

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 070**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61K 47/18** (2007.01)

**A61K 47/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2012 PCT/US2012/060739**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13059406**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2012 E 12842352 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2768525**

54 Título: **Formulaciones de etanercept estabilizadas con iones de magnesio**

30 Prioridad:

**18.10.2011 US 201161548518 P**  
**09.07.2012 US 201261669480 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.12.2019**

73 Titular/es:

**COHERUS BIOSCIENCES, INC. (100.0%)**  
**333 Twin Dolphin Drive, Suite 600**  
**Redwood City, CA 94065, US**

72 Inventor/es:

**MANNING, MARK y**  
**MURPHY, BRIAN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 734 070 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

Formulaciones de etanercept estabilizadas con iones de magnesio.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas acuosas estabilizadas con magnesio para el almacenamiento a largo plazo de etanercept.

Antecedentes de la invención

10 Los polipéptidos a menudo antes de su uso. Cuando se almacenan por períodos prolongados, los polipéptidos son frecuentemente inestables en solución (Manning et al., 1989, Pharm. Res. 6:903-918). Para extender su vida útil, se han desarrollado etapas de procesamiento adicionales, tales como el secado, por ejemplo, la liofilización. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas liofilizadas son menos convenientes de usar.

15 Las prácticas típicas para mejorar la estabilidad de los polipéptidos pueden abordarse variando la concentración de elementos con la formulación, o añadiendo excipientes para modificar la formulación (Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,580,856 y 6,171,586). Sin embargo, el uso de aditivos todavía puede resultar en polipéptidos inactivos. Además, en el caso de la liofilización, la etapa de rehidratación puede resultar en la inactivación del polipéptido, por ejemplo, por agregación o desnaturalización (Hora et al., 1992, Pharm. Res., 9:33-36; Liu et al., 1991, Biotechnol. Bioeng., 37:177-184). La agregación de polipéptidos es indeseable, ya que puede resultar en inmunogenicidad (Cleland et al., 1993, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems, 10:307-377; y Robbins et al., 1987, Diabetes, 36:838-845).

20 Otra forma de mejorar la estabilidad del polipéptido es usar L-arginina a una concentración específica (la Patente de lo Estado Unido No. 7,648,702).

25 Uno de los polipéptidos que se almacenan hasta dos años antes de su uso es etanercept (Enbrel®, Immunex Corporation), que es un polipéptido de fusión dimérico que consiste en la parte de unión al ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) de 75 kilodalton humano (p75) unido a la parte Fc de la IgG1 humana. Consta de 934 aminoácidos y tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilodaltons (Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc.). El componente Fc de etanercept contiene el dominio 2 (CH2) constante pesado, el dominio 3 (CH3) constante pesado y región bisagra, pero no el dominio 1 (CH1) constante pesado de la IgG1 humana. Un dominio Fc puede contener uno o todos los dominios descritos anteriormente. El etanercept generalmente se produce mediante tecnología de ADN recombinante en un sistema de expresión de células de mamíferos de ovario de hámster chino (CHO).

30 La presente invención proporciona nuevas formulaciones líquidas estables de etanercept que permiten su almacenamiento a largo plazo.

Resumen de la invención

35 La presente invención es una composición farmacéutica acuosa que no contiene arginina que comprende etanercept y un estabilizante para inhibir la inestabilidad, la agregación, el plegado incorrecto y/o la fragmentación del etanercept, en el que el estabilizante comprende magnesio de 2 a 10 mM.

Diversos términos técnicos usados en la siguiente discusión se definen a continuación en la sección titulada "Definiciones" y a lo largo del resto de la memoria descriptiva.

40 Las formulaciones de etanercept acuoso estabilizado de la presente invención provocan una estabilidad de almacenamiento a largo plazo caracterizada por al menos uno de: (1) análisis de SEC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub> de: contenido de monómero superior al 90%; contenido de agregados de menos de 3% en peso; y el contenido del fragmento 3 menos del 5% en peso; y (2) análisis de HIC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub> en el que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 3% en peso; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es mayor al 80% en peso; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 20% en peso.

45 En un aspecto relacionado, las formulaciones de etanercept que contienen iones metálicos provocan una estabilidad de almacenamiento a largo plazo caracterizada por: (1) análisis de SEC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub> de más del 90% en peso del contenido de monómero; menos del 3% en peso de contenido de agregados; y menos del 5% en peso del fragmento 3; y (2) análisis de HIC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub> en el que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 3% en peso; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es más del 80% en peso; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 20% en peso.

