

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 969**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/4172 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2012** **PCT/KR2012/004369**
87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012** **WO12165917**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2012** **E 12793393 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017** **EP 2714009**

54 Título: **Formulación líquida estable de etanercept**

30 Prioridad:

03.06.2011 KR 20110053890

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.12.2017

73 Titular/es:

LG CHEM, LTD. (100.0%)
128, Yeoui-daero, Yeongdeungpo-gu
Seoul 07336 , KR

72 Inventor/es:

CHOI, SUK YOUNG;
KO, YOUN KYUNG y
SO, JIN EON

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 645 969 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

Formulación líquida estable de etanercept

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una formulación líquida de etanercept (proteína de fusión recombinante de Fc:sTNFR p75), y más particularmente, a una formulación líquida que comprende metionina, o sales farmacéuticamente aceptables de la misma como estabilizador, en una cantidad suficiente para reducir subproductos de etanercept durante el almacenamiento.

Técnica anterior

El etanercept es un modulador de la inflamación biológico que actúa como inhibidor competitivo de TNF- α , uniéndose al receptor de TNF- α de la superficie celular, para inhibir respuestas inmunitarias mediadas por TNF- α . El etanercept es una macromolécula con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa, y es un homodímero de dos proteínas de fusión de Fc unidas por un enlace disulfuro, consistiendo cada proteína de fusión de Fc consiste en un receptor de TNF p75 humano soluble acoplado a la porción Fc de la subclase 1 de inmunoglobulina G humana (Goldenberg, *Clinical Therapeutics*, 21(1): 75-87, 1999; Moreland *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 130(6): 478-486, 1999).

Esta proteína de fusión prototípica se sintetizó por primera vez a principios de la década de los 90 por Bruce A. Beutler en el Centro Médico del Suroeste de la Universidad de Tejas, y se comercializó por Amgen con el nombre comercial de Enbrel en 2002. El etanercept es un inhibidor de TNF- α usado para tratar la artritis reumatoide, psoriasis y espondilitis anquilosante, y está en ensayos clínicos para el tratamiento de la vasculitis, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Crohn.

Como los fármacos proteicos, los fármacos con anticuerpos tienen una semivida muy corta, y la desnaturalización física y química puede producirse fácilmente por temperatura desfavorable, tensión de cizalladura, vibración, congelación-descongelación, exposición a UV, cambio de pH excesivo, disolventes orgánicos y contaminación microbiana. La desnaturalización química incluye disociación de dímeros, oxidación, desamidación, isomerización y polimerización, que se ven influidos por los aminoácidos que constituyen el anticuerpo y las condiciones del disolvente que contiene el anticuerpo (sal, pH y temperatura). La desnaturalización física incluye la pérdida de la estructura terciaria, agregación covalente/no covalente y adhesión de monómeros, que se ven influidos por parches hidrófobos en la superficie de la proteína modificados por los entornos circundantes que contienen el anticuerpo tales como disolventes, estructuras proteicas complejas tales como distribución de carga y estabilidad térmica. La desnaturalización física o química de un anticuerpo produce la pérdida de sus actividades fisiológicas. Puesto que la desnaturalización es un proceso irreversible, los anticuerpos, una vez desnaturalizados, pueden no recuperar sus propiedades nativas al estado inicial, conduciendo a una reducción en sus eficacias terapéuticas. También se ha sugerido que la agregación de monómeros produce respuestas inmunitarias. Por tanto, se han llevado a cabo muchos estudios sobre formulaciones de anticuerpo que contienen una cantidad fisiológicamente eficaz sin agregados (Ishikawa *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 33(8): 1413-1417, 2010; Levin *et al.*, *The Development of Therapeutic Monoclonal Antibody Products*, editores. Boston (MA): BioProcess Technology Consultants, Inc, capítulo 9).

Existen muchos métodos disponibles para evitar la desnaturalización de proteínas en formulaciones líquidas. En algunos fármacos proteicos, los problemas de estabilidad se abordan mediante liofilización. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.592.004 divulga una formulación liofilizada de daclizumab que se estabiliza usando de 5 a 25 mM de una disolución de tampón histidina (pH de 5,5 a 6,5), del 0,005 al 0,03 % de un tensioactivo no iónico, polisorbato y de 100 a 300 mM de un azúcar no reductor, sacarosa. La publicación de patente estadounidense n.º 2010-0158925 divulga una formulación liofilizada de cetuximab que se estabiliza usando una disolución de tampón histidina y ácido lactobiónico. Sin embargo, el proceso de liofilización genera tensiones de congelación y secado tales como formación de cristales de hielo, cambio de pH y alta concentración de soluto, y estas tensiones pueden provocar desnaturalización de anticuerpos. Además, puesto que se necesita un liofilizador de gran capacidad para el proceso de liofilización durante la producción, surgen altos costes de producción durante una producción a gran escala. Disolver el producto liofilizado en medios acuosos estériles para la reconstitución antes de su uso también plantea un inconveniente.

Como alternativa para solucionar estas limitaciones, se añade un estabilizador en formulaciones líquidas para la mejora de la estabilidad de anticuerpos. Se conocen tensioactivos, albúminas séricas, polisacáridos, aminoácidos, polímeros, sales o similares como estabilizadores para proteínas incluyendo anticuerpos (Wang, *Int. J. Pharm.*, 185: 129-188, 1999; Wang *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 96(1): 1-26, 2007).

La publicación de patente estadounidense n.º 2011-0070231 divulga una composición líquida estable de anticuerpo IgG, en la que la formulación líquida farmacéutica estable incluye 50 mg/ml o más de daclizumab en de 20 a 60 mM de una disolución de tampón succinato (pH de 5,5 a 6,5), del 0,02 al 0,04 % de polisorbato y de 75 a 150 mM de cloruro de sodio.

La publicación de patente estadounidense n.º 2011-0020328 divulga una cantidad terapéuticamente eficaz de formulación de anticuerpo anti-CD20, en la que la composición farmacéuticamente estable incluye de 10 a 100 mM de acetato de sodio, de 25 a 100 mM de cloruro de sodio, del 0,5 al 5 % de base libre de arginina, de 0,02 a 0,2 mM de EDTA y del 0,01 al 0,2 % de polisorbato 80, y su pH es de 5,0 a 7,0.

La patente estadounidense n.º 7.785.592 divulga una formulación estable, en la que se estabilizan 75 mg/ml o más de palivizumab usando una disolución de tampón histidina y glicina sin sales iónicas y un tensioactivo, y su estabilidad se mantiene a de 2 a 8 °C durante al menos 15 meses.

La patente estadounidense n.º 6.991.790 divulga una formulación farmacéutica acuosa estable, que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, una disolución de tampón acetato de aproximadamente pH 4,8 a 5,5, un tensioactivo, y un poliol sin un agente isotónico tal como cloruro de sodio.

La patente estadounidense n.º 7.648.702 divulga una formulación líquida, en la que una proteína de fusión del receptor del factor de necrosis tumoral humano p75 unido a la porción Fc de la inmunoglobulina humana G1 (IgG1) se estabiliza usando de aproximadamente 10 a 200 mM de L-arginina como agente antiagregante. Esta patente es la única técnica de uso de etanercept como principio activo.

La patente estadounidense n.º 7.276.477 divulga cristales de etanercept y una lista de posibles estabilizadores.

Con el fin de preparar formulaciones estables, sin embargo, deben usarse estabilizadores apropiados considerando las propiedades fisicoquímicas de cada principio activo. Cuando los estabilizadores se usan en combinación, la competición entre ellos y efectos adversos pueden conducir a efectos no deseados. Además, las concentraciones de anticuerpos deben estar dentro del intervalo adecuado para la estabilización, y sus concentraciones son relativamente mayores que las de los fármacos proteicos. Por tanto, se requiere mucho esfuerzo y precaución para estabilizar anticuerpos en disoluciones (Shire et al., J. Pharm. Sci., 93(6): 1390-1402, 2004).

Existen pocos estudios sobre las formulaciones líquidas estables de etanercept, y el único método para estabilizar etanercept del que son conscientes los inventores es usar L-arginina en la formulación líquida. Por tanto, existe la necesidad urgente de desarrollar una nueva formulación líquida que sea capaz de mantener de manera estable la actividad de etanercept durante un periodo prolongado y que sea más eficaz en la estabilización de etanercept que la formulación conocida que comprende L-arginina.

Divulgación de la invención

Problema técnico

Los presentes inventores han realizado muchos esfuerzos para desarrollar un método para preparar una formulación líquida capaz de mantener de manera estable la actividad de etanercept. Como resultado, encontraron que la metionina como estabilizador muestra efectos notables sobre la estabilización de etanercept en una disolución, completando así la presente invención.

Solución al problema

Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación acuosa, que comprende estabilizadores para reducir la formación de subproductos de etanercept durante el almacenamiento en una disolución y mantener su actividad durante un periodo de tiempo prolongado.

Efectos ventajosos de la invención

La formulación líquida según la presente invención puede evitar de manera eficaz la formación de subproductos de etanercept y mantener de manera estable sus eficacias farmacéuticas durante el almacenamiento a largo plazo. Por tanto, no se requiere el procedimiento de reconstitución antes de la administración, y la formulación estéril puede administrarse a pacientes para garantizar la seguridad del paciente. Por tanto, se espera que se aplique a los campos que necesitan tratamiento con etanercept.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

En un aspecto para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona una formulación líquida, que comprende metionina, o sales farmacéuticamente aceptables de la misma como estabilizador.

La formulación de la presente invención puede ser una formulación líquida de etanercept que comprende etanercept; y uno o más estabilizadores seleccionados del grupo que consiste en metionina, lisina, histidina, y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas, en la que metionina debe estar presente según la reivindicación 1.

La formulación muestra estabilidad en almacenamiento aumentada reduciendo los subproductos de etanercept que

se producen debido a la desnaturalización durante el almacenamiento.

Como estabilizador, pueden estar presentes metionina, lisina, histidina o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas en la formulación en una cantidad de 0,1 a 250 mM.

El etanercept en la formulación puede estar presente en una cantidad de 1 a 100 mg/ml.

La formulación puede incluir además uno o más materiales seleccionados del grupo que consiste en un tampón, un agente isotónico, un excipiente y un conservante.

El tampón puede seleccionarse del grupo que consiste en citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato, histidina y Tris, y puede estar presente en una cantidad de 0,1 a 100 mM.

El agente isotónico puede seleccionarse del grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de potasio, ácido bórico, borato de sodio, manitol, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, maltosa, sacarosa, eritritol, arabitól, xilitol, sorbitol y glucosa, y puede estar presente en una cantidad de 1 a 1000 mM.

La formulación de etanercept según la presente invención puede ser una formulación líquida, que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de metionina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tampón fosfato, y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio.

La formulación de etanercept según la presente invención puede ser una formulación líquida, que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de lisina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tampón fosfato, y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio.

La formulación de etanercept según la presente invención puede ser una formulación líquida, que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de histidina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tampón fosfato, y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio.

La formulación de etanercept según la presente invención puede ser una formulación líquida, que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de histidina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 250 mM de lisina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tampón fosfato, y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio.

La formulación de etanercept según la presente invención puede ser una formulación líquida, que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de histidina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 250 mM de metionina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tampón fosfato, y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio.

La formulación de etanercept según la presente invención puede ser una formulación líquida, que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de metionina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 250 mM de lisina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tampón fosfato, y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio.

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle.

La presente invención ha demostrado por primera vez que metionina, lisina, histidina y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas tienen los efectos de reducir la formación de subproductos de etanercept en disolución y mantener de manera estable su actividad durante el almacenamiento a largo plazo, y por tanto sugiere un uso novedoso de las mismas como estabilizadores de una cantidad farmacéuticamente eficaz de etanercept.

Con el fin de preparar formulaciones estables, deben usarse estabilizadores apropiados considerando las propiedades fisicoquímicas de cada principio activo. Según la diferencia en los tipos, la concentración y las combinaciones de los materiales incluidos en una formulación, la competición entre los materiales en la formulación puede conducir a efectos no deseados. Por tanto, es difícil preparar una formulación estable específica para el fármaco.

En vista de los antecedentes anteriores, los presentes inventores han encontrado que la formulación líquida que comprende uno o más estabilizadores seleccionados del grupo que consiste en metionina, lisina e histidina y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas aumentan la estabilidad en almacenamiento de etanercept en comparación con la formulación que no tiene estabilizadores, reduciendo los subproductos de etanercept durante el almacenamiento en una disolución.

Específicamente, en una realización de la presente invención, con el fin de investigar el estabilizador óptimo para la preparación de la formulación líquida estable de etanercept, se añaden una variedad de aminoácidos, tensioactivos y polímeros para examinar sus efectos de estabilización. Como resultado, se encontró que lisina, histidina,

metionina, o la combinación de las mismas mostraban efectos notables sobre la estabilización de etanercept evitando su desnaturalización durante el almacenamiento en una disolución a alta temperatura.

Además, se encontró que la formulación según la presente invención mostraba efectos de estabilización de etanercept que eran equivalentes o mayores que los de la formulación que comprende L-arginina que es la formulación estable conocida de etanercept (patente estadounidense n.º 7.648.702). En particular, se encontró que la metionina mostraba un efecto muy excelente de estabilización de etanercept mejor que L-arginina.

Específicamente, los subproductos de etanercept formados durante el almacenamiento se examinaron mediante HPLC de exclusión molecular (SE-HPLC). Como resultado, en comparación con la cantidad total de impurezas de la formulación de etanercept que se preparó usando L-arginina como estabilizador en la patente estadounidense n.º 7.648.702, la formulación preparada usando lisina como estabilizador mostró una cantidad similar de impurezas, y la formulación preparada usando histidina o metionina como estabilizador mostró una menor cantidad de impurezas (véase la tabla 2). El análisis por HPLC de interacción hidrofóbica (HI-HPLC) también mostró resultados similares. Estos resultados indican que histidina, lisina y metionina evitan la desnaturalización de etanercept inhibiendo la formación de subproductos del mismo (véase la tabla 3).

Por tanto, la formulación líquida según la presente invención puede mantener de manera estable eficacias farmacéuticas de etanercept durante un periodo de tiempo prolongado reduciendo de manera eficaz la formación de subproductos de etanercept.

Tal como se usa en el presente documento, el término "etanercept (proteína de fusión recombinante de Fc:TNFR p75)" se refiere a una proteína que es una forma de homodímero de dos proteínas de fusión de Fc unidas por enlaces disulfuro, consistiendo cada proteína de fusión de Fc en un receptor de TNF (factor de necrosis tumoral) humano soluble de 75 kilodalton (p75) acoplado a la porción Fc de IgG1 humana.

Específicamente, el etanercept es una forma de homodímero de dos proteínas de fusión de Fc unidas por 3 enlaces disulfuro, consistiendo cada proteína de fusión de Fc en la porción de unión a ligando extracelular del receptor de TNF p75 humano soluble unido a la porción Fc de IgG1 humana. El componente Fc de etanercept contiene el dominio CH2, el dominio CH3 y la región bisagra, pero no el dominio CH1 de IgG1. El etanercept puede tener un peso molecular de aproximadamente 150 kilodaltons (kDa). Este etanercept puede comercializarse actualmente con el nombre comercial ENBREL® (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA.), y tiene el número CAS 185243-69-0.

El etanercept puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante, pero no se limita a la misma.

El etanercept de la presente invención es un modulador de la inflamación biológico que actúa como inhibidor competitivo de TNF- α , uniéndose al receptor de TNF- α de la superficie celular, para inhibir las respuestas inmunitarias mediadas por TNF- α , y se usa para tratar la artritis reumatoide, psoriasis y espondilitis anquilosante, y está en ensayos clínicos para el tratamiento de la vasculitis, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Crohn.

En la formulación líquida según la presente invención, el etanercept está contenido en una cantidad terapéuticamente eficaz. Preferiblemente, el etanercept está presente en una cantidad de 1 a 100 mg/ml.

Tal como se usa en el presente documento, el término "formulación líquida estabilizada" o "formulación líquida estable" se refiere a una formulación que conserva la identidad fisicoquímica y la integridad del principio terapéuticamente activo, etanercept, durante el almacenamiento en una disolución. Puede realizarse una medición analítica de la estabilidad de etanercept mediante ensayo de estabilidad de proteínas ampliamente conocido en la técnica. La estabilidad puede medirse a una temperatura predeterminada durante un periodo predeterminado. Para un ensayo rápido, la formulación puede almacenarse a una temperatura más alta o "elevada", por ejemplo, 40 °C durante de 2 semanas a 1 mes o más, y su estabilidad dependiente del tiempo medirse en ese momento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "estabilizador" se refiere a un producto químico específico que interacciona con una molécula biológica y/o un excipiente farmacéutico general en una formulación para mejorar su estabilidad. El estabilizador protege generalmente a las proteínas de la tensión inducida por la superficie de contacto aire/disolución y la tensión inducida por la disolución/superficie que provoca agregación de proteínas. En la presente invención, el estabilizador es un componente que reduce la formación de subproductos de etanercept durante el almacenamiento en una disolución para mantener su actividad durante un periodo de tiempo prolongado, y es preferiblemente uno o más seleccionado del grupo que consiste en metionina, lisina, histidina y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Como para los aminoácidos, tanto las formas L como las formas D se incluyen en el alcance de la presente invención. No sólo los aminoácidos en sí tales como metionina, lisina e histidina, si no también análogos, solvatos, hidratos y estereoisómeros, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se encuentran dentro del alcance de la presente invención siempre que muestren sustancialmente el mismo efecto.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sales farmacéuticamente estables" se refiere a compuestos

que se prepararan en forma de sales de los aminoácidos, tales como metionina, lisina e histidina, dentro del intervalo en el que mantienen sus funciones como estabilizadores de la presente invención. Específicamente, puede formar una sal mediante adición de ácido, y por ejemplo, puede formar una sal con un ácido inorgánico (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, etc.), ácido carboxílico orgánico (por ejemplo, ácido acético, ácido haloacético tal como ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido maleico, ácido succínico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido salicílico), ácido de azúcar (ácido glucurónico, ácido galacturónico, ácido glucónico, ácido ascórbico), polisacárido ácido (por ejemplo, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, ácido de arginina), ácido sulfónico orgánico incluyendo éster de azúcar de ácido sulfónico tal como sulfato de condroitina (por ejemplo, ácido metanosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico).

Tal como se usa en el presente documento, el término “análogos” se refiere a compuestos que muestran las mismas funciones que los aminoácidos, tales como metionina, lisina e histidina, usados como estabilizadores de la presente invención. En la presente invención, los aminoácidos tales como metionina, lisina e histidina incluyen los análogos de los mismos. En la presente invención, ejemplos de los análogos pueden incluir análogos de metionina, concretamente, selenometionina, ácido hidroximetilbutanoico, etionina y trifluorometionina, pero no se limitan a los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “subproductos” se refiere a los productos no deseados que reducen la razón del principio terapéuticamente activo, etanercept, en la formulación. Los subproductos típicos incluyen “productos de bajo peso molecular” que resultan de la desnaturalización de etanercept mediante desaminación o hidrólisis, “productos de alto peso molecular” tal como oligómeros y agregados, o mezclas de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “productos de alto peso molecular” incluye fragmentos de etanercept que se agregan posteriormente mediante desnaturalización (por ejemplo, producidos mediante degradación de polipéptidos debido a desaminación o hidrólisis) o mezclas de los mismos. Normalmente, los productos de alto peso molecular son complejos que tienen mayores pesos moleculares que el monómero terapéutico etanercept, y pueden tener un peso molecular de más de aproximadamente 150 kDa.

Tal como se usa en el presente documento, el término “productos de bajo peso molecular” incluye, por ejemplo, polipéptidos terapéuticos producidos mediante desaminación o hidrólisis, concretamente, fragmentos de etanercept. Normalmente, los productos de bajo peso molecular son complejos que tienen menores pesos moleculares que el monómero terapéutico etanercept, y pueden tener un peso molecular de menos de aproximadamente 150 kDa.

La formulación líquida de la presente invención incluye uno o más estabilizadores seleccionados del grupo que consiste en metionina, lisina, histidina, y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Específicamente, la formulación líquida comprende metionina, lisina o histidina como estabilizador, o dos estabilizadores tales como metionina y lisina, metionina e histidina, o lisina e histidina, o tres estabilizadores tales como metionina, lisina e histidina. En la formulación anterior que comprende combinaciones de los aminoácidos, las sales farmacéuticamente estables de metionina, lisina, histidina respectivamente pueden añadirse adicionalmente, o metionina, lisina e histidina pueden ser las formas modificadas de las sales farmacéuticamente estables respectivamente. La formulación líquida comprende preferiblemente metionina, lisina, histidina, metionina y lisina, metionina e histidina, o lisina e histidina, y más preferiblemente metionina como estabilizador.

La metionina es un aminoácido esencial, y tiene la fórmula química de $C_5H_{11}NO_2S$ y un peso molecular de 149,21. La metionina es un aminoácido apolar, y contiene un grupo tioéter ($-S-CH_3$) en su cadena lateral. Tiene un valor de pK_1 de 2,28, valor de pK_2 de 9,21 y valor de punto isoeléctrico (PI) de 5,74. La metionina evita la oxidación de los anticuerpos en formulaciones líquidas para estabilizar los anticuerpos compitiendo con los residuos de metionina de los anticuerpos por su reacción con los radicales hidroxilo libres (Lam *et al.*, J. Pharm. Sci., 86(11): 1250-1255, 1997; Wang, Int. J. Pharm., 185: 129-188, 1999).

La lisina es un aminoácido esencial, y tiene la fórmula química de $C_6H_{14}N_2O_2$ y un peso molecular de 146,19. La lisina es un aminoácido básico, y tiene un valor de pK_1 de 2,18, valor de pK_2 de 8,95, valor de pK_3 de 10,53 y valor de PI de 9,74.

La histidina es un aminoácido esencial con un grupo funcional imidazol que tiene carga positiva en su cadena lateral, y tiene la fórmula química de $C_6H_9N_3O_2$ y un peso molecular de 155,15. La histidina es un aminoácido básico, y tiene un valor de pK_1 de 1,82, valor de pK_2 de 9,17, valor de pK_3 de 6,0 y valor de PI de 7,59.

En cambio, la L-arginina contenida en la formulación comercialmente disponible conocida de etanercept es un aminoácido esencial, y tiene la fórmula química de $C_6H_{14}N_4O_2$ y un peso molecular de 174,2. La arginina es un aminoácido básico, y tiene un valor de pK_1 de 2,17, valor de pK_2 de 9,04, valor de pK_3 de 12,48 y valor de PI de 10,76. Es decir, la metionina, lisina e histidina usadas como estabilizador en la presente invención son totalmente diferentes de la arginina como estabilizador conocido para etanercept en constructo, fórmula química, propiedades fisicoquímicas y tendencia de ionización. La presente invención ha demostrado por primera vez que aminoácidos tales como metionina, lisina e histidina son los estabilizadores apropiados para etanercept.

El contenido del estabilizador en la formulación líquida de la presente invención es de 0,1 a 250 mM, preferiblemente de 1 a 100 mM, y más preferiblemente de 5 a 50 mM.

La formulación líquida de la presente invención puede incluir además cualquier material que está contenido generalmente en formulaciones de fármacos proteicos o fármacos con anticuerpos para aumentar la estabilidad de etanercept según uno o más estabilizadores seleccionados del grupo que consiste en metionina, lisina, histidina, y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas excepto para aquellos que deterioran la función de la presente invención. Por ejemplo, la L-arginina conocida como estabilizador para etanercept puede añadirse a la formulación líquida de la presente invención.

La formulación líquida según la presente invención puede incluir además un tampón además del estabilizador. Tal como se usa en el presente documento, el término "tampón" se refiere al componente que mejora la isotonicidad y la estabilidad química de la formulación, y actúa para mantener un pH fisiológicamente adecuado. El tampón evita un cambio rápido de pH de la formulación líquida para mantener el pH de la disolución para la estabilización de etanercept. Los ejemplos preferidos del tampón incluyen citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato, histidina y Tris, pero no se limitan a los mismos. En la realización específica, el tampón es un tampón fosfato. El tampón puede usarse o bien solo o bien en combinaciones de dos o más de los mismos.

En las diversas realizaciones de la presente invención, la formulación debe tener un pH de aproximadamente 5 a 7,5 o pH de aproximadamente 5,8 a 6,8. En la realización específica, la formulación tiene un pH de aproximadamente 6,0 a 6,6. Los intervalos desde los niveles de pH intermedios hasta los mencionados anteriormente, por ejemplo, de aproximadamente pH 5,2 a aproximadamente pH 6,4 (por ejemplo, pH 6,2) también se pretende que sean parte de esta invención. Por ejemplo, se pretende incluir intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente como límites superiores y/o inferiores. Si es necesario, el pH puede ajustarse mediante técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, el pH puede ajustarse a cualquier intervalo deseable mediante la adición de HCl o mediante la adición de histidina, si es necesario.

En otra realización, el tampón está presente a una concentración de 0,1 a 100 mM, preferiblemente de 1 a 50 mM, y más preferiblemente de 5 a 25 mM. Los intervalos desde las concentraciones intermedias hasta las mencionadas anteriormente también se pretende que sean parte de esta invención. Por ejemplo, se pretende incluir intervalos de concentraciones usando una combinación de cualquiera de las concentraciones mencionadas anteriormente como límites superiores y/o inferiores. En la realización específica, el tampón debe estar presente en una cantidad suficiente para mantener el pH fisiológicamente suficiente.

La formulación líquida según la presente invención puede incluir un agente isotónico además del estabilizador. Tal como se usa en el presente documento, el término "agente isotónico" se refiere a un componente que actúa para mantener parcialmente la isotonicidad de la formulación y el nivel de proteínas, y mantener parcialmente el nivel, la razón o la proporción del polipéptido terapéuticamente activo presente en la formulación. El agente isotónico presenta la misma presión osmótica que el plasma sanguíneo, de forma que puede infundirse por vía intravenosa a un sujeto sin cambiar la presión osmótica del plasma sanguíneo del sujeto. En efecto, en una realización según la presente invención, el agente isotónico está presente en una cantidad suficiente para hacer que la formulación sea adecuada para infusión intravenosa. A menudo, el agente isotónico sirve también como un agente de carga. Como tal, el agente isotónico puede permitir que la proteína supere diversas tensiones tales como congelación y cizalladura.

El agente isotónico sirve para mantener la presión osmótica adecuada en el organismo, cuando se administra etanercept en la disolución al organismo. Los ejemplos del agente isotónico pueden incluir los frecuentemente usados cloruro de sodio, cloruro de potasio, ácido bórico, borato de sodio, manitol, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, maltosa, sacarosa, eritritol, arabitól, xilitol, sorbitol y glucosa, pero no se limita a los mismos. En la realización específica, el agente isotónico es NaCl. Estos agentes isotónicos pueden usarse o bien solos o bien en combinaciones de dos o más de los mismos.

En todavía otra realización, el agente isotónico (por ejemplo, NaCl) está presente a una concentración de 1 a 1000 mM, preferiblemente de 10 a 500 mM, y más preferiblemente de 50 a 250 mM. Los intervalos desde las concentraciones intermedias hasta las mencionadas anteriormente también se pretende que sean parte de esta invención. Por ejemplo, se pretende incluir intervalos de concentraciones usando una combinación de cualquiera de las concentraciones mencionadas anteriormente como límites superiores y/o inferiores. El agente isotónico debe estar presente en una cantidad suficiente para mantener la osmosis de la formulación.

La formulación líquida según la presente invención puede incluir además un excipiente farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos del excipiente pueden incluir azúcares y polioles, tensioactivos, polímeros o similares. Los ejemplos de los azúcares y polioles pueden incluir sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa, galactosa, manitol, sorbitol, glicerol, los ejemplos de los tensioactivos pueden incluir tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 20, polisorbato 80 y poloxámero, y los ejemplos de los polímeros pueden incluir dextrano, polietilenglicol, carboximetilcelulosa, ácido hialurónico y ciclodextrina.

La formulación líquida según la presente invención puede incluir además un conservante. El conservante significa un producto químico que se añade a formulaciones farmacéuticas como agente antimicrobiano. Los ejemplos del conservante pueden incluir cloruro de benzalconio, bencetonio, clorhexidina, fenol, m-cresol, alcohol bencílico, metilparabeno, propilparabeno, clorobutanol, o-cresol, p-cresol, cloro-cresol, nitrato fenilmercúrico, timerosal y ácido benzoico, pero no se limitan a los mismos. Estos conservantes pueden usarse o bien solos o bien en combinaciones de dos o más de los mismos.

En la realización específica, la formulación de la presente invención es una formulación líquida estable que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de metionina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tampón fosfato, y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio. Más específicamente, la formulación de la presente invención es la formulación líquida estable que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 100 mM de metionina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 50 mM de tampón fosfato, y de 1 a 500 mM de cloruro de sodio, a pH de 6,0 a 6,6.

En la realización específica, la formulación de la presente invención es una formulación líquida estable que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de histidina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tampón fosfato, y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio. Más específicamente, la formulación de la presente invención es la formulación líquida estable que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 100 mM de histidina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 50 mM de tampón fosfato, y de 1 a 500 mM de cloruro de sodio, a pH de 6,0 a 6,6.

En la realización específica, la formulación de la presente invención es una formulación líquida estable que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de lisina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tampón fosfato, y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio. Más específicamente, la formulación de la presente invención es la formulación líquida estable que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 100 mM de lisina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 50 mM de tampón fosfato, y de 1 a 500 mM de cloruro de sodio, a pH de 6,0 a 6,6.

En la realización específica, la formulación de la presente invención es una formulación líquida estable que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de histidina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 250 mM de lisina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tampón fosfato, y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio. Más específicamente, la formulación de la presente invención es la formulación líquida estable que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 1 a 50 mM de histidina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 1 a 100 mM de lisina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 50 mM de tampón fosfato, y de 1 a 500 mM de cloruro de sodio, a pH de 6,0 a 6,6.

En la realización específica, la formulación de la presente invención es una formulación líquida estable que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de histidina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 250 mM de metionina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tampón fosfato, y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio. Más específicamente, la formulación de la presente invención es la formulación líquida estable que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 1 a 50 mM de histidina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 1 a 100 mM de metionina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 50 mM de tampón fosfato, y de 1 a 500 mM de cloruro de sodio, a pH de 6,0 a 6,6.

En la realización específica, la formulación de la presente invención es una formulación líquida estable que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de metionina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 250 mM de lisina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tampón fosfato, y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio. Más específicamente, la formulación de la presente invención es la formulación líquida estable que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 1 a 50 mM de metionina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, de 1 a 50 mM de lisina o sales farmacéuticamente estables de la misma, de 0,1 a 50 mM de tampón fosfato, y de 1 a 500 mM de cloruro de sodio, a pH de 6,0 a 6,6.

La formulación de la presente invención puede usarse para el tratamiento de una enfermedad en la que etanercept es terapéuticamente eficaz. El etanercept es un modulador de la inflamación biológico para inhibir las respuestas inmunitarias mediadas por TNF- α , y la formulación de la presente invención se usa para tratar la artritis reumatoide, psoriasis, espondilitis anquilosante, vasculitis, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Crohn, sin limitarse a las mismas. La formulación de la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral, es decir, por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraabdominal, vía transdérmica y/o por vía intravenosa, pero no se limita a las mismas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para aumentar la estabilidad de etanercept usando una formulación líquida que comprende uno o más estabilizadores seleccionados del grupo que consiste en metionina, lisina, histidina, y sales farmacéuticamente estables de las mismas.

La formulación líquida puede aumentar la estabilidad en almacenamiento de etanercept reduciendo los subproductos

de etanercept que se producen debido a la desnaturalización durante el almacenamiento.

Modo para la invención

- 5 A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solamente con fines ilustrativos, y no se pretende que la invención quede limitada por estos ejemplos.

<Ejemplo 1> Prueba de estabilidad de formulación acuosa de etanercept según la adición de estabilizador

10 Con el fin de investigar el estabilizador óptimo para la preparación de la formulación acuosa estable de etanercept, se añadió histidina como estabilizador a una disolución de fosfato 5 mM a la que se añadió etanercept hasta una concentración de 50 mg/ml, y se añadió cloruro de sodio a la misma como agente isotónico para preparar la formulación 1.

15 Además, se añadió etanercept a una disolución de fosfato 10 mM hasta una concentración de 50 mg/ml, y se añadió cloruro de sodio a la misma como agente isotónico. Entonces, se añadieron cada uno de lisina, arginina, metionina, glicina, polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 188, propilenglicol, sulfato de protamina, sacarosa y guanidina HCl para preparar las formulaciones 2 a 12.

20 Finalmente, se añadió cloruro de sodio como agente isotónico a una disolución de fosfato 10 mM a la que se añadió etanercept hasta una concentración de 50 mg/ml para preparar una formulación libre de estabilizador. Se muestran las composiciones de estabilizador de las formulaciones en la siguiente tabla 1. Se colocaron cada 0,5 ml de la formulación preparada en jeringas de vidrio de 1,0 ml, se sellaron y se almacenaron a 50 °C.

25 Tabla 1
[Tabla 1]

	Composición de estabilizador
Formulación 1	Histidina 10 mM
Formulación 2	Lisina 25 mM
Formulación 3	Arginina 25 mM
Formulación 4	Metionina 25 mM
Formulación 5	Glicina al 1 %
Formulación 6	Tween 20 al 0,1 %
Formulación 7	Tween 80 al 0,1 %
Formulación 8	F68 al 0,1 %
Formulación 9	Propilenglicol al 0,1 %
Formulación 10	Sulfato de protamina al 0,03 %
Formulación 11	Sacarosa al 2 %
Formulación 12	Guanidina HCl al 0,2 %
formulación libre de estabilizador	

30 Sólo la formulación 4 está dentro del alcance de la reivindicación 1.

35 Tras 7 días de almacenamiento a 50 °C, se analizaron mediante SE-HPLC las formulaciones 1 a 12 y la formulación libre de estabilizador de la tabla 1 para examinar los tipos de productos de bajo peso molecular y productos de alto peso molecular tales como oligómeros y agregados que resultan de la desnaturalización de etanercept, y se representó la cantidad total de estos productos como impureza total. Además, se examinaron cambios estructurales de etanercept mediante HI-HPLC. En HI-HPLC, se separaron sustancias relacionadas con etanercept en 4 picos, incluyendo pico previo, pico 1, pico 2 y pico 3. El pico previo y el pico 1 representan productos de bajo peso molecular, el pico 2 representa etanercept, y el pico 3 representa dímeros con baja agregación o actividad. Por tanto, se representó la cantidad total de pico previo, pico 1 y pico 3 como impureza total. Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3, respectivamente.

40 Tabla 2
45 [Tabla 2]

	Impureza total mediante SE-HPLC (%)	
	Día 0	Día 7
Formulación 1	4,6	22,2
Formulación 2	4,7	24,8
Formulación 3	4,6	24,2

Formulación 4	4,6	20,8
Formulación 5	4,6	28,5
Formulación 6	4,7	29,4
Formulación 7	4,6	29,0
Formulación 8	4,6	28,8
Formulación 9	4,7	27,8
Formulación 10	4,6	29,4
Formulación 11	4,8	28,4
Formulación 12	4,7	27,5
formulación libre de estabilizador	4,7	30,2

Tabla 3

[Tabla 3]

5

	Impureza total mediante HI-HPLC (%)	
	Día 0	Día 7
Formulación 1	14,7	33,7
Formulación 2	14,6	34,9
Formulación 3	15,0	34,3
Formulación 4	15,2	30,3
Formulación 5	14,8	36,6
Formulación 6	15,2	35,5
Formulación 7	15,2	36,2
Formulación 8	15,4	35,5
Formulación 9	15,2	35,1
Formulación 10	15,0	36,9
Formulación 11	14,9	35,1
Formulación 12	15,1	34,8
formulación libre de estabilizador	14,4	41,9

Tal como se muestra en los resultados de SE-HPLC de la tabla 2, cuando se almacenó a 50 °C durante 7 días, la formulación 1 que contenía histidina como estabilizador mostró una impureza total del 22,2 %, la formulación 2 que contenía lisina como estabilizador mostró una impureza total del 24,8 %, la formulación 3 que contenía arginina como estabilizador mostró una impureza total del 24,2 %, la formulación 4 que contenía metionina como estabilizador mostró una impureza total del 20,8 %. Todas ellas mostraron una impureza total notablemente baja, en comparación con la formulación libre de estabilizador que mostró una impureza total del 30,2 %. Cuando se compararon estas formulaciones con la formulación 3 que usaba L-arginina como estabilizador (patente estadounidense n.º 7.648.702), la formulación 2 que contenía lisina mostró una impureza total similar del 24,8 %, y la formulación 1 que contenía histidina y la formulación 4 que contenía metionina mostraron una impureza total reducida del 22,2 % y el 20,8 %, respectivamente.

Los resultados de HI-HPLC de la tabla 3 son similares a los resultados de SE-HPLC. La formulación libre de estabilizador mostró una impureza total del 41,9 %. Por el contrario, cada una de las formulaciones 1, 2, 3 y 4 mostraron una impureza total del 33,7 %, el 34,9 %, el 34,3 % y el 30,3 % respectivamente, indicando que histidina, lisina, L-arginina y metionina añadidas en cada formulación tienen los efectos de evitar la desnaturalización de etanercept. En particular, la formulación 4 que contenía metionina mostró la impureza total más baja, indicando que la metionina es la más eficaz en la estabilización de etanercept.

Por consiguiente, la presente invención demostró que lisina, histidina y metionina tienen efectos de estabilización de etanercept evitando su desnaturalización, que son equivalentes o mayores que los de L-arginina, y en particular, metionina es más eficaz en la estabilización de etanercept que L-arginina.

<Ejemplo 2> Prueba de estabilidad de formulación acuosa de etanercept según la concentración de metionina

Con el fin de investigar la concentración óptima de metionina para la estabilización de etanercept, se añadió cloruro de sodio 120 mM a disoluciones de fosfato 10 mM, y se añadió a las mismas cada una de las metioninas 25 mM y 12,5 mM, tras lo cual se añadió etanercept en una concentración de 50 mg/ml para preparar las formulaciones 13 y 14, respectivamente. Según la preparación de una formulación acuosa de etanercept comercialmente disponible, se añadió L-arginina 25 mM a cloruro de sodio 100 mM y sacarosa al 1 % en una disolución de fosfato 10 mM, y se añadió etanercept hasta una concentración de 50 mg/ml para preparar un control. Se colocaron cada 0,5 ml de la formulación en jeringas de vidrio de 1,0 ml, se sellaron y se almacenaron a 40 °C, 25 °C y 4 °C. Se muestran las composiciones de las formulaciones acuosas preparadas en la siguiente tabla 4.

Tabla 4

[Tabla 4]

	Composición
Formulación 13	Etanercept 50 mg/ml, disolución de fosfato 10 mM, NaCl 120 mM, metionina 25 mM (pH 6,3)
Formulación 14	Etanercept 50 mg/ml, disolución de fosfato 10 mM, NaCl 120 mM, metionina 12,5 mM (pH 6,3)
Control	Etanercept 50 mg/ml, disolución de fosfato 25 mM, NaCl 100 mM, sacarosa al 1%, L-arginina 25 mM (pH 6,3)

5 Después de que se almacenaran la formulación 13, la formulación 14 y el control a 40 °C durante 1 y 3 semanas, y a 25 °C y 4 °C durante 4 y 8 semanas cada una, se midió su impureza total mediante SE-HPLC y HI-HPLC, como en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en las tablas 5 y 6, respectivamente.

10 Tabla 5

[Tabla 5]

	Impureza total mediante SE-HPLC (%)								
	40 °C			25 °C			4 °C		
	0 semanas	1 semana	3 semanas	0 semanas	4 semanas	8 semanas	0 semanas	4 semanas	8 semanas
Formulación 13	5,5	11,5	20,5	5,5	14,8	18,8	5,5	8,8	10,2
Formulación 14	5,5	12,5	22,0	5,5	16,0	19,9	5,5	8,9	10,5
Control	5,5	13,4	23,3	5,5	16,2	20,4	5,5	8,8	10,3

15 Tabla 6

[Tabla 6]

	Impureza total mediante HI-HPLC (%)								
	40 °C			25 °C			4 °C		
	0 semanas	1 semana	3 semanas	0 semanas	4 semanas	8 semanas	0 semanas	4 semanas	8 semanas
Formulación 13	10,0	15,9	21,6	10,0	15,3	18,5	10,0	11,0	11,9
Formulación 14	9,9	17,0	23,3	9,9	16,7	19,8	9,9	11,3	11,6
Control	10,2	18,0	25,5	10,2	17,4	20,6	10,2	10,0	11,9

20 Tal como se muestra en los resultados de las tablas 5 y 6, la formulación 13 y la formulación 14 que contenían metionina como estabilizador mostraron baja producción de impurezas en todas las condiciones de almacenamiento de 40 °C, 25 °C y 4 °C, en comparación con el grupo de control preparado según el método de preparación de una formulación acuosa de etanercept comercialmente disponible. Específicamente, los resultados de SE-HPLC e HI-HPLC mostraron que la formulación 13 que contenía metionina 25 mM y la formulación 14 que contenía metionina 12,5 mM mostraron menor producción de impurezas a 40 °C y 3 semanas, y a 25 °C y 8 semanas, y similar producción de impurezas a 4 °C y 8 semanas, en comparación con el control. Estos resultados indican que la formulación que contiene metionina de la presente invención es una formulación más estable para mantener la actividad de etanercept durante un periodo de tiempo prolongado que la formulación comercialmente disponible.

30 En conclusión, la presente invención demostró que la formulación acuosa de etanercept que contiene metionina evita la desnaturalización de etanercept para mantener su actividad durante un periodo de tiempo prolongado, y que la metionina es muy eficaz como estabilizador en la formulación acuosa de etanercept.

35 <Ejemplo 3> Prueba de estabilidad de formulación acuosa de etanercept que comprende histidina y lisina, o histidina y metionina

Se añadieron histidina 5 mM y lisina 25 mM como estabilizador a una disolución de fosfato 10 mM a la que se añadió etanercept hasta una concentración de 50 mg/ml, y se añadió cloruro de sodio a la misma como agente isotónico para preparar la formulación 15.

- 5 Además, se añadieron histidina 5 mM y metionina 25 mM como estabilizador a una disolución de fosfato 10 mM a la que se añadió etanercept hasta una concentración de 50 mg/ml, y se añadió cloruro de sodio a la misma como agente isotónico para preparar la formulación 16.

- 10 Finalmente, se añadió cloruro de sodio como agente isotónico a una disolución de fosfato 10 mM y se añadió etanercept a la misma hasta una concentración de 50 mg/ml para preparar una formulación libre de estabilizador.

Se pusieron cada 0,5 ml de la formulación preparada en jeringas de vidrio de 1,0 ml, se sellaron y se almacenaron a 50 °C.

- 15 Se muestran las composiciones de estabilizador de las formulaciones en la siguiente tabla 7.

Tabla 7

[Tabla 7]

20

	Composición de estabilizador
Formulación 15	Histidina 5 mM + Lisina 25 mM
Formulación 16	Histidina 5 mM + Metionina 25 mM
formulación libre de estabilizador	-

Sólo la formulación 16 está dentro del alcance de la reivindicación 1.

