

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 921**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2011 PCT/IN2011/000313**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011 WO11141926**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2011 E 11780312 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2568960**

54 Título: **Formulación líquida de polipéptidos que contienen un dominio Fc de una inmunoglobulina**

30 Prioridad:

10.05.2010 IN 1465MU2010

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

05.10.2018

73 Titular/es:

**Intas Pharmaceuticals Limited (100.0%)
Corporate House, Nr. Sola Bridge S.G. Highway,
Thaltej, Ahmedabad - 380054, Gujrat, IN**

72 Inventor/es:

**TUNGA, BINITA SHRIVASTAVA;
SHARMA, SACHIN;
DUA, RAJIV;
DUTTA, SOURABH;
MALLUBHOTLA, HANUMAN;
PANDEY, VIJAYKANT y
CHHATBAR, CHANDRESH**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 684 921 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 de polipéptidos que contienen un dominio Fc de una inmunoglobulina

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a una formulación acuosa que comprende TNFR:Fc, métodos de fabricación de la composición, métodos de administración y kits que contienen la misma.

10 **Estado de la técnica**

El factor de necrosis tumoral es una citocina de polipéptido implicada en inflamación y respuesta de fase aguda. TNF-alfa está presente en mayores cantidades en personas con artritis reumatoide o enfermedad de Crohn. La inhibición directa de TNF-alfa por los agentes biológicos ha producido avances significativos en el tratamiento de la artritis reumatoide y ha validado la inhibición extracelular de esta citocina proinflamatoria como una terapia eficaz. Un agente biológico tal es Etanercept.

Etanercept (TNFR:Fc) es una proteína de fusión dimérica que consiste en la porción de unión a ligando extracelular del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR) humano de 75 kiloDalton (p75) unido a la porción Fc de IgG1 humana. El componente Fc de Etanercept consiste en el dominio CH², el dominio CH³ y la región bisagra, mientras que el dominio CH¹ está ausente. Se produce mediante tecnología de ADN recombinante en un sistema de expresión en células de mamífero de ovario de hámster chino. Consiste en 934 aminoácidos, y tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kiloDalton.

Generalmente, las proteínas tienen una semivida muy corta, y experimentan desnaturalización (tal como agregación, disociación y adsorción sobre la superficie de receptores) tras la exposición a diversos factores tales como temperaturas desfavorables, interfase agua-aire, alta presión, estrés físico/ mecánico, disolventes orgánicos y contaminación microbiana. Por consiguiente, la proteína desnaturalizada pierde las propiedades fisicoquímicas intrínsecas y la actividad fisiológica. La desnaturalización de proteínas es frecuentemente irreversible, y por tanto las proteínas, una vez desnaturalizadas, pueden no recuperar sus propiedades nativas al estado inicial.

En la industria biofarmacéutica, el almacenamiento a largo plazo de proteínas, preparadas usando tecnología de ADN recombinante en formulaciones acuosas, es generalmente una tarea difícil. Para vencer el problema de la estabilidad de las proteínas en formulaciones acuosas, se preparan productos de proteína terapéuticos más estables mediante liofilización (secado por congelación). Los productos liofilizados van normalmente acompañados de medios acuosos estériles para reconstitución. Después de la reconstitución, las formulaciones normalmente tienen vidas de almacenamiento útiles cortas, incluso cuando se almacenan a bajas temperaturas (por ejemplo, 5 °C). Ejemplo de inhibidores de TNF-alfa que están disponibles en el mercado en la forma liofilizada son Enbrel® y Remicade® y ambas las composiciones deben reconstituirse antes de uso.

Prácticas típicas para mejorar la estabilidad de polipéptidos pueden ser tratadas variando la concentración de elementos con la formulación, o añadiendo excipientes para modificar la formulación.

El documento US5580856 desvela la estabilización de proteínas secadas contra la pérdida de actividad biológica en las formulaciones añadiendo un estabilizador de la reconstitución tras la rehidratación de la proteína seca. También se describe un kit para producir una formulación disolviendo la composición seca en un disolvente que contiene el estabilizador de la reconstitución.

El documento US6171586 desvela una formulación farmacéutica acuosa estable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo no sometido a liofilización previa, un tampón que mantiene el pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0, un tensioactivo y un poliol, junto con usos para una formulación tal.

El documento EP1314437 se refiere a una invención de preparaciones estabilizadas que contienen un anticuerpo en un tampón glicina y/o un tampón histidina y también proporciona procesos de preparación de una preparación estabilizada que contiene proteína, que comprende ajustar el pH con un aminoácido básico o un derivado de aminoácido básico o una sal del mismo.

El documento EP1478394 desvela aproximadamente la invención que se refiere a una composición farmacéutica acuosa adecuada para almacenamiento a largo plazo de polipéptidos que contienen un dominio Fc de una inmunoglobulina, métodos de fabricación, métodos de administración y kits que contienen la misma.

El documento WO 2007/092772 desvela la formulación líquida de proteína de variante de Fc que mejora la estabilidad en parte reduciendo la tendencia de tales moléculas a agregarse rápidamente.

65

El documento WO 2010/077422 se refiere a formulaciones de una molécula de unión al antígeno de dominio único, por ejemplo, moléculas de nanocuerpo, en formulación particular de moléculas de nanocuerpo que se unen a TNF.

El documento US20060240520 desvela ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de BAFF-R, además de anticuerpos contra polipéptidos de BAFF-R y composiciones farmacéuticas que incluyen los mismos.

El documento US20080071063 proporciona formulaciones de proteínas que comprenden una región Fc de variante que mejora la estabilidad reduciendo en parte la tendencia de tales moléculas a agregarse rápidamente.

10 Así, se desea proporcionar formulaciones líquidas de TNFR:Fc que tengan estabilidad potenciada bajo refrigeración y al menos estabilidad moderada a temperatura ambiente normal, y para evitar el inconveniente y las posibilidades de errores del procedimiento de reconstitución.

Explicación de la invención

15 La invención proporciona una novedosa formulación líquida que comprende TNFR:Fc que presenta estabilidad a largo plazo a 4 °C y temperatura ambiente.

En una realización, la invención proporciona una formulación farmacéutica acuosa que comprende TNFR:Fc, un inhibidor de la agregación, un tampón, un tensioactivo no iónico, un estabilizador, un modificador de la tonicidad, y opcionalmente un conservante, en la que el inhibidor de la agregación es ácido aspártico, opcionalmente en combinación con lisina y en la que la formulación farmacéutica comprende además EDTA como agente quelante e inhibidor de la fragmentación.

25 En otra realización de la invención, el tampón de formulación comprende tampón fosfato, tampón bicarbonato, tampón succinato, tampón acetato, tampón citrato, aminoácidos, tampón Tris, tanto solos como en combinación adecuada, dando el intervalo de pH adecuado de 5,5 a 7,5, y preferentemente el tampón se selecciona 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, o una combinación de los mismos, y más preferentemente el tampón es tampón fosfato en combinación con sus sales de sodio y potasio.

En otra realización más de la invención, el tensioactivo no iónico de formulación se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo no iónico basado en polisorbato y un tensioactivo no iónico basado en poloxámero o una combinación de los mismos, y preferentemente el tensioactivo no iónico es polisorbato 20.

35 En otra realización más de la invención, el estabilizador de la formulación se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos tales como glicina, alanina, lisina, prolina y serina, y sus sales, tanto solos como en combinación, monosacáridos tales como glucosa y manosa, y similares, tanto solos como en combinación, disacáridos tales como sacarosa, trehalosa, y maltosa, y similares, tanto solo como en combinación, alcoholes de azúcar tales como manitol y sorbitol, y similares, tanto solos como en combinación, y polisacáridos tales como dextrano, polietilenglicol y similares, tanto solos como en combinación, y preferentemente el estabilizador es sacarosa.

En otra realización más de la invención, el modificador de la tonicidad de la formulación se selecciona del grupo que consiste en cloruro sódico, cloruro de potasio, sulfato de sodio o una combinación de los mismos, y preferentemente el modificador de la tonicidad es cloruro sódico.

En otra realización más de la invención, el conservante de la formulación se selecciona del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, cloro-cresol, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio o tiomersal, tanto solos como en combinación de los mismos.

50 En una realización preferida de la invención, la formulación comprende ácido aspártico y lisina como inhibidores de la agregación, tampón fosfato de sodio-potasio que da el intervalo de pH deseado de 5,5 a 7,5, cloruro sódico como modificador de la tonicidad, sacarosa como estabilizador, polisorbato 20 como tensioactivo no iónico, EDTA como inhibidor de la fragmentación y agente quelante y TNFR:Fc a una concentración de 10 mg/ml a 100 mg/ml.

55 En una realización más preferida de la invención, la formulación comprende de 25 a 50 mg/ml de TNFR:Fc, de 1 mM a 50 mM de ácido aspártico, de 1 mM a 50 mM de lisina, de 10 mM a 50 mM de fosfato sódico-potásico, del 0,75 % al 3 % de sacarosa, de 50 a 150 mM de NaCl, de 0,1 mM a 2 mM de EDTA, de 0,05 mg/ml a 1,0 mg/ml de polisorbato 20, y un pH 6,0 a pH 7,0.

60 En una realización incluso más preferida de la invención, la formulación es una solución acuosa inyectable. En otro aspecto, la invención desvela el uso de EDTA para prevenir la fragmentación de TNFR:Fc en una formulación farmacéutica acuosa.

65 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un polipéptido que contiene un dominio Fc de una

inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo monoclonal, proteína de fusión y TNFR:Fc.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La **Figura 1a (No reductora) y Figura 1b (Reductora)** muestra la comparación del patrón de degradación de formulaciones de Etanercept con diferentes inhibidores de la agregación, mantenidas a 40 °C en el día cero.
- Carril 1:** Especialidad farmacéutica de referencia
Carril 2: F-1 como se da en la Tabla 1
 10 **Carril 3:** F-2 como se da en la Tabla 1
Carril 4: F-3 como se da en la Tabla 1
Carril 5: F-4 como se da en la Tabla 1
- La **Figura 2a (No reductora) y Figura 2b (Reductora)** muestra la comparación del patrón de degradación de formulaciones de Etanercept con diferentes inhibidores de la agregación, mantenidas a 40 °C durante 1 mes.
- Carril 1:** Especialidad farmacéutica de referencia
Carril 2: F-1 como se da en la Tabla 1
 20 **Carril 3:** F-2 como se da en la Tabla 1
Carril 4: F-3 como se da en la Tabla 1
Carril 5: F-4 como se da en la Tabla 1
- La **Figura 3a (No reductora) y Figura 3b (Reductora)** muestra la comparación del patrón de degradación de formulaciones de Etanercept con diferentes inhibidores de la agregación, mantenidas a 47 °C durante 16 horas.
- Carril 1:** Especialidad farmacéutica de referencia
Carril 2: F-3 como se da en la Tabla 1
Carril 3: F-1 como se da en la Tabla 1
 30 **Carril 4:** Marcador
- La **Figura 4** muestra la comparación del patrón de degradación de formulaciones de Etanercept con diferentes inhibidores de la agregación, mantenidas a 55 °C durante 24 horas.
- Carril 1:** Especialidad farmacéutica de referencia
 35 **Carril 2:** F-3 como se da en la Tabla 1
Carril 3: F-1 como se da en la Tabla 1
Carril 4: Marcador
- La **Figura 5a (No reductora) y Figura 5b (Reductora)** muestra la comparación del patrón de degradación de formulaciones de Etanercept con lisina como estabilizador, mantenidas a 40 °C durante 7 días.
- Carril 1:** Especialidad farmacéutica de referencia
Carril 2: F-5 como se da en la Tabla 1
Carril 3: F-3 como se da en la Tabla 1
 45 **Carril 4:** Marcador
- La **Figura 6a (No reductora) y Figura 6b (Reductora)** muestra la comparación del patrón de degradación de formulaciones de Etanercept, mantenidas a 40 °C en el día cero para la comprobación del efecto de EDTA.
- 50 **Carril 1:** Sin EDTA
Carril 2: Con EDTA
Carril 3: Marcador
- La **Figura 7a (No reductora) y Figura 7b (Reductora)** muestra la comparación del patrón de degradación de formulaciones de Etanercept, mantenidas a 40 °C durante 3 días.
- Carril 1:** Sin EDTA
Carril 2: Con EDTA
Carril 3: Marcador
 60
- La **Figura 8a, Figura 8b y Figura 8c** muestra el perfil de DSC de formulaciones de Etanercept con diferente tampón y su sal.
 La **Figura 9** muestra puntos medios de transición comparativos de las formulaciones (F6 a F8).
 La **Figura 10** muestra la bioactividad comparativa de la masa formulada final y RMP
 65 La **Figura 11** muestra la degradación comparativa por SE-HPLC en F6, F8 y RMP.

La **Figura 12** muestra el perfil de HIC comparativo de F8 y RMP, mantenidas a -20 °C durante 3 meses
 La **Figura 13** muestra el perfil de HIC comparativo de F8 y RMP, mantenidas a 5±3 °C durante 3 meses
 La **Figura 14** muestra el perfil de HIC comparativo de F8 y RMP, mantenidas a 25±2 °C durante 3 meses
 La **Figura 15** muestra el perfil de HIC comparativo de F8 y RMP, mantenidas a 40 °C durante 3 meses

5

Descripción de la invención

La presente formulación farmacéutica comprende un polipéptido purificado, tampón, inhibidores de la agregación, modificadores de la tonicidad, estabilizadores, tensioactivos, agentes quelantes y opcionalmente con conservante en combinaciones adecuadas de los mismos.

Se usan anticuerpos monoclonales en alta concentración para uso terapéutico y se sabe que la alta concentración de proteína aumenta la agregación. En un aspecto, se requieren inhibidores de la agregación en las composiciones de formulación para mantener el producto en estado nativo, además de biológicamente activo con estabilidad en almacén y condiciones de almacenamiento potenciadas. Hay algunos aminoácidos que actúan de inhibidores de la agregación aumentando la tensión superficial, unión preferencial o hidratación e interacción preferencial.

Los inhibidores de la agregación reducen la tendencia de un polipéptido para formar agregados. Los aminoácidos como el ácido aspártico, fenilalanina, ácido glutámico, alanina, histidina y lisina actúan reduciendo la agregación del dominio Fc de TNFR:Fc en una formulación durante largos periodos y son realizaciones preferidas de la invención.

En otro aspecto, se requieren tampones para mantener el pH de la formulación. El sistema tampón de la presente invención comprende tampón fosfato, tampón bicarbonato, tampón succinato, tampón acetato, tampón citrato, aminoácidos, tampón Tris, tanto solos como en combinación adecuada, dando el intervalo de pH deseado de 5,5 a 7,5.

En la presente invención, se usa tensioactivo con el fin de prevenir la adsorción de TNFR:Fc sobre la superficie del vial, ampolla, carpule, cartucho o jeringa. Los tensioactivos reducen la tensión superficial de una solución de proteínas, previniendo así su adsorción o agregación sobre una superficie hidrófoba. Tensioactivos preferidos de la presente invención incluyen un tensioactivo no iónico basado en polisorbato y copolímero de polioxietileno, polivinilpirrolidona, tanto solos como en combinación.

En una realización, los estabilizadores usados en la presente invención están seleccionados del grupo que consiste en: aminoácidos tales como glicina, alanina, lisina, prolina, serina y similares, y sus sales, tanto solo como en combinación, monosacárido tal como glucosa y manosa, y similares, tanto solos como en combinación, disacáridos tales como sacarosa, trehalosa, y maltosa, y similares, tanto solos como en combinación, alcoholes de azúcar tales como manitol y sorbitol, y similares, tanto solos como en combinación, y polisacáridos tales como dextrano, polietilenglicol y similares, tanto solos como en combinación.

Un modificador de la tonicidad se entiende que es una molécula que contribuye a la osmolalidad de una solución. La osmolalidad de una composición farmacéutica se regula preferentemente con el fin de maximizar la estabilidad del principio activo y también minimizar la molestia al paciente tras la administración. Ejemplos de modificadores de la tonicidad adecuados para modificar la osmolalidad incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (arginina, cisteína, histidina y similares), sales (cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio y similares) y/o sacáridos (sacarosa, glucosa, manitol y similares).