50 En los aspectos preferidos de las formulaciones estabilizadas, las formulaciones provocan una estabilidad de almacenamiento a largo plazo caracterizada por: un análisis de HIC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub> en el que la cantidad de la

composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es mayor que o igual al 95% en peso; y en la que, si el pico 3 está presente en el cromatograma de HIC, la cantidad de la composición representada por el pico 3 es menos de o igual al 3% en peso.

La formulación de etanercept estabilizada como se resume anteriormente no contiene arginina.

5 Las formulaciones de la invención tienen una excelente estabilidad según lo determinan los análisis de SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) e HIC (cromatografía de interacción hidrófoba) realizados después de uno, dos o tres meses de almacenamiento a 5 °C. Estas formulaciones son comparables o mejores que una formulación de etanercept disponible comercialmente, en la que la arginina es un componente requerido. De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere además a formulaciones de etanercept, estabilizadas con iones metálicos que no contienen arginina, o que están esencialmente libres de arginina, y en la que la composición, en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub>, provoca una estabilidad de almacenamiento a largo plazo que cumple con uno o ambos de los siguientes criterios: (A) estabilidad comparable o mejor que el etanercept disponible comercialmente comercializado bajo la marca comercial Enbrel®, medido por (i) análisis de SEC de las cantidades de agregados, monómero y fragmento 3 en la composición (como se define en la memoria descriptiva) y (ii) análisis HIC de cantidades de material en la composición correspondiente a los picos 1, 2 y 3 del cromatograma de HIC (como se define en la memoria descriptiva); y (B) un cromatograma de HIC en el que (i) el pico 3 está ausente o está esencialmente ausente y (ii) el pico 2 representa más de aproximadamente el 95% en peso de la composición; un cromatograma de SEC que no contiene esencialmente ningún pico correspondiente a los agregados; y un cromatograma de SEC en el que el contenido de monómero representa al menos aproximadamente el 95% en peso de la composición. Las formulaciones de la presente invención son capaces de cumplir los criterios anteriores sin el requisito de arginina como estabilizante.

25 En una realización adicional en la que el estabilizante es cloruro de magnesio, la composición de etanercept estabilizada comprende cloruro de magnesio de 1 mM a 10 mM; opcionalmente hasta 6% en peso de sacarosa; NaCl de 25 a 150 mM; fosfato de sodio de 1 a 30 mM; en la que la composición tiene un pH de 6.0 a 6.6; y en la que la composición no contiene arginina.

En una realización adicional en la que el estabilizante es cloruro de magnesio, la composición de etanercept estabilizada comprende 50 mg/ml de etanercept; cloruro de magnesio 10 mM; fosfato de sodio 10-30 mM; cloruro de sodio menos de 150 mM; y menos de 3% en peso de sacarosa; y teniendo un pH de 6.3 a 6.5.

30 En una realización adicional en la que el estabilizante es cloruro de magnesio, la composición de etanercept estabilizada comprende 50 mg/ml de etanercept; cloruro de magnesio 5 mM; fosfato de sodio 10-30 mM; cloruro de sodio menos de 100 mM; y menos de 4% en peso de sacarosa; y teniendo un pH de 6.3 a 6.5.

En una realización adicional en la que el estabilizante es cloruro de magnesio, la composición de etanercept estabilizada comprende 50 mg/ml de etanercept; cloruro de magnesio 4 mM; fosfato de sodio 10-30 mM; cloruro de sodio 100 mM; y 2.5% en peso de sacarosa; y teniendo un pH de 6.3 a 6.5.

35 En una realización adicional en la que el estabilizante es cloruro de magnesio, la composición de etanercept estabilizada comprende 50 mg/ml de etanercept; cloruro de magnesio 10 mM; fosfato de sodio 10-30 mM; cloruro de sodio menos de 100 mM; y menos de 5% en peso de sacarosa; y teniendo un pH de 6.3 a 6.5.

40 Las composiciones de etanercept de la invención proporcionan además la capacidad de proporcionar formulaciones que contienen niveles aceptables de partículas subvisibles. De acuerdo con lo anterior, la invención se refiere además a formulaciones de etanercept estabilizadas con ion metálico que tienen, en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub>, no más de, en promedio, 10,000 partículas subvisibles por mL que tienen un tamaño superior a 5 µm.

45 La composición de etanercept estabilizada de la presente invención se caracteriza además por: (a) un análisis de SEC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub> de más del 90% en peso del contenido de monómero; y menos del 3% en peso de contenido de agregados; y (b) un análisis de HIC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub>, en la que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 3% en peso; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es más del 80% en peso; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 20% en peso, y en la que la formulación no contiene arginina.

50 La estabilidad de las formulaciones se puede caracterizar adicionalmente porque las composiciones exhiben un análisis de HIC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub> en el que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 1%; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es mayor que 95% en peso; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 3% en peso.

55 En una realización adicional en la que el estabilizante es cloruro de magnesio, la composición de etanercept estabilizada comprende cloruro de magnesio de 1 mM a 10 mM; opcionalmente hasta 6% en peso de sacarosa; NaCl de 25 a 150 mM; fosfato de sodio 1 a 30 mM; en la que la composición tiene un pH de 6.0 a 6.6; y en la que la composición se caracteriza por: un análisis de SEC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub> de más del 97% en peso del contenido de

monómero y menos del 1% en peso de contenido de agregados; y un análisis de HIC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub> en el que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 4% en peso; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es mayor que 85% en peso; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 14% en peso. Las formulaciones de la presente invención que usan cloruro de magnesio para la estabilización pueden cumplir los criterios anteriores sin el requisito de arginina como estabilizante.

Las composiciones estabilizadas preferidas de la invención exhiben un análisis de HIC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub> en el que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 2% y preferiblemente menos del 1%; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es mayor que 95% en peso y preferiblemente mayor que 97%; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 3% en peso, y preferiblemente de 0 a 1%.

La invención proporciona una composición farmacéutica acuosa estabilizada que comprende etanercept y un estabilizante para inhibir la inestabilidad, la agregación, el plegado incorrecto y/o la fragmentación del etanercept, en la que dicho estabilizante comprende un ion metálico estabilizante, específicamente magnesio. En una realización aún más preferida, el magnesio se proporciona como cloruro de magnesio.

Como diferenciado del etanercept disponible comercialmente proporcionado en una formulación que contiene arginina, se encontró sorprendente a la luz de la Patente de los Estados Unidos No. 7,648,702, las formulaciones estabilizadas con iones metálicos de etanercept descritas y ejemplificadas en este documento no requieren arginina para la estabilización a largo plazo, aunque la arginina aún se puede añadir si se desea. La capacidad de proporcionar formulaciones de etanercept estabilizadas sin arginina representa un beneficio potencialmente significativo para el sistema de atención médica al proporcionar a los pacientes y a los proveedores de atención médica formulaciones alternativas de etanercept que pueden estar disponibles a un menor coste en comparación con la presente formulación comercial de etanercept (esto es, Enbrel®) que requieren arginina para su estabilización.

Como se usa en este documento, el término "inestabilidad" o términos similares indica la tendencia del monómero de etanercept a experimentar una variedad de transformaciones no deseadas durante el almacenamiento. Tales transformaciones incluyen la formación de oligómeros y agregados de alto peso molecular (en lo que sigue denominados "agregados") en los que múltiples copias del monómero de etanercept esencialmente intacto se asocian de manera irreversible entre sí a través de una variedad de atracciones no covalentes (por ejemplo, interacciones electrostáticas). Las transformaciones no deseadas durante el almacenamiento también pueden incluir la degradación del monómero etanercept a fragmentos más pequeños y/o especies recortadas. Idealmente, una fórmula de etanercept debería minimizar, en la mayor medida posible, la tendencia de la formulación a dar como resultado, durante el almacenamiento, la formación de agregados, proteínas, oligómeros y/o fragmentos del etanercept plegados incorrectamente. Un beneficio importante que resulta de la capacidad para reducir la formación de agregados o fragmentos no deseados es una reducción en la toxicidad potencial y/o inmunogenicidad del fármaco.

Se debe entender que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solo de ejemplo y explicativas y no son restrictivas de la invención, como se reivindica.

#### Descripción detallada de la invención

Como se usa en la descripción y en todas las reivindicaciones, el significado de "un", "una" y "el" incluye una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, tal como se usa en la descripción y en todas las reivindicaciones, el significado de "en" incluye "en" y "sobre" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Adicionalmente, algunos términos usados en esta especificación se definen más específicamente a continuación.

#### Definiciones

Los términos usados en esta especificación tienen generalmente sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la invención, y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos que se usan para describir la invención se discuten a continuación, o en otra parte de la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional al profesional con respecto a la descripción de la invención. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos. Un recital de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier parte de esta especificación, incluidos los ejemplos de cualquiera de los términos discutidos en este documento, es solo ilustrativo, y de ninguna manera limita el alcance y el significado de la invención o de cualquier término ejemplificado.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en el arte al que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, incluidas las definiciones.

"Alrededor de", "casi" o "aproximadamente" significará generalmente dentro del 2.0 por ciento, dentro del 10 por ciento, dentro del 5, 4, 3, 2 o 1 por ciento de un valor o intervalo dado. Las cantidades numéricas dadas son aproximadas, lo que significa que el término "alrededor". se puede inferir "casi" o "aproximadamente" si no se indica expresamente.

5 El término "etanercept" o "monómero de etanercept" o "monómero" es sinónimo de Enbrel®. Se refiere a un polipéptido que es un polipéptido de fusión dimérico que consiste en la parte de unión al ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) humano de 75 kilodalton (p75) unido a la parte Fc de la IgG1 humana. Consta de 934 aminoácidos y tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilodaltons. Para los propósitos de la presente solicitud, el término "etanercept" también abarca etanercept con modificaciones menores en la estructura de los aminoácidos (incluyendo deleciones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos) que no afectan significativamente la función, la potencia o la avidez del etanercept. El término "etanercept" abarca todas las formas y formulaciones de Enbrel®, incluyendo, pero no limitando a, las formulaciones concentradas, formulaciones inyectables listas para usar; formulaciones reconstituidas con agua, alcohol y/u otros ingredientes, y otras.

10 El término "monómero", como se usa en este documento, pretende significar la proteína de fusión de etanercept dimérica mencionada anteriormente.

El término "azúcar" se refiere a monosacáridos, disacáridos y polisacáridos. Los ejemplos de azúcares incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, trehalosa, dextrosa y otros.

15 El término "ion metálico" se refiere a un átomo de metal con una carga eléctrica neta positiva o negativa. Para los fines de la presente solicitud, el término "ion metálico" también incluye fuentes de iones metálicos, que incluyen, pero no se limitan a, sales metálicas.

20 Se entiende que el término "almacenamiento a largo plazo" significa que la composición farmacéutica se puede almacenar durante tres meses o más, durante seis meses o más, y preferiblemente durante un año o más. Por almacenamiento a largo plazo también se entiende que la composición farmacéutica se almacena ya sea como un líquido a 2-8 °C, o está congelada, por ejemplo, a -20 °C, o más fría. También se contempla que la composición se puede congelar y descongelar más de una vez.

25 Se entiende que el término "estable" o "estabilizado" con respecto al almacenamiento a largo plazo significa que el contenido de etanercept en las composiciones farmacéuticas no pierde más del 20%, o más preferiblemente el 15%, o incluso más preferiblemente el 10%. y, más preferiblemente, el 5% de su actividad en relación con la actividad de la composición al comienzo del almacenamiento.

30 El término "mamífero" incluye, pero no se limita a, un ser humano.

35 El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un relleno sólido, semisólido o líquido no tóxico, diluyente, material de encapsulación, auxiliar de formulación o excipiente de cualquier tipo convencional. Un portador farmacéuticamente aceptable no es tóxico para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación.

40 El término "composición" se refiere a una mezcla que generalmente contiene un portador, tal como un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable que es convencional en la técnica y que es apropiado para la administración en un sujeto con fines terapéuticos, de diagnóstico o profilácticos. Puede incluir un cultivo celular en el que el polipéptido o polinucleótido está presente en las células o en el medio de cultivo. Por ejemplo, las composiciones para administración oral pueden formar soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, enjuagues orales o polvos.

Los términos "composición farmacéutica" y "formulación" se usan indistintamente.

45 El término "tratamiento" se refiere a cualquier administración o aplicación de remedios para la enfermedad en un mamífero e incluye inhibir la enfermedad, detener su desarrollo, aliviar la enfermedad, por ejemplo, al provocar una regresión, o restaurar o reparar una pérdida, perdida, o función defectuosa; o estimulando un procedimiento ineficiente. El término incluye obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, que cubra cualquier tratamiento de una afección o trastorno patológico en un mamífero. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente un trastorno o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para un trastorno y/o un efecto adverso atribuible al trastorno. Incluye (1) prevenir que el trastorno ocurra o se repita en un sujeto que puede estar predispuesto al trastorno pero que aún no presenta síntomas, (2) inhibir el trastorno, tal como detener su desarrollo, (3) detener o terminar el trastorno o al menos sus síntomas asociados, de modo que el huésped ya no sufra el trastorno o sus síntomas, tal como la regresión de las causas del trastorno o sus síntomas, por ejemplo, restaurando o reparando una función perdida, perdida o defectuosa, o estimulando un procedimiento ineficiente, o (4) aliviar, aliviando o mejorando el trastorno, o los síntomas asociados con el mismo, donde la mejora se usa en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción en la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor y/o tamaño del tumor.

El término "enfermedad" se refiere a cualquier afección, infección, trastorno o síndrome que requiere intervención médica o para la que es deseable una intervención médica. Tal intervención médica puede incluir tratamiento, diagnóstico y/o prevención.

