia celular de EFX en las 4 formulaciones en el tiempo cero, tres meses, seis meses (no se muestra), nueve meses y 14 meses, los datos demostraron esencialmente ningún cambio o un cambio mínimo, lo que permite la variabilidad del método, en los valores numéricos de los atributos críticos del producto a lo largo del tiempo para formulaciones liofilizadas, incluido F33, dentro de este rango de pH.

El proceso de liofilización que incorpora un paso de hibridación en el ciclo de congelación no solo mejoró la solidez del proceso, sino que también dio como resultado atributos consistentes del producto, estabilidad a largo plazo en varias condiciones, incluida la temperatura ambiente, así como una rápida reconstitución que permitió una fácil autoadministración por parte de los pacientes.

Estas observaciones fueron aplicables no solo a EFX liofilizada en la formulación más estable F33, sino también a otras formulaciones que previamente han demostrado tasas significativas de formación de variantes de carga, variantes de tamaño (HMWS y LMWS) y partículas subvisibles cuando se almacenaban como líquido en refrigeración, y condiciones de temperatura ambiente.

Ejemplo 7: Concentraciones en Suero de EFX

Se examinaron los parámetros de farmacocinética de varias formulaciones *in vivo*. Cada animal de los Grupos 1-7 recibió una única dosis subcutánea (SC) (volumen de 5 mL/kg) de la formulación adecuada del material de prueba, incluido EFX. Los detalles de la formulación de EFX administrada a cada grupo se proporcionan en la Tabla 19. Cada grupo incluía nueve mujeres y la dosis administrada a cada sujeto fue de 100 mg/kg.

Tabla 19: Formulaciones utilizadas en el estudio

Grupo	Formulación	Viscosidad (cP a 20 °C)
1	20 mM de Tris-HCl, 120 mM de sacarosa, 120 mM de arginina/arginina-HCl, 0,06% en p/v de polisorbato 20, pH 7,3 $\pm$ 0,3 en Agua Estéril para Inyección.	1,9
2	20 mM de glutamato de Na/ácido glutámico, 200 mM de trehalosa, 40 mM de Lys-HCl, 0,04% de polisorbato 20 (inicia en 0,008% en p/v), pH 5,5 (F4)	9920
3	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 220 mM de trehalosa, 0,04% de polisorbato 20 (inicia en 0,008% en p/v), pH 5,5 (F7)	9279
4	20 mM de succinato de Na/ácido succínico, 220 mM de sacarosa, 0,04% de polisorbato 20 (inicia en 0,008% en p/v), pH 5,5 (F9)	3878
5	20 mM de Histidina, 220 mM de trehalosa, 0,04% de polisorbato 20 (inicia en 0,008% en p/v), pH 6,0 (F11)	>límite superior del instrumento
6	20 mM de Tris-HCl, 80 mM de Arg/Arg-HCl, 80 mM de sacarosa, 0,5% de Na-CMC, 0,06% en p/v de polisorbato 20, pH 7,3	5,06
7	20 mM de Tris-HCl, 80 mM de Arg/Arg-HCl, 80 mM de sacarosa, 0,5% de PEG-4000, 0,06% en p/v de polisorbato 20, pH 7,3	1,94

La concentración de EFX en varios momentos posteriores a la administración se ilustra en la Figura 39. La Figura 40 proporciona un sumario de los parámetros de farmacocinética indicativos de la exposición sistémica general (AUC), proporcionando una indicación de la biodisponibilidad, así como la concentración más alta en la circulación sistémica (C_{máx}). De manera sorprendente, el PEG (concretamente PEG 4000) aumentó la exposición/biodisponibilidad sistémica después de la inyección subcutánea, a pesar de no estar conjugado covalentemente con EFX.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en esta especificación se incorporan aquí como referencia como si cada publicación o

solicitud de patente individual estuviera específica e individualmente indicada para incorporarse como referencia. Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para mayor claridad de comprensión, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta descripción que ciertos cambios y modificaciones pueden hacerse al mismo sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas.