

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 832**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2003** **E 08006091 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017** **EP 1946776**

54 Título: **Composición TNFR-FC estabilizada que comprende arginina**

30 Prioridad:

27.02.2002 US 360257 P

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

22.06.2017

73 Titular/es:

**IMMUNEX CORPORATION (100.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**GOMBOTZ, WAYNE, R. y
REMMELE, RICHARD, L. JR.**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 618 832 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición TNFR-FC estabilizada que comprende arginina

Esta aplicación reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de U.S. No. 60/360,257, archivada el 27 de febrero de 2002.

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con una composición farmacéutica acuosa adecuada para almacenamiento a largo plazo de polipéptidos que contienen una forma soluble del receptor p75 TNF fusionado a un dominio, métodos de fabricación de la composición, uso de la composición en un método de tratamiento y kit que contienen el mismo.

Antecedentes

10 El documento WO 00/62790 A2 (Immunex Corporation) divulga métodos para tratar trastornos médicos caracterizados por elevados niveles de expresión anormal de TNF- α administrando un antagonista TNF- α tal como un TNFR:Fc recombinante.

El documento WO 01/43773 A1 (Genentech Inc.) divulga métodos para el tratamiento de un trastorno mediado LFA-1 o un trastorno mediado TNF- α por administración, respectivamente, un antagonista LFA-1 o un antagonista TNF- α .
 15 El documento WO 01/43773 A1 también divulga etanercept liofilizado (ENBREL®), una proteína de fusión que comprende p75 humano unido a la porción Fc de IgG1 humana, reconstituida en agua bacteriostática; y el uso de esta composición reconstituida en el tratamiento, entre otros, de la artritis.

Después de la producción, los polipéptidos deben almacenarse típicamente antes de su uso. Frecuentemente, cuando se almacenan durante períodos prolongados, los polipéptidos son inestables en solución (Manning et al., 1989, Pharm Res. 6: 903 - 918). Por consiguiente, se han desarrollado pasos de procesamiento adicionales para permitir una vida de almacenamiento más larga incluyendo el secado, por ejemplo, la liofilización. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas liofilizadas son menos convenientes para el usuario final.
 20

Las prácticas típicas para mejorar la estabilidad del polipéptido se pueden resolver variando la concentración de elementos con la formulación, o añadiendo excipientes para modificar la formulación (Patentes U.S. Nos. 5.580.856 y 6.171.586). El uso de aditivos, al tiempo que mejora el almacenamiento, puede dar como resultado polipéptidos inactivos. Además, en el caso de la liofilización, la etapa de rehidratación puede introducir condiciones que resultan en la inactivación del polipéptido, por ejemplo, por agregación o desnaturalización (Hora et al., 1992, Pharm Res., 9: 33-36, Liu Et al., 1991, Biotechnol., Bioeng., 37: 177 - 184). De hecho, la agregación de polipéptidos es indeseable ya que puede resultar en inmunogenicidad (Cleland et al., 1993, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems, 10: 307 - 377 y Robbins et al., 1987, Diabetes, 36: 838 -845).
 25
 30

La presente invención aborda estas cuestiones proporcionando una nueva formulación líquida estable que permite el almacenamiento a largo plazo de un polipéptido que contiene una forma soluble del receptor de p75 TNF fusionado a un dominio Fc.

Resumen

35 La invención se refiere, en parte, a una composición farmacéutica acuosa estable que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una forma soluble del receptor p75 TNF fusionado a un dominio Fc y, un inhibidor de agregación, en el que el inhibidor de agregación es L-arginina.

Opcionalmente, la composición puede incluir un amortiguador, un modificador de la tonicidad y uno o más excipientes. En un aspecto, el amortiguador mantiene el pH de la composición en un intervalo de aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0. Preferiblemente, el dominio Fc que contiene polipéptido es estable en la presente formulación por al menos tres meses a 2-8°C y/o es estable después de uno o más ciclos de congelación y descongelación de la formulación.
 40

La invención también se refiere a un método de formulación de una composición farmacéutica que comprende combinar una forma soluble del receptor de p75 TNF fusionado a un dominio Fc con L-arginina. Opcionalmente, también se puede añadir a la composición farmacéutica un amortiguador, un modificador de la tonicidad y/o un excipiente. En un aspecto, la composición farmacéutica se formula a un intervalo de pH entre pH 6,0 y 7,0.
 45

La invención también se relaciona con la composición farmacéutica de la invención para uso en un método de tratamiento de un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica descrita aquí, en la que el mamífero tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse beneficiosamente con una forma soluble del receptor de p75 TNF fusionado a un dominio Fc en la composición.
 50

En otra realización, la presente invención se refiere a un kit o recipiente, que contiene una composición farmacéutica acuosa de la invención. El kit también puede ir acompañado de instrucciones para uso

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) datos para los lotes A, B, C y D, y el lote 1 almacenado por hasta 1 año a 2-8°C.

Figura 2: SEC datos para los lotes A, B, C y D, y el lote 1 almacenado por hasta 1 año a 37°C.

5 Figura 3: SEC desnaturalizado (dSEC) datos para los lotes A, B, C y D, y el lote 1 almacenado por hasta 1 año a 2-8°C.

Figura 4: dSEC datos para los lotes A, B, C y D, y el lote 1 almacenado por hasta 1 año a 37°C.

Figura 5: Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) Pico 1 y Pre-pico 1 datos para los lotes A, B, C y D, y el lote 1 almacenado por hasta 1 año a 2-8°C.

10 Figura 6: HIC Pico 1 y Pre-pico 1 datos para los lotes A, B, C y D, y el lote 1 almacenado por hasta 1 año a 37°C.

Figura 7: HIC Pico 2 datos para los lotes A, B, C y D, y el lote 1 almacenado por hasta 1 año a 2-8°C.

Figura 8: HIC Pico 2 datos para los lotes A, B, C y D, y el lote 1 almacenado por hasta 1 año a 37°C.

Figura 9: HIC Pico 3 datos para los lotes A, B, C y D, y el lote 1 almacenado por hasta 1 año a 2-8°C.

Figura 10: HIC Pico 3 datos para los lotes A, B, C y D, y el lote 1 almacenado por hasta 1 año a 37°C.

15 Figura 11: Actividad de unión de lotes A, B, C y D, y el lote 1 almacenado por 12 meses a -70, 2-8, 30, y 37°C.

Figura 12: Bioactividad de los lotes A, B, C y D, y el lote 1 almacenado por 12 meses a -70, 2-8, 30, y 37°C.

Descripción detallada

20 En el almacenamiento a largo plazo de composiciones farmacéuticas que contienen polipéptidos, que incluyen formulaciones acuosas y liofilizadas, los polipéptidos activos se pueden perder debido a la agregación y/o degradación. Por lo tanto, la presente invención está dirigida a una formulación acuosa que sorprendentemente permite el almacenamiento a largo plazo estable de una composición farmacéutica en la que el ingrediente activo en la composición es una forma soluble del receptor de p75 TNF fusionado a un dominio Fc.

Esta formulación es útil, en parte, porque es más conveniente para usar para el paciente, ya que esta formulación no requiere ningún paso adicional tal como la rehidratación.

25 Como se usa aquí, la frase "composición farmacéutica" se entiende que hace referencia a una formulación compuesta de un polipéptido preparado de tal manera que es adecuado para inyección y/o administración en un paciente en necesidad de las mismas. Más particularmente, una composición farmacéutica es sustancialmente estéril y no contiene agentes que sean indebidamente tóxicos o infecciosos para el receptor. Además, debe entenderse que, tal como se usa aquí, una solución o formulación líquida indica una preparación líquida que contiene una o más sustancias químicas disueltas en un solvente adecuado o una mezcla de solventes mutuamente miscibles.

30 Además, como se usa aquí, se entiende que el término "aproximadamente" indica que puede haber variación en la concentración de un componente de la formulación descrita que puede ser del 5%, 10%, 15% o hasta e incluyendo 20% del valor dado. Por ejemplo, si una formulación tiene aproximadamente 10 mg/ml de un dominio Fc que contiene polipéptido, se entiende que indica que una formulación puede tener entre 8 a 12 mg/ml del polipéptido declarado.

35 En una realización, la formulación está compuesta de una forma soluble del receptor de p75 TNF fusionado a un dominio Fc, un inhibidor de agregación seleccionado de L-arginina y, opcionalmente, un amortiguador, un modificador de tonicidad y excipientes adicionales según sea necesario. La L-arginina se ha usado para ayudar a replegar polipéptidos insolubles, particularmente aquellos expresados a altos niveles en cuerpos de inclusión en bacterias. Sin embargo, la L-arginina no se ha usado exitosamente para mejorar la estabilidad del dominio Fc que contiene polipéptidos en composiciones farmacéuticas (Soejima et al., 2001, J. Biochem., 130: 369-277).

40 Se contempla que la preparación de la composición debe hacerse considerando la limitación de la incomodidad en el sitio de inyección. Se contempla adicionalmente que también se pueden incluir ingredientes activos adicionales en la composición descrita actualmente, por ejemplo, para reducir la incomodidad en el sitio de inyección. Tales ingredientes activos incluyen, pero no están limitados a fármacos antiinflamatorios no esteroideos tales como, por ejemplo, trometamina, en una dosificación apropiada.

45 Polipéptidos

El dominio Fc que contiene polipéptido es una forma soluble del receptor p75 NF fusionado a un dominio Fc (TNFR:Fc).

Un TNFR:Fc comercialmente disponibles es conocido como etanercept (Enbrel®, Immunex Corporation), que es un polipéptido de fusión dimérico que consiste en la porción de unión al ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral de 75 kilodaltons (p75) humano (TNFR) unido a la porción Fc de la IgG1 humana. El componente Fc de etanercept contiene el dominio pesado 2 (CH2) constante, el dominio pesado 3 (CH3) y la región bisagra, pero no el dominio pesado 1 (CH1) constante de la IgG1 humana.

Se produce Etanercept por tecnología de ADN recombinante en un sistema de expresión de células de mamífero de ovario de hámster chino (CHO). Consiste en 934 aminoácidos y tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilodaltons (Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc.).

Otros polipéptidos adecuados para uso en la presente formulación incluyen antígenos de diferenciación (denominados polipéptidos CD) o sus ligandos o polipéptidos sustancialmente similares a cualquiera de estos, que están fusionados a un dominio Fc de un anticuerpo. Dichos antígenos son divulgados en Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japón, 1996). Polipéptidos CD similares son divulgados en talleres posteriores. Los ejemplos de dichos antígenos también incluyen CD27, CD30, CD39, CD40, y ligandos para los mismos (ligando CD27, ligando CD30, etc.). Varios de los antígenos CD son miembros de la familia del receptor TNF, que también incluyen ligando 41BB y OX40. Los ligandos son usualmente miembros de la familia TNF, como son el ligando 41BB y el ligando OX40. Por consiguiente, se pueden formular los miembros de las familias TNF y TNFR como se describe aquí.

Los polipéptidos activos enzimáticamente o sus ligandos también se pueden formular como se describió aquí. Los ejemplos incluyen polipéptidos de fusión recombinante que comprenden un dominio Fc de un anticuerpo fusionado a todo o parte de uno de los siguientes polipéptidos o sus ligandos o un polipéptido sustancialmente similar a uno de estos: miembros de la familia de la metaloproteínasa-desintegrina, diversas quinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, activador del plasminógeno tisular, Factor VIII, Factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína AI, globinas, un antagonista de IL-2, alfa-1-antitripsina, enzima de conversión TNF-alfa, ligandos para cualquiera de las enzimas anteriormente mencionadas, y numerosas otras enzimas y sus ligandos.

Las formulaciones y métodos como se describen aquí también se pueden usar para preparar composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, es decir, anticuerpos que tienen dominios de inmunoglobulina de anticuerpo constante humanos acoplados a uno o más dominios de inmunoglobulina de anticuerpo variable murino, y/o anticuerpos no humanos, o fragmentos de los mismos. Los ejemplos específicos de anticuerpos adecuados para uso en la presente formulación incluyen anticuerpos disponibles comercialmente tales como muromonab-CD3 (Orthoclone OKT-3®, Ortho Biotech), abciximab (Reo-Pro®, Lilly), rituximab (Rituxan®, IDEC), dacliximab (Zenapax®, Roche Laboratories), basiliximab (Simulect®, Novartis), infliximab (Remicade®, Centocor), palivizumab (Synagis®, MedImmune), trastuzumab (Herceptin®, Genentech), ozogamicina gemtuzumana (Mylotarg™, Wyeth-Ayerst) y alemtuzumab (Campath®, Berlex). Actualmente cada uno de los anteriores está disponible ya sea como un polvo liofilizado que requiere rehidratación o como un concentrado que requiere dilución antes de la administración. La presente formulación obvia la necesidad de cualquier manipulación antes de la administración, por ejemplo, rehidratación o dilución, mientras se preserva la estabilidad de los ingredientes activos sobre almacenamiento de largo plazo.

La composición farmacéutica como se describe aquí también puede ser usada para almacenar polipéptidos que comprenden un anticuerpo conjugado a una sustancia citotóxica o luminiscente. Dichas sustancias incluyen: derivados de maitansina (tales como DM1); enterotoxinas (tales como enterotoxinas estafilocócicas); isótopos de yodo (tales como yodo-125); isótopos de tecnecio (tales como Tc-99m); fluorocromos de cianina (tales como Cy5.5.18); y polipéptidos que inactivan ribosomas (tales como la bouganina, la gelonina o la saporina-S6).

Los ejemplos de anticuerpos o anticuerpo/citotoxina o conjugados de anticuerpo/luminóforo incluyen aquellos que reconocen uno o más de los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, receptor IL-2, receptor IL-4, receptor IL-6, receptor IL-13, PDGF-β, VEGF, TGF, TGF-β2, TGF-β1, receptor EGF, receptor VEGF, complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, LCG (que es un producto de gente que se expresa en asociación con cáncer de pulmón), HER-2, una glicoproteína TAG-72 asociada al tumor, el antígeno SK-1, epítomos asociados al tumor que están presentes en niveles elevados en los sueros de pacientes con cáncer de colon y/o pancreático, epítomos o polipéptidos asociados a cáncer expresados en células de cáncer de mama, de colon, de células escamosas, de próstata, de páncreas, de pulmón y/o de riñón y/o en melanoma, glioma o células de neuroblastoma, Los receptores 1, 2, 3 y 4 de TRAIL, el núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, la integrina VLA-4, integrinas B2, TNF-α, la molécula de adhesión VAP-1, la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), molécula de adhesión intercelular-3 (ICAM-3), adhesina de leucointegrina, la glicoproteína plaquetaria gp IIb/IIIa, cadena pesada de miosina cardíaca, hormona paratiroidea, rNAPc2 (que es un inhibidor del factor VIIa-factor tisular), MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), CTLA-4 (que es un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos), receptor Fc-γ-1, antígeno HLA-DR 10 -selectina, IFN-γ, virus sincitial respiratorio, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de hepatitis B (VHB), Streptococcus mutans y Staphylococcus aureus.

También se pueden usar las formulaciones para anticuerpos anti-idiotípicos, o polipéptidos sustancialmente similares, que incluyen pero no están limitados a anticuerpos anti-idiotípicos contra: un anticuerpo dirigido al antígeno tumoral gp72; un anticuerpo contra el gangliósido GD3; o un anticuerpo contra el gangliósido GD2.

5 El dominio Fc que contiene polipéptidos adecuados para almacenamiento en la presente composición farmacéutica se pueden producir mediante células anfitrionas vivientes que expresan el polipéptido, tal como hibridomas en el caso de anticuerpos, o células anfitrionas que han sido diseñadas genéticamente para producir el polipéptido en el caso de polipéptidos o anticuerpos de fusión. Los métodos de ingeniería genética celular para producir polipéptidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds. (1990), *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, Nueva York). Dichos métodos incluyen introducir ácidos nucleicos para codificar y permitir expresión del polipéptido en las células anfitrionas vivientes. Estas células anfitrionas pueden ser células bacterianas, células fúngicas, o, preferiblemente, células animales cultivadas en cultivo. Las células anfitrionas bacterianas incluyen, pero no están limitadas a, células de *Escherichia coli*. Los ejemplos de cepas de *E. coli* adecuadas incluyen: HB101, DH5 α , GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, y cualquier cepa de *E. coli* que falla en escindir ADN foráneo. Las células anfitrionas fúngicas que pueden ser usadas incluyen, pero no están limitadas a, células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Aspergillus*. Algunos ejemplos de líneas de células animales que se pueden usar son CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, y WI38. Las líneas de células animales nuevas se pueden establecer usando métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica (por ejemplo, por transformación, infección viral, y/o selección). Opcionalmente, el polipéptido puede ser secretado por células anfitrionas en el medio.

20 La purificación del dominio Fc expresado que contiene el polipéptido se puede realizar por cualquier método estándar. Cuando el dominio Fc que contiene polipéptido se produce intracelularmente, los residuos en forma de partículas se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el polipéptido se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se pueden concentrar primero usando filtros de concentración de polipéptidos estándar. También se pueden añadir inhibidores de proteasa para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de microorganismos.

25 Se puede purificar el dominio Fc que contiene el polipéptido usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, y cualquier combinación de técnicas de purificación conocidas o aún por descubrir. Por ejemplo, se puede usar la proteína A para purificar el dominio Fc que contienen el polipéptido que están basados en cadenas pesadas gamma 1, gamma 2 o gamma 4 humanas (Lindmark et al., 1983, *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para gamma 3 humano (Guss et al., 1986, *EMBO J.* 5: 1567-1575).

35 También se pueden usar tras técnicas para la purificación de polipéptidos tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSETM, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatofoco, SDS - PAGE, y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo de la necesidad.

Composición farmacéutica

40 La presente composición farmacéutica está preparada por combinación, adicionalmente al polipéptido purificado descrito anteriormente, un inhibidor de agregación. Además, se pueden añadir según sea necesario un amortiguador, un modificador de tonicidad y un excipiente adicional. Alguien de experiencia ordinaria en la técnica entenderá que se puede hacer en cualquier orden apropiado la combinación de diferentes componentes que van a ser incluidos en la composición, es decir, se puede añadir primero el amortiguador, en la mitad o de último y el modificador de tonicidad también se puede añadir primero, en la mitad o de último. Alguien de experiencia ordinaria en la técnica también debe entender que alguna de estas sustancias químicas puede ser incompatible en ciertas combinaciones, y por consiguiente, son constituidas fácilmente con diferentes sustancias químicas que tienen propiedades similares pero son compatibles en la mezcla relevante.

50 Los inhibidores de agregación reducen la tendencia de un polipéptido a asociarse en complejos ternarios o cuaternarios inadecuados o no deseados. Inesperadamente, los presentes inventores han encontrado que los aminoácidos L-arginina y/o L-cisteína actúan para reducir la agregación del dominio Fc que contiene polipéptido en una formulación por largos períodos, por ejemplo dos años o más. La concentración del inhibidor de la agregación en la formulación está preferiblemente entre aproximadamente 1 mM a 1M, más preferiblemente aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, más preferiblemente aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, aún más preferiblemente aproximadamente 15 mM a aproximadamente 75 mM, y aún más preferiblemente aproximadamente 25 mM. Estos compuestos están disponibles de proveedores comerciales.

55 Los agentes de amortiguación mantienen el pH en un intervalo deseado y diversos amortiguadores adecuados para uso en la composición farmacéutica de la invención incluyen histidina, fosfato de potasio, citrato de sodio o potasio, ácido maleico, acetato de amonio, tris-(hidroximetil)-aminometano (tris), diversas formas de acetato y dietanolamina. Un amortiguador preferido es fosfato de sodio ya que su capacidad de amortiguación está en o cerca del pH 6,2. La concentración del amortiguador en la formulación está preferiblemente entre aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1 M, más preferiblemente aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM. Los

amortiguadores son bien conocidos en la técnica y son fabricados por métodos conocidos y disponibles de proveedores comerciales.

5 Cuando el pH de la composición farmacéutica se establece en o cerca de los niveles fisiológicos, se maximiza la comodidad del paciente tras la administración. En particular, se prefiere que el pH esté dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5,8 a 8,4, prefiriéndose aproximadamente 6,2 a 7,4, sin embargo, debe entenderse que el pH puede ajustarse según sea necesario para maximizar la estabilidad y solubilidad del polipéptido en una formulación particular y como tal, está dentro del alcance de la invención un pH fuera de intervalos fisiológicos, pero tolerable para el paciente.

10 Se entiende que un modificador de tonicidad es una molécula que contribuye a la osmalidad de una solución. La osmalidad de una composición farmacéutica está regulada preferiblemente con el fin de maximizar la estabilidad del ingrediente activo y también disminuir la incomodidad del paciente tras de administración. Cuando el suero es aproximadamente 300 +/- 50 milliosmolales por kilogramo. Se prefiere generalmente que una composición farmacéutica sea isotónica con suero, es decir, que tiene la misma o similar osmalidad, que se logra por adición de un modificador de tonicidad, por lo tanto se contempla que la osmalidad estará desde aproximadamente 180 a 15 aproximadamente 420 milliosmolales, sin embargo, se debe entender que la osmalidad puede ser ya sea menor o mayor cuando las condiciones específicas lo requieren. Los ejemplos de modificadores de tonicidad adecuados para modificar osmalidad incluyen, pero no están limitados a aminoácidos (por ejemplo, arginina, cisteína, histidina y glicina), sales (por ejemplo cloruro de sodio, cloruro de potasio y citrato sódico) y/o sacáridos (por ejemplo sacarosa, glucosa y manitol). La concentración del modificador de tonicidad en la formulación está preferiblemente entre 20 aproximadamente 1 mM a 1M, más preferiblemente aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM. Los modificadores de tonicidad son bien conocidos en la técnica y son fabricados por métodos conocidos y disponibles de proveedores comerciales.

25 Los excipientes, también indicados como aditivos químicos, co-solutos, o co-solventes, que estabilizan el polipéptido mientras está en solución (también en formas secas o congeladas) también se pueden añadir a una composición farmacéutica. los ejemplos incluyen pero no están limitados a azúcares/poliolos tales como: sacarosa, lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa; polímeros tales como: albúmina de suero (albúmina de suero bovino (BSA), SA humana o HA recombinante), dextrano, PVA, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polietilenimina, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC); solventes no acuosos tales como: alcoholes polihídricos, (por ejemplo, PEG, etilenglicol y glicerol) dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF); 30 aminoácidos tales como: prolina, L-serina, ácido glutámico sódico, alanina, glicina, clorhidrato de lisina, sarcosina y ácido gamma-aminobutírico; tensioactivos tales como: Tween-80, Tween-20, SDS, polisorbato, copolímero de polioxietileno; y diversos excipientes tales como: fosfato de potasio, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, N-óxido de trimetilamina, betaína, iones metálicos (por ejemplo, zinc, cobre, calcio, manganeso y magnesio), CHAPS, monolaurato, 2-O-beta-manoglicerato o cualquier combinación de los anteriores.

35 La concentración de uno o más excipientes en una formulación de la invención está preferiblemente entre aproximadamente 0,001 a 5 por ciento en peso, de manera más preferible aproximadamente 0,1 a 2 por ciento en peso. Los excipientes son bien conocidos en la técnica y son fabricados por métodos conocidos y disponibles de proveedores comerciales.

40 En una realización ilustrativa, una formulación de la invención puede comprender aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg de una forma soluble del receptor p75 TNF fusionado a un dominio Fc (etanercept), aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM de L-arginina, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de fosfato de sodio, aproximadamente 0,75% a aproximadamente 1,25% de sacarosa, aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM de NaCl, en aproximadamente pH de 6,0 a aproximadamente pH de 7,0. En otra realización, la L-arginina puede reemplazarse con L-cisteína (en aproximadamente 1 a aproximadamente 500 45 micromolar) en la formulación. En aún otra realización, el pH puede ser de aproximadamente pH de 7,0. En otra realización específica, una formulación de la invención puede comprender aproximadamente 25 mg/ml de una forma soluble del receptor p75 TNF fusionado a un dominio Fc, aproximadamente 25 mM de L-arginina, aproximadamente 25 mM de fosfato sódico, aproximadamente 98 mM de cloruro sódico, y aproximadamente 1% de sacarosa a aproximadamente pH 6,2.

50 En aún otra realización, una formulación de una forma soluble del receptor de p75 TNF fusionada a un dominio Fc de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM de L-arginina, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de fosfato sódico, aproximadamente 0 a 5% de Mannitol y 0 a 0,2% de Tween 20 a aproximadamente pH de 6 a 7.

55 En aún otra realización, la invención proporciona un uso para tratar un mamífero que comprende administrar una cantidad efectiva terapéuticamente de la composición farmacéutica descrita aquí, en la que el mamífero tiene una enfermedad o trastorno que puede ser tratado beneficiosamente con una forma soluble del receptor p75 TNF fusionado a un dominio Fc en la composición. En aún otra realización, el dominio Fc que contiene polipéptido es derivado de las mismas especies de mamíferos que se va a tratar con la composición. En una realización particular, el mamífero es un paciente humano en necesidad del tratamiento. Cuando el dominio Fc que contiene polipéptido de la composición 60 es una forma soluble del receptor p75 TNF fusionado a un dominio Fc, los ejemplos de enfermedades o trastornos

que pueden ser tratados incluyen pero no están limitados a artritis reumatoidea, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Wegener (granulomatosis), enfermedad de Crohn (o enfermedad inflamatoria del intestino), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hepatitis C, endometriosis, asma, caquexia, psoriasis y dermatitis atópica. Las enfermedades o trastornos adicionales que se pueden tratar con TNFR:Fc incluyen aquellos descritos en los documentos WO 00/62790, WO 01/62272 y la Solicitud de Patente U.S. No. 2001/0021380.

Adicionalmente, la presente composición farmacéutica proporciona almacenamiento a largo plazo mejorado de manera que el ingrediente activo, por ejemplo, una forma soluble del receptor p75 TNF fusionado a un dominio Fc, es estable sobre el transcurso del almacenamiento ya sea en estados líquidos o congelados. Como es usado aquí, la frase almacenamiento "a largo plazo" se entiende que indica que la composición farmacéutica se puede almacenar por tres meses o más, por seis meses o más, y preferiblemente por un año o más. El almacenamiento a largo plazo se entiende que indica que la composición farmacéutica se almacena ya sea como un líquido 2-8 °C o se congela, por ejemplo, a -20 °C o más frío. También se contempla que la composición se puede congelar y descongelar más de una vez. El término "estable" con respecto a almacenamiento a largo plazo se entiende que indica que el polipéptido activo de la composición farmacéutica no pierde más de 20%, o más preferiblemente 15%, o incluso más preferiblemente 10%, y lo más preferiblemente 5% de su actividad en relación a la actividad de la composición al principio del almacenamiento.

Dosificación efectiva de la composición farmacéutica

La dosificación apropiada, o cantidad terapéuticamente efectiva, de una forma soluble del receptor p75 TNF fusionado a un dominio Fc de la formulación dependerá de la condición a tratar, de la gravedad de la afección, de la terapia previa y de la historia clínica del paciente y la respuesta al agente terapéutico. La dosificación apropiada puede ser ajustada de acuerdo con el juicio del médico asistente de tal manera que pueda administrarse al paciente una vez o sobre una serie de administraciones. La composición farmacéutica se puede administrar como un único fármaco terapéutico o en combinación con terapias adicionales según sea necesario.

En una realización, la cantidad efectiva de una forma soluble del receptor p75 TNF fusionado a un dominio Fc por dosificación de adulto varía desde aproximadamente 1-500 mg/m², o desde aproximadamente 1-200 mg/m², o desde aproximadamente 1-40 mg/m² o aproximadamente 5-25 mg/m². Alternativamente, se puede administrar una dosificación plana, cuya cantidad puede variar desde 2-500 mg/dosificación, 2-100 mg/dosificación o desde aproximadamente 10-80 mg/dosificación. Si la dosificación se debe administrar más de una vez por semana, un intervalo de dosificación a manera de ejemplo es el mismo como los rangos de dosificación descritos anteriormente o inferiores y preferiblemente se administran dos o más veces por semana en un intervalo de dosificación de 25-100 mg/dosificación. En otra realización, una dosificación aceptable para administración por inyección contiene 80-100 mg/dosificación, o alternativamente, que contiene 80 mg por dosificación. Las dosificaciones se pueden administrar cada dos semanas, dosificaciones semanales, o separadas por varias semanas (por ejemplo 2 a 8). En este ejemplo TNFR:Fc (etanercept) se administra generalmente a 25 mg by por una inyección subcutánea individual (SC).

En muchos casos, se obtendrá una mejora en la condición de un paciente con una dosificación de hasta aproximadamente 100 mg de la composición farmacéutica de una a tres veces por semana durante un periodo de al menos tres semanas, aunque puede ser necesario un tratamiento durante periodos más largos para inducir el grado de mejora deseado. Para las condiciones crónicas incurables el régimen puede continuar indefinidamente. Para los pacientes pediátricos (edades 4-17), un régimen adecuado implica una dosificación de 0,4 mg/kg a 5 mg/kg de los polipéptidos de la invención, administrados una o más veces por semana.

En otra realización, se contempla que la formulación farmacéutica de la invención se prepara en una formulación a granel y como tal, los componentes de la composición farmacéutica se ajustan de manera que sean más altos de lo que se necesitarían para la administración y diluidos apropiadamente antes de administración.

Administración de la composición farmacéutica

Las composiciones farmacéuticas de esta invención son particularmente útiles para administración parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intracerebrospinal, intraarticular, intrasinovial y/o intratecal. La administración parenteral puede ser por inyección de bolo o infusión continua. Las composiciones farmacéuticas para inyección pueden estar presentes en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de multidosificación, con un conservante añadido. Adicionalmente, se ha desarrollado un número de enfoques de suministro de medicamentos recientes y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son adecuadas para administración usando estos nuevos métodos, por ejemplo, Inject-ease™, Genject™, plumas inyectoras como GenPen™, dispositivos sin agujas tales como MediJector™ y BioJector™. La presente composición farmacéutica también se puede adaptar a métodos de administración que aún no se han descubierto. Véase también Langer, 1990, Science, 249:1527-1533.

La composición farmacéutica también se puede formular como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo de manera subcutánea o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las formulaciones pueden ser modificadas con materiales poliméricos

o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse, si se desea, en un vial, paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. En una realización, el dispositivo dispensador puede comprender una jeringa que tiene una dosificación individual de la formulación líquida lista para inyección. La jeringa puede ir acompañada de instrucciones para la administración.

10 En otra realización, la presente invención está dirigida a un kit o recipiente, que contiene una composición farmacéutica acuosa de la invención. La concentración del polipéptido en la composición farmacéutica acuosa puede variar en un amplio intervalo, pero está generalmente dentro del intervalo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 20.000 microgramos por mililitro ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de formulación acuosa. El kit también puede ir acompañado de instrucciones de uso.

La invención se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, los ejemplos no deben ser interpretados como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

15 Con el fin de determinar el mejor excipiente para prevenir la agregación de un dominio Fc que contiene polipéptido, se produjo y se ensayó TNFR:Fc para la dispersión de luz de una muestra (Is) que contiene el TNFR:Fc con diferentes excipientes después de la incubación a $51\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, y comparados con la dispersión de luz de una muestra control (Ic) con TNFR:Fc sólo almacenado a $2\text{-}8\text{ }^\circ\text{C}$. La proporción se mide como Is/Ic, y una proporción de uno representa una línea base teórica donde no hay cambio en la dispersión de luz, es decir, agregación, del compuesto de prueba.

20 Los diferentes excipientes ensayados incluyeron 5% de ácido ascórbico, 5% de manitol, 10% de sacarosa, 1% de polivinilpirrolidona (PVP - K15), 0,1% de polietilenglicol (PEG, Mw = 1000), 0,6% de etanol, 1,2% de glicina, 2% de L-arginina, Pluronic F68, 1,6% de betaína y 1,5% de L-cisteína. Sorprendentemente, la L-arginina fue el único inhibidor de agregación hallado para mantener la proporción de Is/Ic debajo de uno durante todo el periodo de prueba de 200 horas.

Ejemplo 2

25 Se evaluó TNFR:Fc producido y denotado como lotes A, B, C y D contra TNFR:Fc producido por un método diferente y que tiene agregación inicial superior(lote 1) para estabilidad en una formulación líquida (25 mM de fosfato, 25 mM de L-arginina, 98 mM de NaCl, sacarosa al 1%, en pH de 6.2) en jeringas o en viales de vidrio a $-70\text{ }^\circ\text{C}$, $-20\text{ }^\circ\text{C}$, $2\text{-}8\text{ }^\circ\text{C}$, $30\text{ }^\circ\text{C}$, y $37\text{ }^\circ\text{C}$. Se analizaron las muestras por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), SEC desnaturalizada (dSEC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), electroforesis en gel de poliácridamida de dodecilsulfato sódico (SDSPAGE) y para la unión y bioactividad en diversos puntos temporales. Se puede medir la bioactividad por cualquier número de ensayos incluyendo por SEC, dSEC, HIC, actividad de unión y bioactividad, como se discutió abajo.

Cromatografía de exclusión de tamaño:

35 Se usó SEC para evaluar el nivel de especies de alto peso molecular (HMW) (agregado que se formó) en las muestras durante el almacenamiento. Las especies de bajo peso molecular (LMW) se solucionaron mejor por dSEC y que los datos se pueden encontrar en la siguiente sección. La Figura 1 muestra los datos de SEC para las muestras almacenadas a $2\text{-}8\text{ }^\circ\text{C}$ y la Figura 2 muestra los datos de SEC para muestras almacenadas bajo condiciones aceleradas de $37\text{ }^\circ\text{C}$.

40 También se recolectaron los datos para muestras almacenadas a $30\text{ }^\circ\text{C}$ (datos no mostrados) y los niveles de especies de HMW con intermedios a aquellos observados en $2\text{-}8\text{ }^\circ\text{C}$ y $37\text{ }^\circ\text{C}$. Durante el almacenamiento por 1 año a $2\text{-}8\text{ }^\circ\text{C}$, los niveles agregados permanecieron estables, o aumentaron menos de 0.6% en el peor de los casos para el lote A. No se vio un incremento significativo en el agregado durante el almacenamiento a $2\text{-}8\text{ }^\circ\text{C}$. Bajo condiciones aceleradas durante el almacenamiento a $37\text{ }^\circ\text{C}$, los niveles agregados en el lote 1 aumentaron a 19% durante 12 meses, y a 14% y 12% en el lote A y B, respectivamente. La pendiente de la línea fue muy similar, mostrando que las moléculas agregadas a la misma rata, y que la diferencia entre los lotes A-D y lote 1 se debe a los niveles iniciales de agregados, más alto en el lote 1 que en los lotes A-D. Para el lote B, no hubo diferencia entre las muestras almacenadas en un vial a $-70\text{ }^\circ\text{C}$, en una jeringa a $-70\text{ }^\circ\text{C}$, en una jeringa $-20\text{ }^\circ\text{C}$, o en una jeringa después del tratamiento térmico y almacenamiento a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (datos no mostrados). Todos los valores estuvieron dentro del 0.4% del vial de control de $-70\text{ }^\circ\text{C}$ (y el valor de tiempo 0) después de 12 meses de almacenamiento.

50 Cromatografía de exclusión de tamaño desnaturalizada:

La cuantificación SEC (dSEC) desnaturalizada de las especies de peso molecular bajo (LMW) se muestra en la Figura 3 para muestras almacenadas a $2\text{-}8\text{ }^\circ\text{C}$, y la Figura 4 para muestras almacenadas a $37\text{ }^\circ\text{C}$. Se analizaron los lotes A-D y lote 1 por dSEC después del almacenamiento por hasta 1 año a $2\text{-}8\text{ }^\circ\text{C}$, pero los lotes C y D no se analizaron en los últimos 6 meses de almacenamiento bajo las condiciones aceleradas de $37\text{ }^\circ\text{C}$. Durante el almacenamiento a $37\text{ }^\circ\text{C}$, lote 1 y lotes A, B, y C mostraron ruptura similar, mientras el lote D mostró ruptura superior durante la tensión de calor

que el lote 1 y los otros lotes. La similitud en los lotes A y B y el lote 1 también se vio durante el almacenamiento a 30°C (datos no mostrados), con niveles de ruptura intermedios a aquel visto en 2-8°C y 37°C. Para el lote B, no hubo diferencia entre las muestras almacenadas en un vial a -70°C, en una jeringa -70°C, en una jeringa a -20°C, o en una jeringa después del tratamiento térmico y almacenadas a -20°C (datos no mostrados). Todos los valores después de 12 meses de almacenamiento a -70°C y -20°C estuvieron dentro de 0.7% de cada otro y el valor de tiempo 0.

Durante el almacenamiento a 30°C (datos no mostrados), el% LMW por dSEC para el lote A sigue bien con el lote B, aunque ambos lotes muestran niveles ligeramente mayores de ruptura que el lote 1 a esta temperatura. El lote D muestra niveles más altos de especies de LMW a 2-8°C y 37°C en todos los puntos de tiempo, incluyendo el tiempo 0. Los productos de ruptura en el lote D parecen ser más grandes en tamaño que lo que típicamente se observa mediante el análisis dSEC de muestras TNFR:Fc tensionados. Estas diferentes especies se observan después del almacenamiento a 2-8°C y 37°C.

Cromatografía de interacción hidrófoba:

HIC se usó para separar diferentes especies relacionadas de TNFR:Fc. Se ha demostrado que Pico 1 (y un pico de elución anterior indicado como pre-pico 1) consiste principalmente en especies de bajo peso molecular. El Pico 2 incluye el dímero plegado, intacto (activo). El Pico 3 incluye materiales agregados y dímeros menos activos.

Los datos del Pico 1 de HIC se muestran en la Figura 5 para muestras almacenadas a 2-8°C y la Figura 6 para muestras almacenadas a 37°C. Para todos los lotes excepto el lote D, los niveles de especies de LMW se mantienen relativamente constantes (dentro del 1,2% en 12 meses) para las muestras almacenadas a 2-8°C. Si se usa el valor promedio para las muestras de -70°C en lugar del valor de tiempo 0 para el lote A, las curvas de todos los lotes, excepto el lote D, se alinean bien. El lote D muestra más Pico 1 que los otros lotes, que corrobora los altos niveles de especies de LMW vistos por dSEC. Después de la tensión de calor de las muestras a 37°C por hasta 1 año, el lote B y el lote 1 muestran aproximadamente 30% de HIC del Pico 1, mientras que el lote A muestra aproximadamente 45% de HIC del Pico 1. El lote D mostró 47% de HIC del Pico 1 después de solamente 6 Meses de tensión a 37°C.

Como se ha indicado anteriormente, HIC del Pico 2 representa la especie activa más deseada. Las Figuras 7 y 8 muestran el % de HIC del Pico 2 para muestras almacenadas a 2-8°C y 37°C, respectivamente. Aunque el lote 1 comienza con un Pico 2 inicial más bajo, conserva el nivel de especies activas durante el almacenamiento durante 12 meses a 2-8°C. Los lotes A, B y C también retienen especies activas durante los 12 meses de almacenamiento refrigerado. Bajo condiciones aceleradas de 37°C, todos los lotes ensayados pierden HIC del Pico 2 durante el almacenamiento.

Los niveles de HIC del Pico 3 permanecieron esencialmente constantes durante 1 año de almacenamiento a 2-8°C (Figura 9). La variación en % de Pico 3 para todos los lotes osciló entre 1 y 3%, bien dentro del error de integración. Para los lotes A, B, C y D, HIC de Pico 3 no muestra resolución de línea base, que introduce más variabilidad en la integración. Para el lote 1, el pico está más claramente definido. Después del almacenamiento a 37°C, los niveles de HIC del Pico 3 en el lote 1 son más variables, pero permanecen bastante constantes, excepto por un posible aumento a los 12 meses (Figura 11). Entre los lotes A-D, no se observaron diferencias claras después del almacenamiento a 37°C, excepto a los 12 meses, cuando el lote B muestra un aumento en el nivel de HIC del Pico 3.

Electroforesis en gel de dodecil sulfato-poliacrilamida de sodio:

Se llevó a cabo análisis SDS-PAGE de muestras almacenadas durante 12 meses a -70°C, -20°C, 2-8°C, 30°C y 37°C. El lote A tenía un aumento en las bandas asociadas con tanto un fragmento de ruptura ~50kD como ~34kD después del almacenamiento a 2-8°C por 1 año. A temperaturas elevadas, se observó una degradación extensiva, con muchas bandas de pequeño peso molecular que mostraban intensidades incrementadas.

El lote 1 no mostró ningún cambio después de un año de almacenamiento a 2-8°C, pero mostró un fragmento de ruptura aumentado de ~50 kD y ~34 kD después de 1 año a 30 y 37°C. El lote B no mostró cambios durante el almacenamiento por 12 meses a -70°C (vial o jeringa) o en jeringas a -20°C, con o sin tratamiento térmico para eliminar el sobreenfriamiento. Sin embargo, después de 12 meses a 2-8°C, las bandas correspondientes a tanto los fragmentos de ruptura ~50kD como ~34kD mostraron una intensidad aumentada. El almacenamiento a 30 o 37°C durante 1 año dio lugar a rompimiento, con muchas bandas de peso molecular pequeño, además de los fragmentos de ruptura ~50kD y ~34kD discutidos anteriormente.

Se analizaron los lotes C y D después de almacenamiento por 12 meses a -70°C y 2-8°C. El lote 1 y los lotes B, C y D se analizaron después de un almacenamiento por 12 meses a -70°C y 2-8°C y mostraron patrones de degradación similares como se ha indicado anteriormente.

Unión y Bioactividad:

La Figura 11 muestra los datos de actividad de unión derivados de un ELISA, para los lotes A-D y el lote 1 almacenados por 6 y 12 meses a -70°C, 2-8°C, 30°C y 37°C. Las barras de error en las muestras de -70°C indican +/- 30%. Sólo valores fuera de estas barras de error serán considerados significativos debido a la variabilidad del ensayo. Los lotes A y B retenían la actividad de unión completa después de 6 meses a 2-8 y 30°C, pero a los 12 meses, solo las muestras

almacenadas a 2-8°C mantenían actividad de unión completa. El lote 1 fue capaz de mantener la actividad completa por hasta 12 meses después del almacenamiento a 2-8 y 30°C, a pesar de mostrar niveles de LMW de 13,6% (por dSEC, datos no mostrados) y 8% de HMW (por SEC; datos no mostrados) después de 1 año a 30°C. Los lotes C y D también conservaron la actividad de unión completa después de 1 año de almacenamiento a 2-8°C, a pesar de los niveles más altos de productos de ruptura observados en el lote D por dSEC e HIC.

Un ejemplo de un bioensayo TNFR: Fc es para inhibir la respuesta de crecimiento negativo de una línea celular a TNF-alfa humana. La presencia de TNF-alfa inhibe las células de crecer a través de la inducción de la apoptosis. La presencia de receptor rhuTNF (TNFR: Fc) soluble biológicamente activo neutraliza específicamente TNF-alfa de una manera dependiente de la dosificación. Un estándar de referencia, control y muestras de TNFR se añaden y titulan en un formato de placa de microtitulación de 96 pozos. Se añade una concentración de células conocida a cada pozo seguido por la adición de TNF-alfa. Después de un período de incubación, las células no adherentes se eliminan lavando suavemente con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y las células restantes se tiñen. Después de un período de incubación, se lee cada pozo. Las unidades de cada pozo son directamente proporcionales a la actividad específica de TNFR. Los resultados del ensayo de bioactividad (Figura 12) corroboran los datos del ensayo de unión.

Conclusiones:

Se mostró que los lotes B y C formulados en una formulación de fosfato líquido (25 mM de fosfato, 25 mM de L-arginina, 98 mM de NaCl, sacarosa al 1%, pH de 6,2) eran tan estables como el lote 1 en la misma formulación por 1 año a -70°C o 2-8°C. Los lotes A-D mostraron menos agregación que el lote 1, y fueron equivalentes en términos de ruptura en especies de menor peso molecular (menos del 4% LMW por dSEC a los 12 meses). Tanto el lote 1 como los lotes A-D mostraron mayor ruptura y agregación a temperaturas elevadas de 30 y 37°C, pero los lotes que se realizaron igual al lote 1 durante un año a 2-8°C mostraron equivalencia al lote 1 durante la tensión de calor por 1 año. Se mostró que el lote D era menos estable en el ensayo acelerado con altos niveles de productos de ruptura de bajo peso molecular.

Los datos de la prueba de estabilidad acelerada a 30 y 37°C corresponden a la estabilidad a largo plazo a 2-8°C, y por lo tanto proporciona un método para acelerar la prueba de la estabilidad a largo plazo de un polipéptido formulado a temperaturas bajas sin requerir una evaluación de la estabilidad a largo plazo. Las muestras del lote B almacenadas congeladas en jeringas a -70°C y -20°C mostraron una estabilidad similar a las muestras almacenadas congeladas en un vial a -70°C, que soporta el uso de una realización de una jeringa precargada almacenada congelada hasta el suministro al paciente.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que es una formulación acuosa estable que comprende una forma soluble del receptor p75 TNF fusionada a un dominio Fc y un inhibidor de agregación, en el que el inhibidor de agregación es L-arginina.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un amortiguador.
3. La composición de la reivindicación 2, en la que el amortiguador es seleccionado del grupo que consiste en fosfato de sodio, histidina, fosfato de potasio, citrato de sodio o potasio, ácido maleico, acetato de amonio, tris(hidroximetil)-aminometano (tris), acetato y dietanolamina.
4. La composición de la reivindicación 3, en la que la L-arginina está en una concentración de 10 mM a 100 mM.
- 10 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 4, que comprende además un modificador de la tonicidad.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que el modificador de la tonicidad se selecciona del grupo que consiste en arginina, cisteína, histidina, glicina, cloruro de sodio, cloruro de potasio, citrato de sodio, sacarosa, glucosa y manitol.
- 15 7. La composición de la reivindicación 6, en el que el modificador de la tonicidad es cloruro de sodio.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, o 4, que comprende además un excipiente.
9. La composición de la reivindicación 6, que comprende además un excipiente.
10. La composición de la reivindicación 7, que comprende además un excipiente.
- 20 11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el excipiente es seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa, albúmina de suero bovino (BSA), SA humana o HA recombinante, dextrano, PVA, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polietilenglicol, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC), polietilenglicol, etilenglicol, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), prolina, L-serina, ácido glutámico sódico, alanina, glicina, clorhidrato de lisina, sarcosina, ácido gamma-aminobutírico, Tween-20, Tween-80, SDS, polisorbato, copolímero de polioxietileno, fosfato de potasio, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, N-óxido de trimetilamina, betaína, iones de zinc, iones de cobre, iones de calcio, iones de manganeso, iones de magnesio, CHAPS, monolaurato de sacarosa y 2-O-betamannoglicerato.
- 25 12. La composición de la reivindicación 11, en el que el excipiente es sacarosa.
- 30 13. La composición farmacéutica estable de la reivindicación 1, que comprende 10 mg/ml a 100 mg/ml de forma soluble del receptor p75 TNF fusionado a un dominio Fc, L - arginina, fosfato sódico, cloruro sódico y sacarosa.
14. La composición de la reivindicación 13, en la que la L-arginina es de 10 mM a 75 mM.
15. La composición de la reivindicación 13, en la que el fosfato sódico es de 5 mM a 100 mM
16. La composición de la reivindicación 13, en la que el cloruro de sodio es de 5 mM a 200 mM.
17. La composición de la reivindicación 13, en la que la sacarosa es 0.5% a 1.5%.
- 35 18. La composición de la reivindicación 13, en la que el pH es 5.5 a 7.8.
19. La composición de la reivindicación 13, Que tiene 25 mg / ml de forma soluble del receptor de p75 TNF fusionado a un dominio Fc, 25 mM de L-arginina, 25 mM de fosfato de sodio, 98 mM de cloruro de sodio, sacarosa al 1% a pH de 6,2.
20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 13 o 19, en el que la composición es líquida.
- 40 21. La composición de la reivindicación 20, en la que la composición es líquida.
22. Un método para formulación de una composición que comprende combinar una forma soluble del receptor de p75 TNF fusionado a un dominio Fc con L-arginina.
23. El método de la reivindicación 22, que comprende además los pasos de combinar un amortiguador, un modificador de la tonicidad, y un excipiente con la composición.
- 45 24. El método de la reivindicación 22 o 23, en el que la composición es líquida.

25. Un kit que comprende una composición que comprende una forma soluble del receptor p75 TNF fusionado a un dominio Fc y L-arginina.
26. El kit de la reivindicación 25, en el que la composición es líquida.
27. El kit de la reivindicación 25 o 26, en el que la composición se almacena en una jeringa estéril prellenada
- 5 28. El kit de la reivindicación 27, en el que la jeringa se almacena a aproximadamente -20 grados C a aproximadamente -70 grados C.
29. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 13 para uso en un método de tratamiento de un mamífero en necesidad del mismo que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica.
- 10 30. Uso de L-arginina para estabilizar una forma soluble del receptor de p75 TNF fusionado a un dominio Fc en una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.

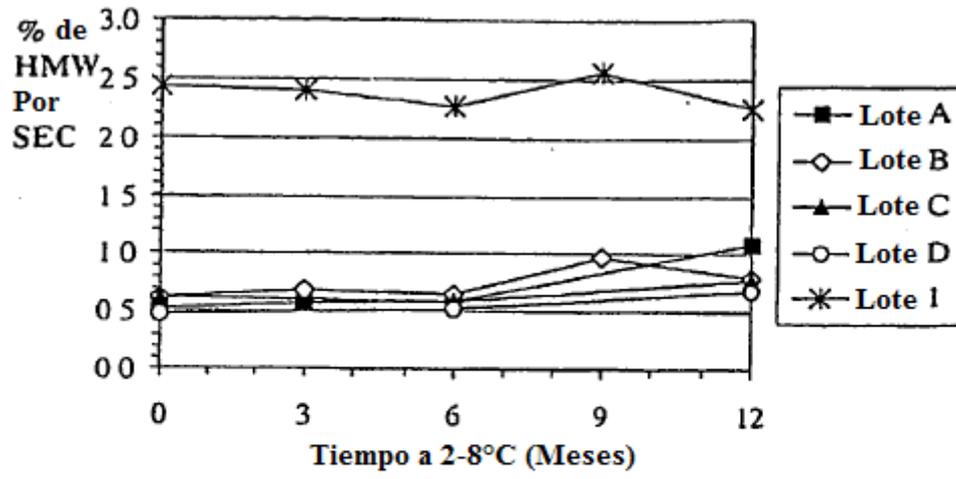


Figura 1

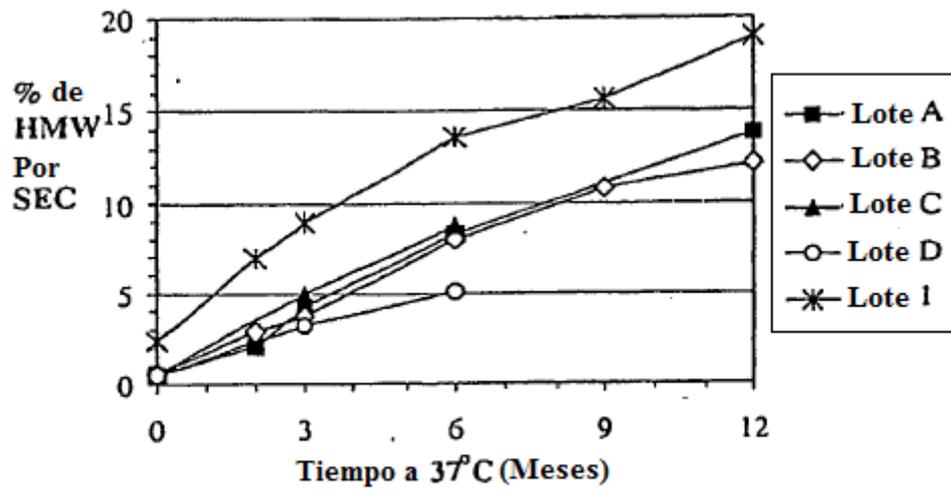


Figura 2

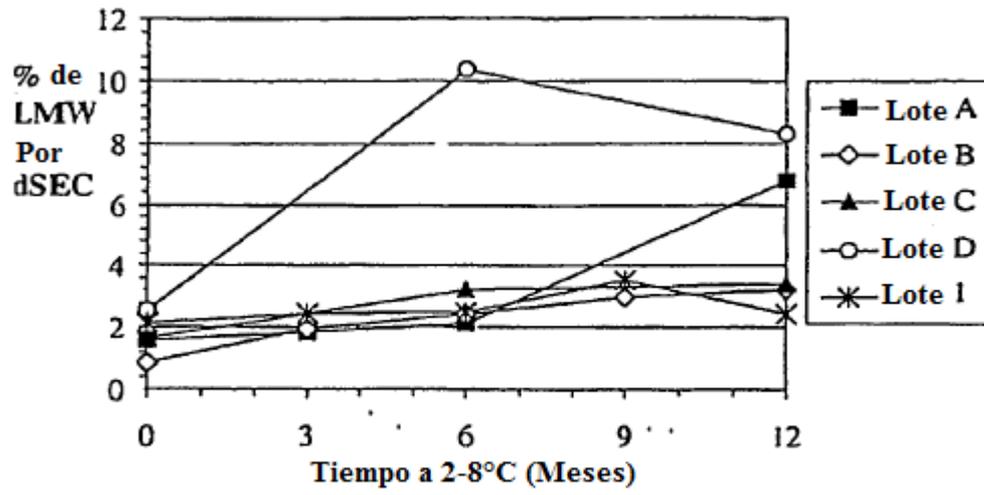


Figura 3

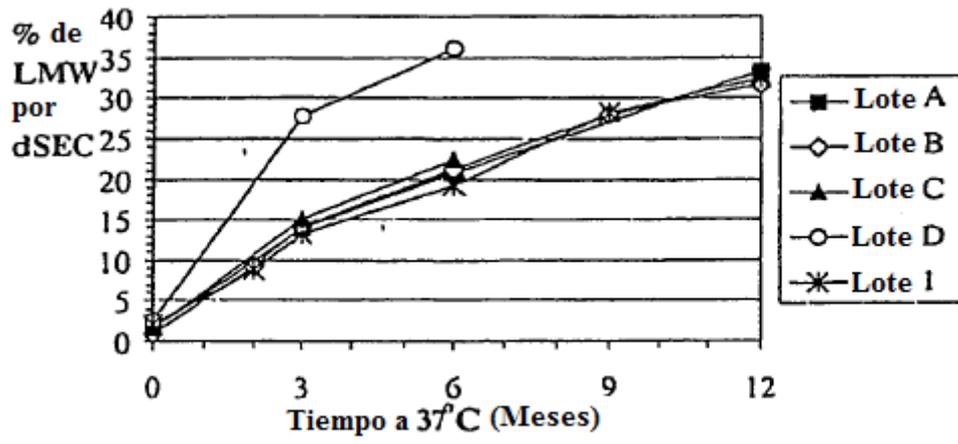


Figura 4

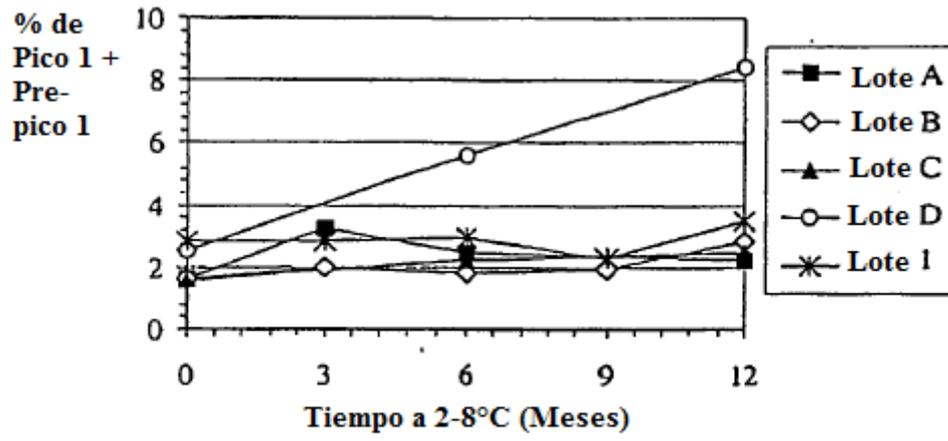


Figura 5

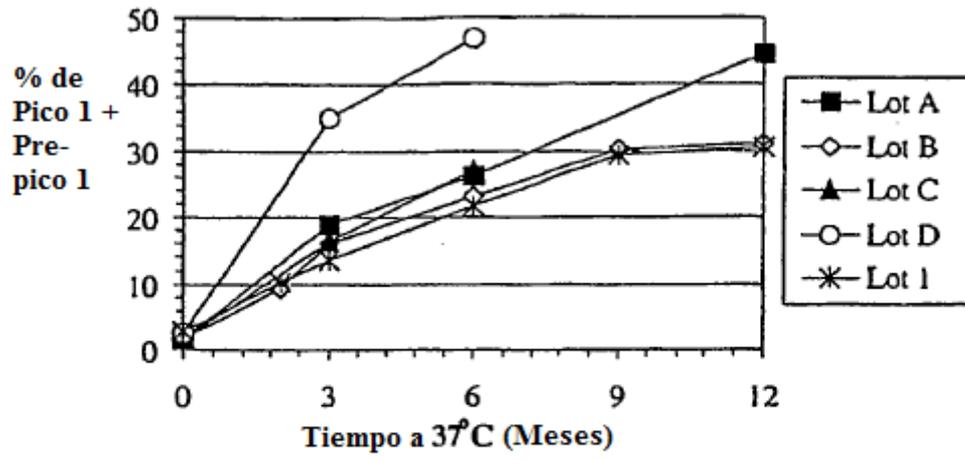


Figura 6

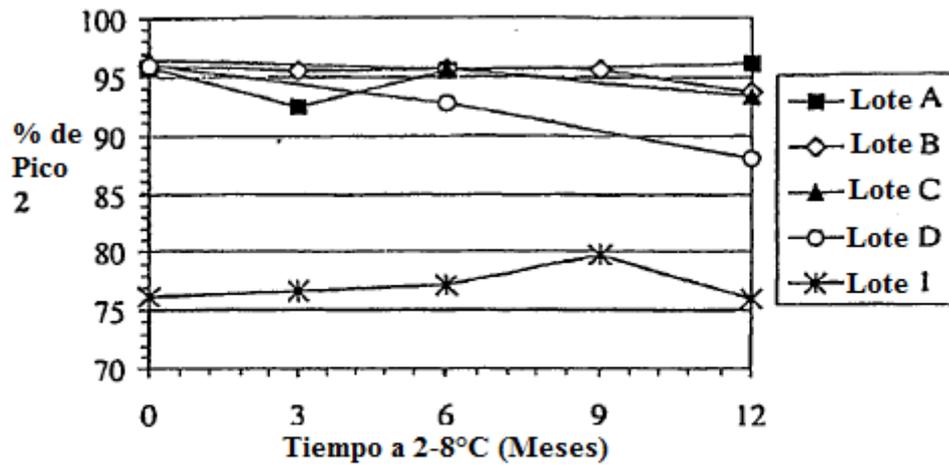


Figura 7

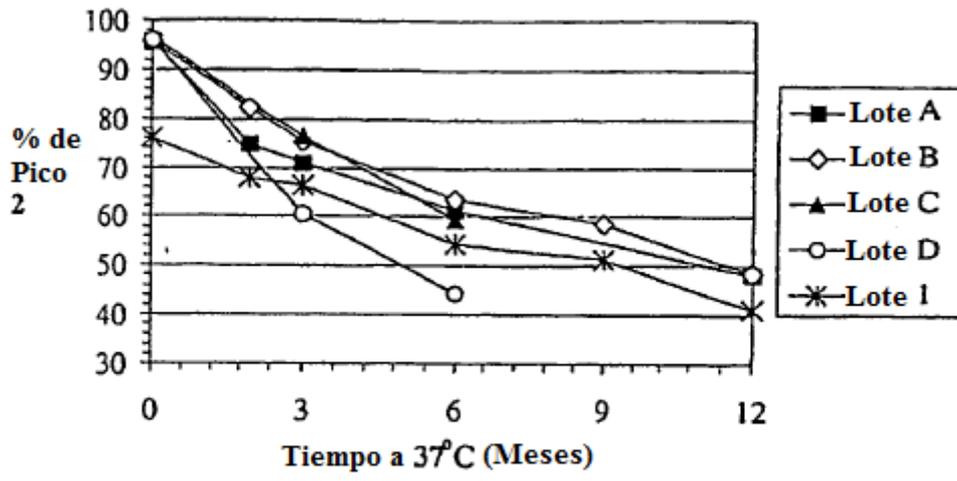


Figura 8

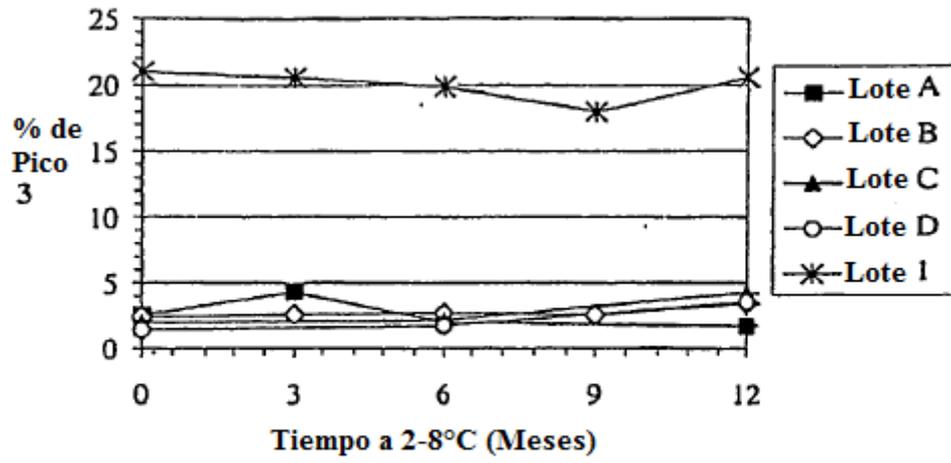


Figura 9

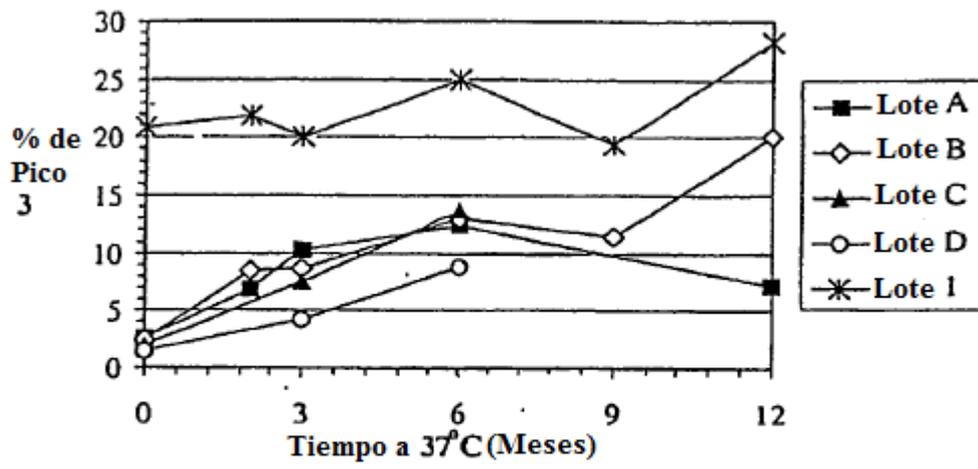


Figura 10

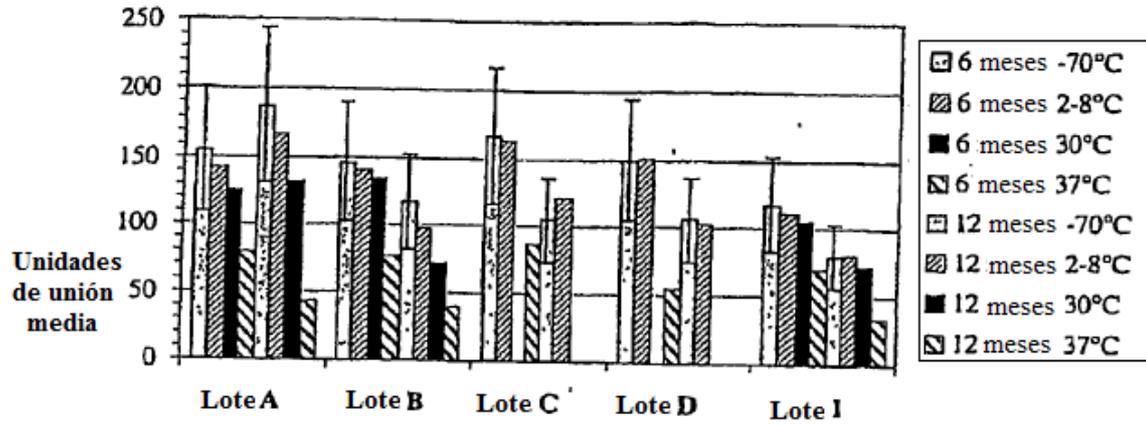


Figura 11

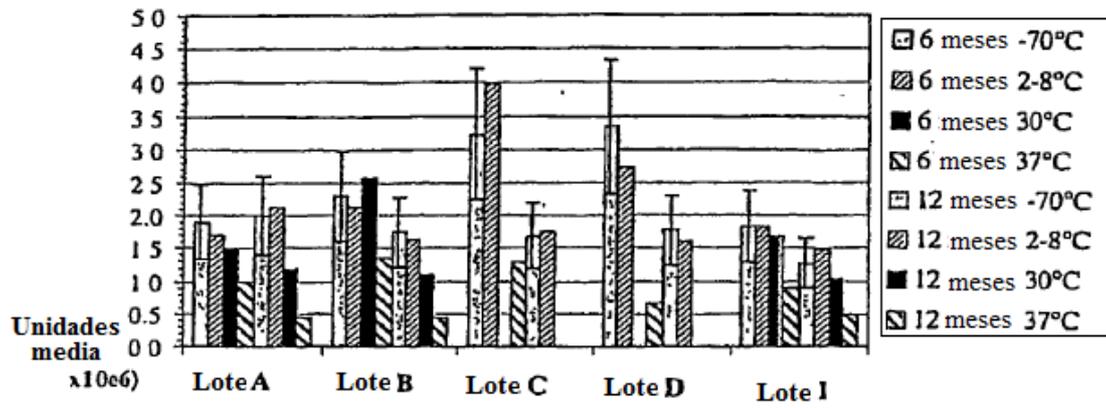


Figura 12