Etanercept tiene tendencia a la fragmentación durante el almacenamiento, de manera que se requieren algunos inhibidores de la fragmentación para preparar la composición de formulación óptima para Etanercept. Se sabe que el EDTA tiene un impacto en prevenir la fragmentación en muchos de los productos tales como interferón, alemtuzumab, etc., usados en la presente formulación.

Los agentes quelantes estabilizan o previenen que los iones metálicos libres reaccionen con la proteína de interés. Ejemplos de agentes quelantes que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, EDTA (ácido etilendiaminatetraacético), HEDTA (ácido hidroxietilendiaminatriacético), NTA (ácido nitrilotriacético), DTPA (pentaacetato de dietilentriamina) y ácido cítrico.

Conservante se refiere a una composición o sustancia añadida a una formulación para actuar de agente bacteriostático. Una formulación que contiene TNFR:Fc conservada de la presente invención cumple preferentemente pautas reglamentarias o reguladoras para que la eficacia del conservante sea un producto multi-usos comercialmente viable, preferentemente en seres humanos. Los conservantes usados en la presente invención están seleccionados del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, cloro-cresol, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio o tiomersal, tanto solos como en combinación de los mismos. Sin embargo, en la presente invención, el uso de conservante es opcional y se prefiere mientras que se diseñan formulaciones multi-dosis.

65

La novedosa formulación acuosa termoestable de TNFR:Fc descritas en la presente invención tiene las siguientes ventajas;

- 5 1. Implica el uso de inhibidor de la agregación, que previene la agregación de la proteína de fusión durante el almacenamiento a largo plazo.
2. Implica el uso de un estabilizador que previene escisiones no deseadas durante el almacenamiento a largo plazo.
- 10 3. Proporciona mejor estabilidad a la formulación acuosa para mantener su actividad durante un periodo prolongado de tiempo para garantizar una estabilidad en almacén razonable.
4. Proporciona mejor estabilidad a la formulación acuosa incluso a temperaturas elevadas.
- 15 Los siguientes ejemplos ilustran las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención y los medios de llevar a cabo la invención para obtener una formulación farmacéutica acuosa estable de TNFR:Fc. Los ejemplos no deben interpretarse de ninguna forma como limitaciones para el alcance de la invención.

Ejemplo 1

20 Cribado y selección de inhibidores de la agregación

Cribado de inhibidores de la agregación a 40 °C

- 25 Se estudió la formulación de Etanercept con diferentes inhibidores de la agregación como lisina, ácido aspártico, glicina y prolina. Estas formulaciones también contuvieron otros excipientes según los detalles dados en la Tabla 1. Se incubaron muestras y RMP a 40 °C durante un mes y luego se analizaron por SDS-PAGE. Se usó SDS-PAGE como la técnica analítica que puede separar las especies disociadas y de alto peso molecular de proteína nativa basándose en el peso molecular. Debido a la alta tendencia a agregarse en caso de alta concentración de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión, se utilizó SDS-PAGE no reductora para evaluar los agregados covalentes. Como están presentes muchos enlaces disulfuro en las proteínas de fusión, además de anticuerpos monoclonales, la fragmentación de proteínas se comprobó en SDS-PAGE reductora.

30 El gel de SDS-PAGE (Fig. 1a, 1b, 2a y 2b) de diferentes formulaciones muestra la agregación y fragmentación de Etanercept después de un mes a 40 °C.

Tabla 1: Identificación de inhibidor de la agregación

| Sr. N.º | Componentes | Formulación N.º | | | |
|---------|-------------------------|-----------------|--------|--------|--------|
| | | F1 | F2 | F3 | F4 |
| 1. | Etanercept | 50 mg | 50 mg | 50 mg | 50 mg |
| 2. | Sacarosa | 20 mg | 20 mg | 20 mg | 20 mg |
| 3. | Tampón fosfato | 25 mM | 25 mM | 25 mM | 25 mM |
| 4. | Ácido DL-aspártico | 20 mM | - | - | - |
| 5. | Monohidrato de L-lisina | - | 20 mM | - | - |
| 6. | Glicina | - | - | 20 mM | - |
| 7. | Prolina | - | - | - | 20 mM |
| 8. | Cloruro sódico | 100 mM | 100 mM | 100 mM | 100 mM |
| 9. | Polisorbato 20 | 0,2 mg | 0,2 mg | 0,2 mg | 0,2 mg |
| 10. | EDTA de disodio | 1 mM | 1 mM | 1 mM | 1 mM |

Se encontró que F2 y F4 tenían más degradación en términos de agregación, además de fragmentación, pero no hay gran diferencia en términos de agregados y fragmentos observados para F1 y F3. Como no se observó diferencia significativa en impurezas a esta temperatura, ambas formulaciones (F1 y F3) se estudiaron adicionalmente a temperaturas más altas para aumentar la cinética de degradación, además de los degradantes.

Cribado de inhibidores de la agregación a 47 °C y 55 °C

- 45 Para encontrar el mejor inhibidor de la agregación entre ácido aspártico (F1) y glicina (F3), ambas formulaciones se cargaron a 47 °C, además de a 55 °C. Los resultados indican que la glicina (F3) está mostrando degradación más alta en términos de agregación, además de fragmentación en comparación con el ácido aspártico (F1) a ambas temperaturas probadas, es decir, 47 °C durante 16 horas (Fig. 3a y 3b) y 55 °C durante 24 horas (Fig. 4). La formulación que contiene glicina también está mostrando una banda de fragmento adicional (Fig. 3b) en condición reductora a 47 °C; 16 horas.

Se muestra que el ácido aspártico es eficaz contra la agregación, además de la fragmentación, a todas las temperaturas sin banda adicional en comparación con la especialidad farmacéutica de referencia (RMP). Una banda adicional observada en la formulación que contiene glicina podría ser un contribuyente a la inmunogenicidad.

5 Combinación de excipientes (lisina + ácido aspártico)

Con el fin de mantener el pH de la formulación F1 que contiene ácido aspártico (que se muestra que es eficaz en todas las temperaturas como se observó anteriormente), se añadió tampón lisina. Se usaron tanto lisina como ácido aspártico a una concentración de 10 mM, ya que se espera que estos aminoácidos tengan estabilidad más alta a 10 concentraciones equimolares. La composición de formulación se menciona en la Tabla 1a:

Tabla 1a: Formulación de F5

| Sr. N.º | Componentes | Composición F5 |
|---------|-----------------------|----------------|
| 1. | Etanercept | 50 mg |
| 2. | Sacarosa | 20 mg |
| 3. | Tampón fosfato | 25 mM |
| 4. | Ácido aspártico | 10 mM |
| 5. | Monohidrato de lisina | 10 mM |
| 6. | Cloruro sódico | 100 mM |
| 7. | Polisorbato 20 | 0,2 mg |
| 8. | EDTA de disodio | 1 mM |

La formulación que contiene lisina en combinación con ácido aspártico (F5) mostró menos fragmentación en 15 comparación con la formulación sin lisina (F3) como se observa en la Figura 5a y 5b.

Ejemplo 2

Efecto de EDTA

20

Se comprobó el efecto de EDTA en la formulación F3 a 40 °C durante 3 días y se analizó por SE-HPLC ya que la cromatografía de exclusión por tamaño separa proteínas y sus impurezas relacionadas basándose en su tamaño. Esta técnica es útil para detectar la agregación y fragmentación de Etanercept y los resultados se dan a continuación en la Tabla 2.

25 También se usó SDS-PAGE para comparar agregados y fragmentos patrón. (Figura 5a, 5b, 6a y 6b)

Tabla 2: Resultados de SE-HPLC de formulaciones que muestran impacto de EDTA

| Tipo | Día cero | | 40 °C durante 3 días | |
|-------------|----------|----------|----------------------|----------|
| | sin EDTA | con EDTA | sin EDTA | con EDTA |
| Dímero | 2,20 | 2,40 | 1,62 | 2,18 |
| Oligómeros | 0,0007 | 0 | 0,005 | 0,0 |
| Degradantes | 0,003 | 0,39 | 1,39 | 0,82 |
| Pureza | 97,79 | 97,21 | 96,98 | 97,00 |

Se encontró que F3 tenía menos velocidad de degradación que la de la formulación sin EDTA según los resultados de SE-HPLC particularmente en términos de fragmentos. 30

Por SDS-PAGE, se encuentra que F3 tiene menos cantidades de bandas de peso molecular bajo después de la exposición de muestras a 40 °C durante 3 días. Por tanto, EDTA desempeña una función importante en prevenir la fragmentación de Etanercept.

35

Ejemplo 3

Efecto de tampones

40 Se cargaron formulaciones de Etanercept con tampón fosfato y tampón histidina como se da en la Tabla 3 (F6 y F7) a 50 °C durante 2 días y se analizaron por SE-HPLC y calorimetría diferencial de barrido (DSC). DSC es una técnica usada para determinar la estabilidad termodinámica de proteínas. Etanercept tiene tres transiciones y Tm1 se corresponde con TNFR, Tm2 se corresponde con el dominio CH2 y Tm3 se corresponde con el dominio CH3 de la porción Fc (Tm más alta indica estabilidad más alta)

45

Tabla 3: Identificación de componente tampón

| Sr. N.º | Componentes | Formulación N.º |
|---------|-------------|-----------------|
|---------|-------------|-----------------|

| Sr. N.º | Componentes | Formulación N.º | |
|---------|-----------------------|-----------------|--------|
| | | F6 | F7 |
| 1 | Sacarosa | 20 mg | - |
| 2 | Trehalosa | - | 20 mg |
| 3 | Monohidrato de lisina | 10 mM | - |
| 4 | Glicina | - | 25 mM |
| 5 | Ácido aspártico | 10 mM | 5 mM |
| 6 | Cloruro sódico | 100 mM | 100 mM |
| 7 | Polisorbato 20 | 0,2 mg | 0,2 mg |
| 8 | EDTA de disodio | 1 mM | 1 mM |
| 9 | Tampón fosfato | 25 mM | - |
| 10 | Histidina | - | 10 mM |

Tabla 4: Resultados de SE-HPLC para la identificación de componente de tampón

| Formulación N.º | % de agregados | % de fragmentos | % de pureza |
|-----------------|----------------|-----------------|-------------|
| F6-0 día | 1,4 | 0 | 98,6 |
| F7-0 día | 1,6 | 0,1 | 98,3 |
| F6-2 día | 12,5 | 0 | 87,5 |
| F7-2 día | 21,6 | 0 | 78,4 |

La composición con tampón fosfato como agente de tamponamiento estaba teniendo alta pureza y agregados más 5 bajos en comparación con las formulaciones que contenían tampón histidina según los resultados de SE-HPLC.

Según el análisis de DSC, los puntos medios de transición del primer y segundo pico de transición de tampón fosfato son aproximadamente 1 °C y 2 °C, respectivamente, superiores a los de la formulación de tampón histidina. El punto medio del tercer pico de transición es casi similar en ambos tampones.

10

Como se observó que el tampón fosfato tenía menos velocidad de degradación en comparación con el tampón histidina como se demuestra por los resultados de SE-HPLC y la alta estabilidad termodinámica demostrada por el análisis de DSC, se prefiere el tampón fosfato como el sistema tampón adecuado.

15 Ejemplo 4

Identificación de sales de tampón

Se cribaron sales de tampón (sodio y potasio) para el candidato más adecuado en términos de estabilidad.

20 Se uso tampón fosfato en combinación de sus sales, es decir, sodio / potasio para la estabilidad deseada de proteína. La Tabla 5 resume los conjuntos de combinación usados para seleccionar el mejor candidato a formulación.

Tabla 5: Identificación de sal de tampón de combinación y su concentración

| Sr. N.º | Componentes | F6 | F8 |
|---------|-----------------------------|--------|--------|
| 1 | Sacarosa | 20 mg | 20 mg |
| 2 | Monohidrato de lisina | 10 mM | 10 mM |
| 3 | Ácido aspártico | 10 mM | 10 mM |
| 4 | Cloruro sódico | 100 mM | 100 mM |
| 5 | Polisorbato 20 | 0,2 mg | 0,2 mg |
| 6 | EDTA de disodio | 1 mM | 1 mM |
| 7 | Fosfato de sodio monobásico | 11 mM | 11 mM |
| 8 | Fosfato de sodio dibásico | 13 mM | - |
| 9 | Fosfato de potasio dibásico | - | 19 mM |

25

Se identificó la estabilidad termodinámica de composiciones con los medios de DSC. Se evaluó la agregación y fragmentación en su momento de almacenamiento por medio de SE-HPLC. Los resultados se informan en la Tabla 6 y Tabla 7.

30

Tabla 6: Resultados de DSC experimental de combinaciones seleccionadas

| S. N.º | Formulaciones | Tm1 | Tm2 | Tm3 |
|--------|---------------|------|------|------|
| 1 | RMP | 57,5 | 70,4 | 82,3 |
| 2 | F6 | 57,7 | 70,1 | 82,7 |
| 3 | F8 | 58,3 | 70,1 | 82,3 |

Tabla 7: Resultados de SE-HPLC para la optimización de sales tampón

| Temperatura de estudio | Duración (días) | Formulaciones | | |
|------------------------|-----------------|---------------|------------|------|
| | | RMP | F6 | F8 |
| 50 °C | 0 | 98,4 | 98,6 | 98,6 |
| | 2 | 81,4 | 86,1 | 87,5 |
| | 3 | 75,9 | No se hizo | 80,9 |

La composición con sal de potasio estaba teniendo alta pureza en comparación con las formulaciones que contenían sal de sodio según los resultados de SE-HPLC.

- 5 Según el análisis de DSC, el punto medio de transición del primer pico de transición de la sal de potasio es aproximadamente 1 °C superior al de la composición de sal de sodio solo. Los puntos medios del segundo y tercer pico de transición son casi similares en ambas sales.

- Como se observó que la combinación de sal de sodio-potasio tenía menos velocidad de degradación en comparación con la sal de sodio solo como se demuestra por resultados de SE-HPLC y alta estabilidad termodinámica demostrada por análisis de DSC, se eligió la combinación de la sal de sodio-potasio como sistema de tampón adecuado.

Ejemplo 5

15

Preparación de proteína de fusión TNFR:Fc con los inhibidores de la agregación ácido L-aspártico y lisina

- 20 Todos los componentes dados en la Tabla 8, excepto el polisorbato 20, se disolvieron en 80 % de agua y se mezclaron apropiadamente con agitación continua. Se añadió polisorbato 20 en la solución haciendo la concentración final como 0,2 mg/ml. El volumen de tampón de formulación se enrasó al 90 % con agua. El pH se ajustó a 6,3 con cualquier ácido/base adecuado y el volumen se enrasó al 100 % con agua. El tampón de formulación se filtró y la masa de Etanercept se diluyó en concentración requerida con este tampón de formulación filtrado. Se analizó la formulación de Etanercept por SE-HPLC, SDS-PAGE y HIC a tiempo cero, y después de 1, 2 y 3 meses de almacenamiento a -20 °C, 5±3 °C, 25±2 °C. HIC separa proteínas basándose en la hidrofobia. Pico 1 en HIC determina fragmentos, Pico 2 se corresponde con dímero activo de Etanercept y Pico 3 se corresponde con agregados. El pre-pico 1 observado en algunos casos se corresponde con impurezas truncadas.

- 30 También se comprobó la bioactividad de muestras. El método se basa en el principio de neutralización del efecto citotóxico. TNF- α produce efecto citotóxico sobre la línea celular L929 (tejido conjuntivo de ratón). TNFR:Fc neutraliza específicamente la actividad citotóxica de TNF- α en un modo dependiente de la dosis. La bioactividad de RMP es 1,7 millones de unidades por mg. Los resultados se informan en la Tabla 9.

- 35 Se preparó la presente formulación farmacéutica añadiendo inhibidores de la agregación al polipéptido purificado como se ha descrito anteriormente. Además, puede añadirse un tampón, un modificador de la tonicidad, un tensioactivo, un inhibidor de la fragmentación y un excipiente adicional según se necesite. Se entenderá por un experto habitual en la materia que la combinación de los diversos componentes que van a incluirse en la composición puede hacerse en cualquier orden apropiado, concretamente, el tampón puede añadirse primero, en el medio o el último y el modificador de la tonicidad también puede añadirse primero, en el medio o el último. También debe entenderse por un experto habitual en la materia que algunos de estos productos químicos son incompatibles en ciertas combinaciones, y por consiguiente, son fácilmente sustituidos con diferentes productos químicos que 40 tienen propiedades similares, pero son compatibles en la mezcla relevante.

Tabla 8

| Sr. N.º | Componente | Concentración |
|---------|-------------------------------|---------------|
| 1. | TNFR:Fc | 50,0 mg/ml |
| 2. | Dihidrógenofosfato de sodio | 1,5 mg/ml |
| 3. | Hidrógenofosfato de dipotasio | 3,3 mg/ml |
| 4. | Lisina | 1,5 mg/ml |
| 5. | Cloruro sódico | 5,8 mg/ml |
| 6. | Polisorbato 20 | 0,1 mg/ml |
| 7. | Sacarosa | 20 mg/ml |
| 8. | Ácido aspártico | 1,3 mg/ml |
| 9. | EDTA de disodio | 0,37 mg/ml |

45 a) Prueba de estabilidad de la formulación acuosa de TNFR:Fc

Se realizaron las pruebas biológicas en cumplimiento con los reglamentos de la Farmacopea Europea.

- **SDS-PAGE [Agregación (No reducida) y Fragmentación (Reducida)]**

Debido a la alta tendencia a la agregación en caso de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión de alta concentración, se utilizó SDS-PAGE no reductora para evaluar agregados covalentes. Como TNFR se une a la región bisagra de Fc por enlaces disulfuro y ya que hay muchos enlaces disulfuro presentes en Fc y TNFR, se comprobó la fragmentación de proteínas en SDS-PAGE reductora.

- 5 • **SE-HPLC (Agregación y fragmentación)**
Como la cromatografía de exclusión por tamaño separa proteínas y sus impurezas relacionadas basándose en su tamaño, la técnica anterior fue útil para detectar la agregación y fragmentación de Etanercept.
- **HIC (Agregación, fragmentación, truncación y plegamiento erróneo)**
HIC separa proteínas basándose en la hidrofobia. Pico 1 en HIC determina fragmentos, Pico 2 se corresponde con dímero activo de Etanercept y Pico 3 se corresponde con agregados. El pre-pico 1 observado en algunos casos se corresponde con impurezas truncadas. Perfiles de referencia de HIC que definen el Pico 1, Pico 2 y Pico 3 se dan en la Figura 12 (-20 °C después de 3 meses), Figura 13 (5±3 °C después de 3 meses), Figura 14 (25±2 °C después de 3 meses).
- 10 • **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**
DSC es una técnica usada para determinar la estabilidad termodinámica de proteína. Etanercept tiene tres transiciones y la Figura 9 es indicativa de que Tm1 se corresponde con TNFR, Tm2 se corresponde con el dominio CH2 y Tm3 se corresponde con el dominio CH3 de la porción Fc (la Tm más alta determina estabilidad más alta).
- 15 • **Bioensayo *in vitro* (Bioactividad)**
El método se basa en el principio de neutralización del efecto citotóxico. TNF-α produce efecto citotóxico sobre la línea celular L929 (tejido conjuntivo de ratón). TNFR:Fc neutraliza específicamente la actividad citotóxica de TNF-α en un modo dependiente de la dosis (Figura 10). La bioactividad de RMP es 1,7 millones de unidades por mg.
- 20
- 25 Los aspectos con respecto a la estabilidad de la formulación acuosa se capturan en la Tabla 9.

Tabla 9 - Parámetros analíticos para una formulación líquida de Etanercept a tiempo cero y después del almacenamiento a 5 °C, 25 °C y -20 °C durante 1, 2 y 3 meses

| Ensayo | Tiempo cero | | | 1 mes | | | 2 meses | | | 3 meses | | |
|---------------------------|-------------|--------|---------|------------|------------|------------|---------|--------|---------|---------|--------|---------|
| | -20 °C | 5±3 °C | 25±2 °C | -20 °C | 5±3 °C | 25±2 °C | -20 °C | 5±3 °C | 25±2 °C | -20 °C | 5±3 °C | 25±2 °C |
| Agregación por SE-HPLC | 1,4% | 1,4% | 1,4% | 1,7% | 1,2% | 1,4% | 1,8% | 1,1% | 1,7% | 1,7% | 1,1% | 1,9% |
| Fragmentación por SE-HPLC | 0% | 0% | 0% | 0,1% | 0,1% | 0,2% | 0,05% | 0,2% | 0,4% | 0,0% | 0,1% | 0,5% |
| Pico 1 de HIC | 0% | 0% | 0% | No probado | No probado | No probado | 0,21% | 0,28% | 0,90% | 0,81% | 0,5% | 1,4% |
| Pico 2 de HIC | 93,7% | 93,7% | 93,7% | No probado | No probado | No probado | 93,1% | 94,1% | 92,8% | 93,8% | 93,6% | 92,9% |
| Pico 3 de HIC | 6,3% | 6,3% | 6,3% | No probado | No probado | No probado | 6,7% | 5,7% | 6,3% | 5,4% | 5,9% | 5,7% |

Ejemplo 6**Prueba de estabilidad de formulaciones líquidas de TNFR:Fc a 40 °C**

5 Se preparó formulación líquida que comprendía Etanercept que tenía la composición dada en la Tabla 8. La solución formulada se esterilizó usando un filtro de 0,2 µm bajo flujo de aire laminar y se guardó a 40 °C durante 1 mes. La formulación se analizó por SE-HPLC, SDS-PAGE y HIC (Figura 15) a tiempo cero, 7 días, 15 días, 21 días y 1 mes de almacenamiento a 40 °C y también se comprobó la bioactividad. Los resultados se informan en la Tabla 10.

10

Tabla 10: Resultados de pruebas de estabilidad para la formulación de Etanercept

| Ensayo | Tiempo cero | 7 días | 15 días | 21 días | 1 mes |
|---------------------------|-------------|------------|------------|------------|--------|
| | 40 °C | 40 °C | 40 °C | 40 °C | 40 °C |
| Agregación por SE-HPLC | 1,4 % | 1,9 % | 2,4 % | 3,7% | 5,7 % |
| Fragmentación por SE-HPLC | 0% | 0,3 % | 0,5 % | 0,6 % | 1,1 % |
| Pico 1 de HIC | 0% | No probado | No probado | No probado | 2,7 % |
| Pico 2 de HIC | 93,7 % | No probado | No probado | No probado | 90,0 % |
| Pico 3 de HIC | 6,3 % | No probado | No probado | No probado | 7,2 % |

Ejemplo 7**Prueba de estabilidad de formulaciones líquidas de TNFR:Fc a 50 °C**

15

Se preparó formulación líquida que comprendía Etanercept que tenía la composición dada en la Tabla 8. La solución formulada se esterilizó usando un filtro de 0,2 µm bajo flujo de aire laminar y se guardó a 50 °C durante 3 días. La formulación se analizó por SE-HPLC, SDS-PAGE y HIC a tiempo cero, y después de 2 días y 3 días de almacenamiento a 50 °C. Los resultados se informan en la Tabla 11.

20

Tabla 11: Resultados de pruebas de estabilidad para la formulación de Etanercept (50 °C)

| Ensayo | Tiempo cero | 2 días | 3 días |
|---------------------------|-------------|--------|--------|
| | 50 °C | 50 °C | 50 °C |
| Agregación por SE-HPLC | 1,4 % | 12,5 % | 19,1 % |
| Fragmentación por SE-HPLC | 0% | 0% | 0% |
| Pico 1 de HIC | 0% | 0% | 0% |
| Pico 2 de HIC | 93,7 % | 92,6 % | 84,9 % |
| Pico 3 de HIC | 6,3 % | 7,4 % | 15,1% |

Las novedosas formulaciones de proteína de fusión se preparan usando combinación adecuada de tampón, inhibidores de la agregación, modificadores de la tonicidad, estabilizadores, tensioactivos, agentes quelantes y 25 opcionalmente con conservante en combinaciones adecuadas de los mismos.

La formulación preparada por dicha invención comprende una cantidad eficaz de TNFR:Fc biológicamente activo que se usa en el tratamiento de enfermedades inflamatorias en seres humanos. Se usan preferentemente como soluciones acuosas inyectables.

30

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica acuosa que comprende TNFR:Fc, un inhibidor de la agregación, un tampón, un tensioactivo no iónico, un estabilizador, un modificador de la tonicidad, y opcionalmente un conservante, en la que el
5 inhibidor de la agregación es ácido aspártico, opcionalmente en combinación con lisina y en la que la formulación farmacéutica comprende además EDTA como agente quelante e inhibidor de la fragmentación.
2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el tampón comprende tampón fosfato, tampón bicarbonato, tampón succinato, tampón acetato, tampón citrato, aminoácidos, tampón Tris, tanto solos como en
10 combinación adecuada, dando el intervalo de pH deseado desde 5,5 a 7,5, y preferentemente el tampón se selecciona 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, o una combinación de los mismos, y más preferentemente el tampón es tampón fosfato en combinación con sus sales de sodio y de potasio.
- 15 3. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en la que el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo no iónico basado en polisorbato y un tensioactivo no iónico basado en poloxámero o una combinación de los mismos, y preferentemente el tensioactivo no iónico es polisorbato
20.
- 20 4. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el estabilizador se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos tales como glicina, alanina, lisina, prolina y serina y sus sales, tanto solos como en combinación, monosacáridos tales como glucosa y manosa, y similares, tanto solos como en combinación, disacáridos tales como sacarosa, trehalosa y maltosa, y similares, tanto solos como en combinación, alcoholes de
25 azúcar tales como manitol y sorbitol, y similares, tanto solos como en combinación, y polisacáridos tales como dextrano, polietilenglicol y similares, tanto solos como en combinación, y preferentemente el estabilizador es sacarosa.
5. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el modificador de la tonicidad se selecciona del grupo que consiste en cloruro sódico, cloruro de potasio, sulfato de sodio o una combinación de
30 los mismos, y preferentemente el modificador de la tonicidad es cloruro sódico.
6. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el conservante se selecciona del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, cloro-cresol, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio o tiomersal, tanto solos como en combinación de los
35 mismos.
7. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende ácido aspártico y lisina como inhibidores de la agregación, tampón fosfato de sodio-potasio dando el intervalo de pH deseado desde 5,5 a
40 7,5, cloruro sódico como modificador de la tonicidad, sacarosa como estabilizador, polisorbato 20 como tensioactivo no iónico, y EDTA como inhibidor de la fragmentación y agente quelante, en la que TNFR:Fc está presente a una concentración de 10 mg/ml a 100 mg/ml.
8. La formulación de la reivindicación 7, que comprende desde 25 a 50 mg/ml de TNFR:Fc, desde 1 mM a 50 mM de ácido aspártico, desde 1 mM a 50 mM de lisina, desde 10 mM a 50 mM de fosfato de sodio-potasio, desde 0,75 % a
45 3 % de sacarosa, desde 50 a 150 mM de NaCl, desde 0,1 mM a 2 mM de EDTA, desde 0,05 mg/ml a 1,0 mg/ml de polisorbato 20, y a un pH de 6,0 a 7,0.
9. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es una solución acuosa inyectable.
- 50 10. Uso de EDTA para prevenir la fragmentación de TNFR:Fc en una formulación farmacéutica acuosa.

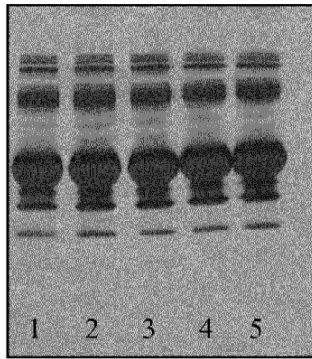


Figura 1a

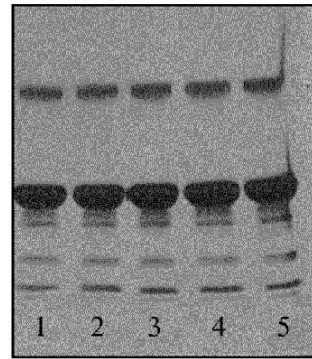


Figura 1b

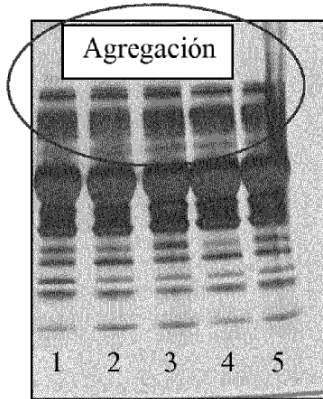


Figura 2a

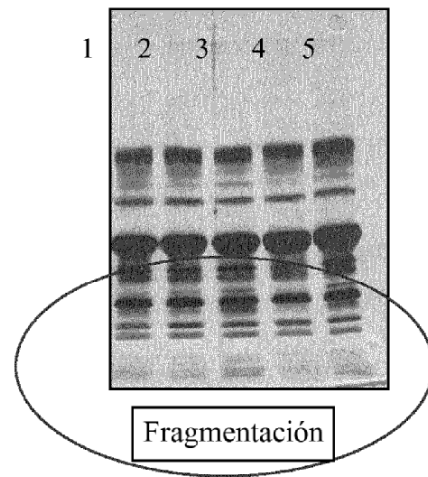


Figura 2b

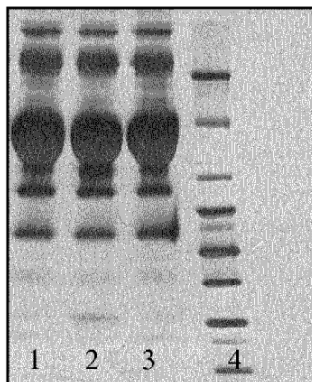


Figura 3a

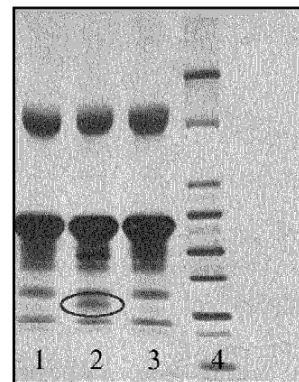


Figura 3b

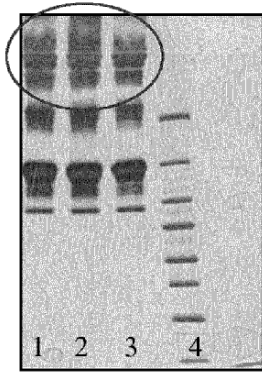


Figura 4

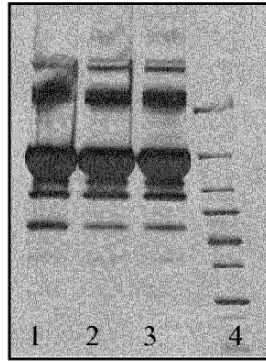


Figura 5a

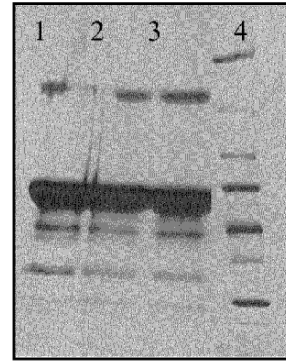


Figura 5b

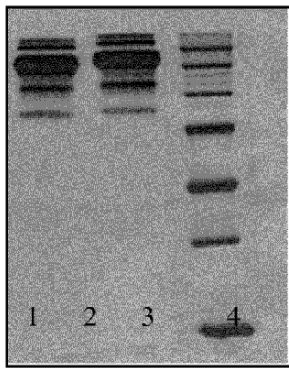


Figura 6a

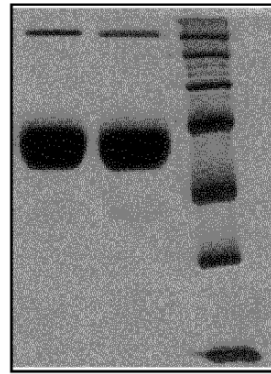


Figura 6b

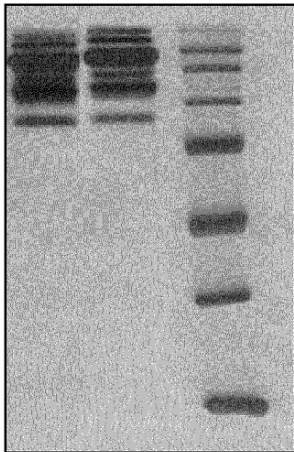


Figura 7a

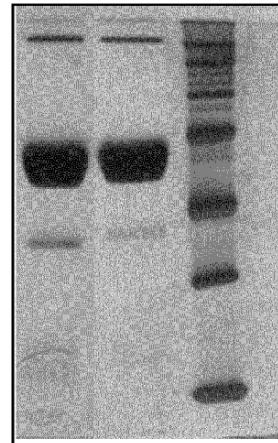


Figura 7b

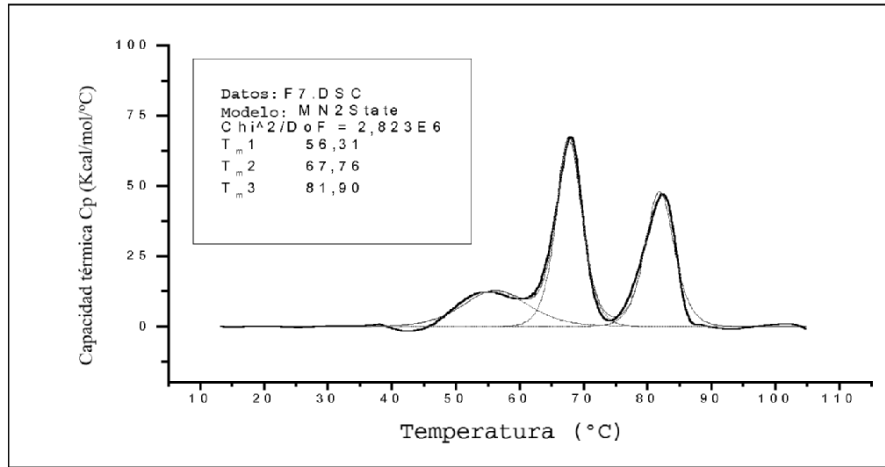


Figura 8a

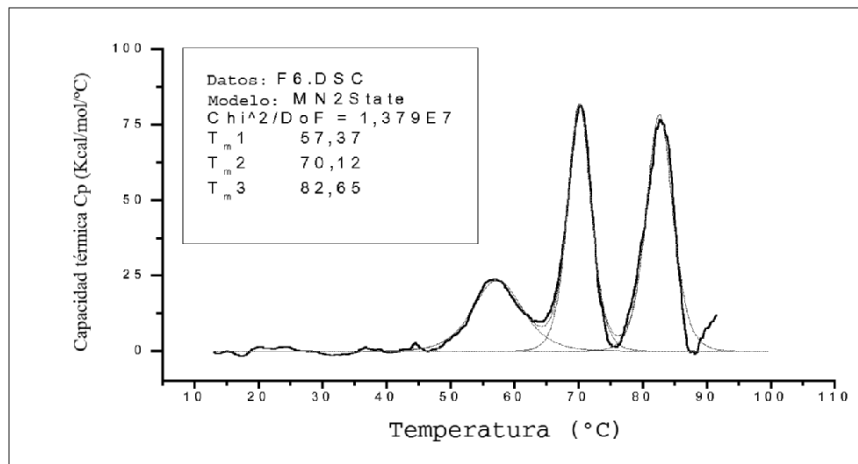


Figura 8b

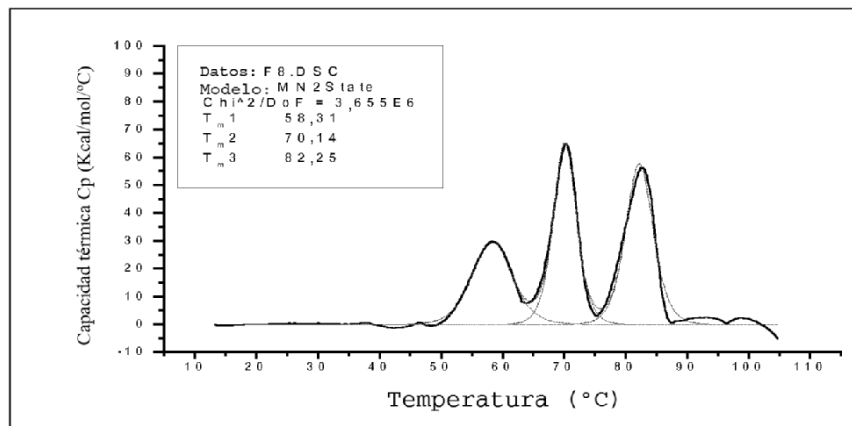


Figura 8c

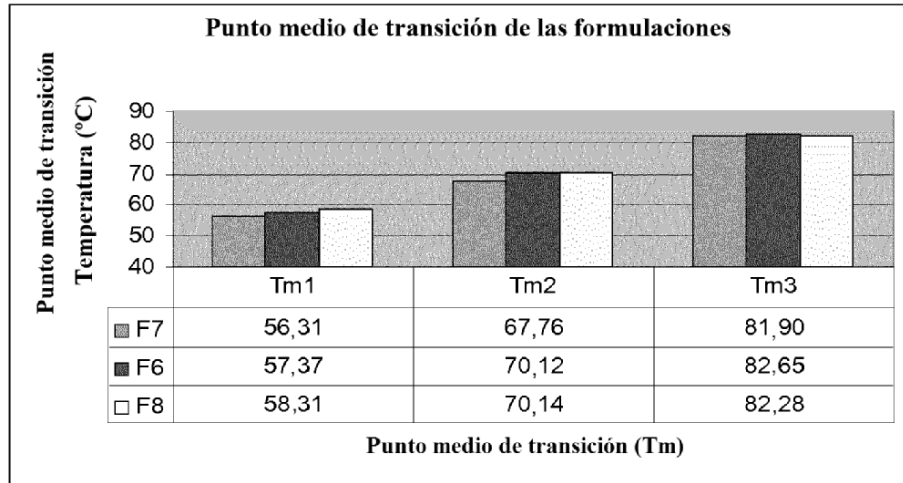


Figura 9

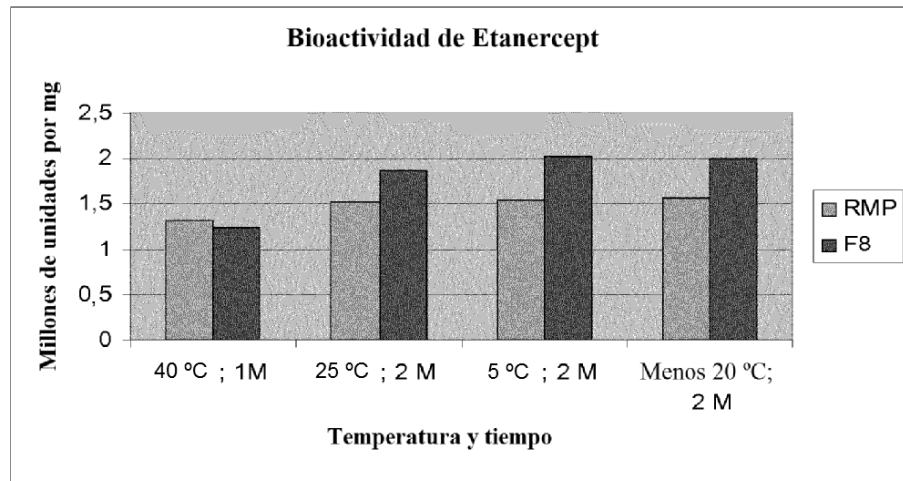


Figura 10

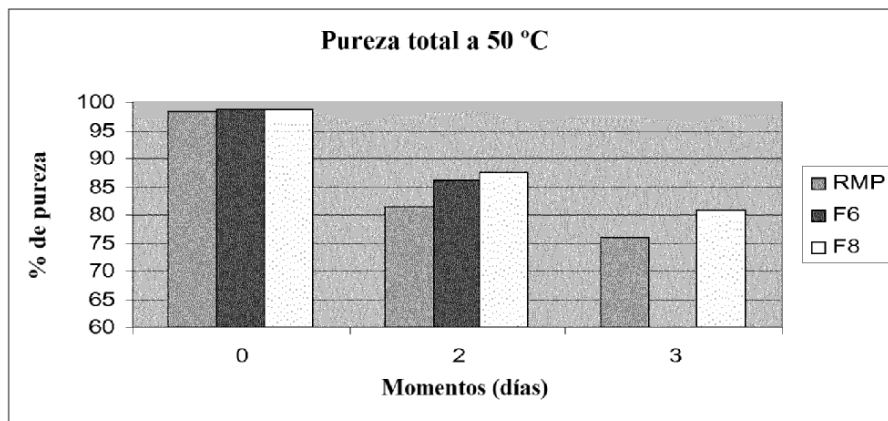


Figura 11

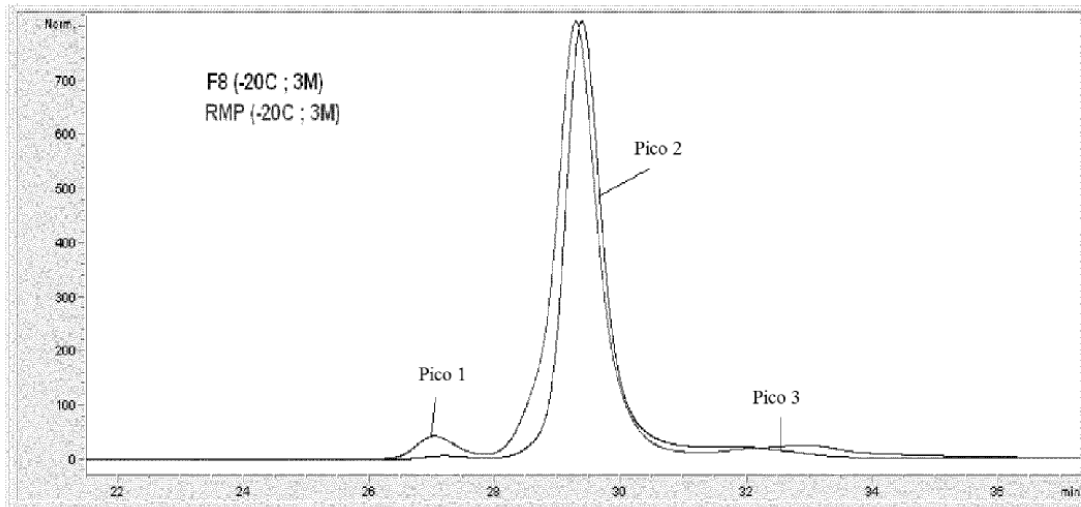


Figura 12

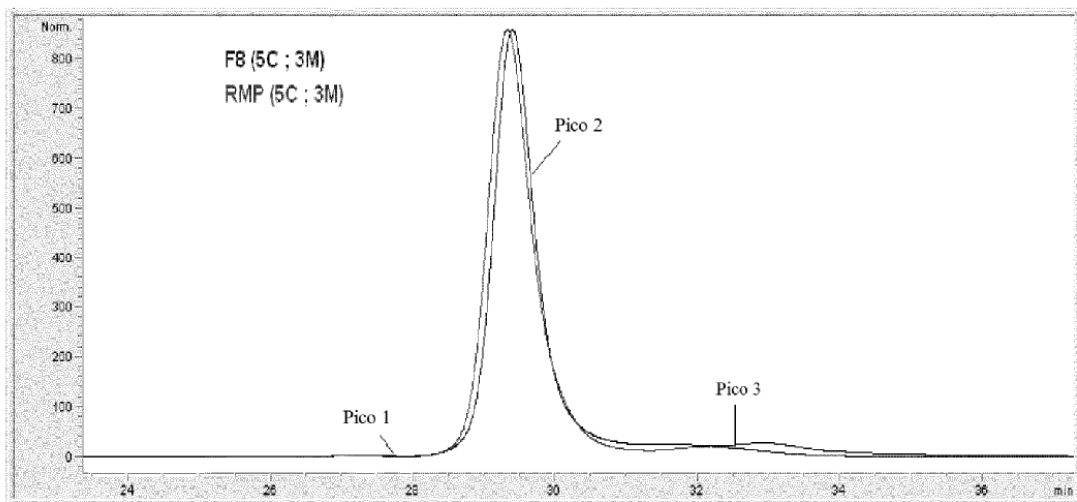


Figura 13

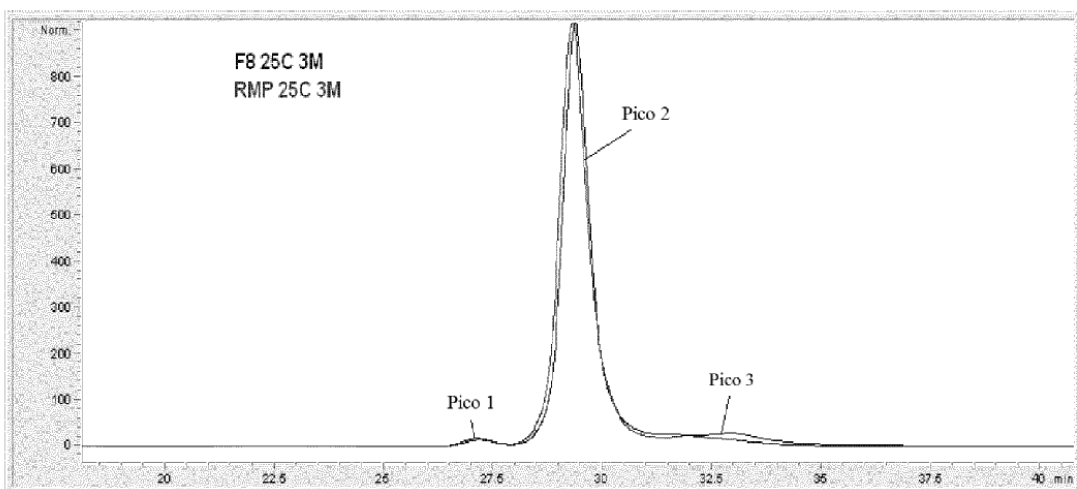


Figura 14

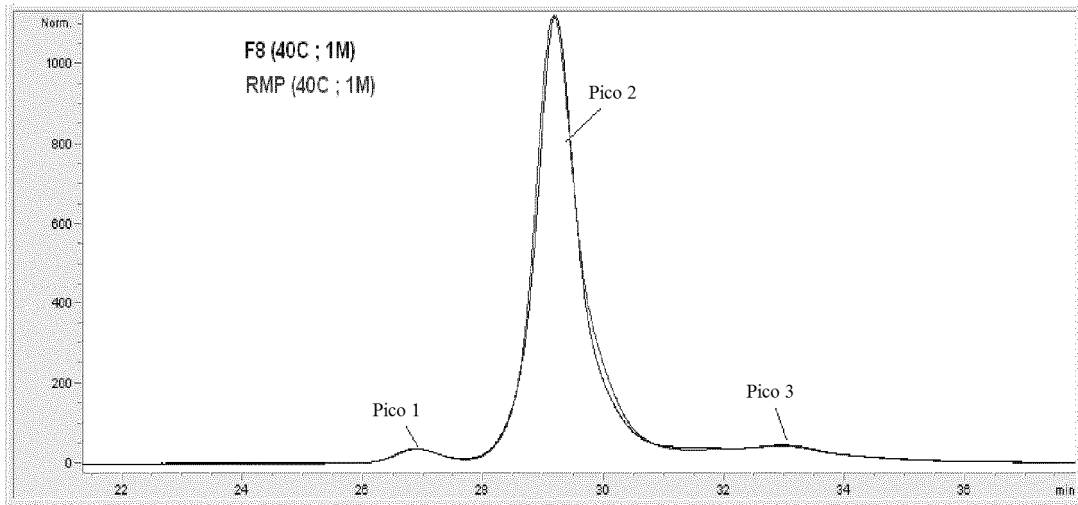


Figura 15

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 5580856 A [0007]
- US 6171586 B [0008]
- EP 1314437 A [0009]
- EP 1478394 A [0010]
- WO 2007092772 A [0011]
- 15 • WO 2010077422 A [0012]
- US 20060240520 A [0013]
- US 20080071063 A [0014]