- 25 Tras 7 días de almacenamiento a 50 °C, se analizaron las formulaciones 15, 16 y la formulación libre de estabilizador de la tabla 7 mediante SE-HPLC como en el ejemplo 1 para medir su impureza total. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8

30 [Tabla 8]

	Impureza total mediante SE-HPLC (%)	
	0 días	7 días
Formulación 15	4,7	21,5
Formulación 16	4,7	20,9
formulación libre de estabilizador	4,7	30,2

- 35 Tal como se muestra en los resultados de SE-HPLC de la tabla 8, cuando se almacenó a 50 °C durante 7 días, la formulación 16 que contenía histidina como estabilizador mostró una impureza total del 21,5 %, y mostró una impureza total notablemente baja, en comparación con la formulación libre de estabilizador que mostró una impureza total del 30,2 %. Y la formulación 16 mostró una impureza total notablemente baja, en comparación con la formulación 1 que contenía histidina 10 mM que mostró una impureza total del 22,2 %, y la formulación 2 que contenía lisina 25 mM que mostró una impureza total del 24,8 %.

- 40 Es decir, la presente invención demostró que la formulación que comprende histidina y lisina tiene los efectos notablemente excelentes de evitar la desnaturalización de etanercept reduciendo la cantidad de impureza total durante el almacenamiento, en comparación con la formulación libre de estabilizador y comprendiendo cada formulación histidina, lisina y metionina respectivamente.

- 45 Además, tal como se muestra en los resultados de SE-HPLC de la tabla 8, cuando se almacenó a 50 °C durante 7 días, la formulación 16 que contenía histidina como estabilizador mostró una impureza total del 20,9 %, que es notablemente baja, en comparación con la formulación libre de estabilizador que mostró una impureza total del 30,2 %. En particular, la formulación 16 mostró una impureza total baja en comparación con la formulación 15 que contenía histidina y lisina como estabilizador.

50

Es decir, la presente invención demostró que la formulación que comprende histidina y metionina tiene efectos notables a la hora de evitar la desnaturalización de etanercept reduciendo la cantidad de impureza total durante el almacenamiento, en comparación con la formulación libre de estabilizador.

- 55 <Ejemplo 4> Prueba de estabilidad de formulación acuosa de etanercept que comprende metionina y lisina

Se añadieron metionina 12,5 mM y lisina 12,5 mM como estabilizador a una disolución de fosfato 10 mM a la que se añadió etanercept hasta una concentración de 50 mg/ml, y se añadió cloruro de sodio a la misma como agente isotónico para preparar la formulación 17.

- 5 Además, se añadió cloruro de sodio como agente isotónico a una disolución de fosfato 10 mM y se añadió etanercept a la misma hasta una concentración de 50 mg/ml para preparar una formulación libre de estabilizador.

Se pusieron cada 0,5 ml de la formulación preparada en jeringas de vidrio de 1,0 ml, se sellaron y se almacenaron a 50 °C. Se muestran las composiciones de estabilizador de las formulaciones en la siguiente tabla 9.

10

Tabla 9

[Tabla 9]

	Composición de estabilizador
Formulación 17	Metionina 12,5 mM +Lisina 12,5 mM
formulación libre de estabilizador	-

15

Tras 7 días de almacenamiento a 50 °C, se analizaron la formulación 17 y la formulación libre de estabilizador de la tabla 9 mediante SE-HPLC como en el ejemplo 1 para medir su impureza total. Los resultados se muestran en la tabla 10.

20 Tabla 10

[Tabla 10]

	Impureza total mediante SE-HPLC (%)	
	0 días	7 días
Formulación 17	5,2	27,0
formulación libre de estabilizador	5,2	32,8

- 25 Tal como se muestra en los resultados de SE-HPLC de la tabla 10, cuando se almacenó a 50 °C durante 7 días, la formulación 17 que contenía metionina y lisina como estabilizador mostró una impureza total del 27 %, que es notablemente baja, en comparación con la formulación libre de estabilizador que mostró una impureza total del 32,8 %.

- 30 Es decir, la presente invención demostró que la formulación que comprende metionina y lisina tiene efectos notables sobre la estabilización de etanercept reduciendo la cantidad de impureza total, en comparación con la formulación libre de estabilizador.

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n l3quida de etanercept, que comprende etanercept; y metionina, o sales farmac3uticamente aceptables de la misma como estabilizador, en la que la formulaci3n tiene estabilidad en almacenamiento aumentada de etanercept en comparaci3n con la formulaci3n que comprende arginina como estabilizador, reduciendo los subproductos de etanercept que se producen debido a desnaturalizaci3n durante el almacenamiento.
5
2. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 1, que comprende adem3s uno o m3s estabilizadores seleccionados del grupo que consiste en lisina, histidina, y sales farmac3uticamente aceptables de las mismas.
10
3. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 1, en la que el estabilizador est3 presente en una cantidad de 0,1 a 250 mM.
15
4. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 1, en la que el etanercept est3 presente en una cantidad de 1 a 100 mg/ml.
20
5. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 1, en la que la formulaci3n tiene un pH de 5 a 7,5.
20
6. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 1, que comprende adem3s uno o m3s materiales seleccionados del grupo que consiste en un tamp3n, un agente isot3nico, un excipiente o un conservante.
25
7. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 6, en la que el tamp3n se selecciona del grupo que consiste en citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato, histidina y Tris.
25
8. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 6, en la que el tamp3n est3 presente en una cantidad de 0,1 a 100 mM.
30
9. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 6, en la que el agente isot3nico se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de potasio, 3cido b3rico, borato de sodio, manitol, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, maltosa, sacarosa, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y glucosa.
35
10. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 6, en la que el agente isot3nico est3 presente en una cantidad de 1 a 1000 mM.
40
11. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 1, que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de metionina o sales farmac3uticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tamp3n fosfato y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio.
40
12. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 1, que comprende etanercept, metionina y lisina como estabilizador.
45
13. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 1, que comprende etanercept, metionina e histidina como estabilizador.
45
14. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 2, que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de histidina o sales farmac3uticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 250 mM de metionina o sales farmac3uticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tamp3n fosfato y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio.
50
15. Formulaci3n l3quida seg3n la reivindicaci3n 2, que comprende de 1 a 100 mg/ml de etanercept, de 0,1 a 250 mM de metionina o sales farmac3uticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 250 mM de lisina o sales farmac3uticamente aceptables de la misma, de 0,1 a 100 mM de tamp3n fosfato y de 1 a 1000 mM de cloruro de sodio.
55