5 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que, cuando se administra a un sujeto vivo, logra un efecto deseado sobre el sujeto vivo. Por ejemplo, una cantidad eficaz del polipéptido de la invención para administración al sujeto vivo es una cantidad que previene y/o trata una enfermedad mediada por integrina  $\alpha V\beta 3$ . La cantidad exacta dependerá del propósito del tratamiento, y un experto en el arte la podrá determinar usando técnicas conocidas. Como es sabido en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para la administración sistémica versus localizada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la interacción del fármaco y la gravedad de la afección, y se podrán determinar con la experimentación rutinaria mediante los expertos en el arte.

El término "T<sub>1</sub>" se refiere a un punto en el tiempo en el que una formulación de etanercept se ha almacenado durante aproximadamente una semana a 40 °C

15 El término "T<sub>2</sub>" se refiere a un punto en el tiempo en el que se ha almacenado una formulación de etanercept durante aproximadamente dos semanas a 40 °C

El término "T<sub>4</sub>" se refiere a un punto en el tiempo en el que una formulación de etanercept se ha almacenado durante aproximadamente cuatro semanas a 40 °C.

20 El término "M<sub>3</sub>" se refiere, colectivamente, a tres puntos en el tiempo, y en particular a un resultado analítico que se observa para una formulación de etanercept después de una duración de ya sea aproximadamente uno, aproximadamente dos o aproximadamente tres meses de almacenamiento a una temperatura de almacenamiento de 5 °C. Por ejemplo, la referencia en este documento a un análisis que se realiza en M<sub>3</sub> debe entenderse en el sentido de que tal análisis se realiza en el momento en que la formulación de etanercept ha estado almacenada durante un tiempo seleccionado desde aproximadamente uno, aproximadamente dos, o aproximadamente tres meses. De este modo, un requisito en este documento de que una formulación de etanercept provoca un determinado valor analítico o medición en M<sub>3</sub> se satisface si el valor requerido se observa en un punto en el tiempo correspondiente a al menos una de las siguientes duraciones de almacenamiento: a aproximadamente un mes, a aproximadamente dos meses o aproximadamente a los tres meses de almacenamiento a 5 °C.

30 Los términos "Pico 1", "Pico 2" y "Pico 3" cuando se usan en este documento en relación con la discusión de los resultados de la cromatografía HIC se refieren a los mismos picos 1, 2 y 3 descritos en la Patente de los Estados Unidos 7,294,481.

Realizaciones de la divulgación.

35 Cuando las composiciones farmacéuticas que contienen etanercept (Enbrel®), incluidas las composiciones acuosas y liofilizadas para mutaciones de etanercept, se almacenan a largo plazo, la actividad de etanercept se puede perder o disminuir debido a la inestabilidad del monómero de etanercept mediante agregación y/o degradación química incluyendo la formación de fragmentos. De este modo, en este documento se describen varias formulaciones acuosas de etanercept que permiten el almacenamiento estable a largo plazo de etanercept, de modo que el etanercept es estable en el transcurso del almacenamiento, ya sea en estado líquido o congelado. Las formulaciones proporcionadas incluyen, pero no se limitan a formulaciones que no requieren etapas adicionales, tales como la rehidratación.

40 Estas realizaciones se explican con mayor detalle a continuación.

Etanercept

45 Todas las composiciones de la presente divulgación comprenden etanercept (Enbrel®). Como se explica en la sección de antecedentes de esta solicitud, etanercept es un polipéptido de fusión dimérico que consiste en la parte de unión al ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) humano de 75 kilodalton (p75) unido a la parte Fc de la IgG1 humana. El etanercept consiste en 934 aminoácidos. El componente Fc de etanercept contiene el dominio pesado constante 2 (CH2), el dominio pesado constante 3 (CH3) y la región bisagra de la IgG1 humana. Un dominio Fc puede contener uno o todos los dominios descritos anteriormente.

50 El etanercept apropiado para el almacenamiento en la presente composición farmacéutica se puede producir por células hospedadoras vivas que expresan etanercept, tales como hibridomas en el caso de anticuerpos, o células hospedadoras que se han modificado genéticamente para producir el polipéptido en el caso de polipéptidos o anticuerpos de fusión. Los métodos de células modificados por ingeniería genética para producir polipéptidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds. (1990), Current Protocols in Molecular Biology (Wiley, New York). Tales métodos incluyen la introducción de ácidos nucleicos que codifican y permiten la expresión del polipéptido en células huésped vivas. Estas células huésped pueden ser células bacterianas, células fúngicas o, preferiblemente, células animales cultivadas en cultivo. Las células huésped bacterianas incluyen, pero no se limitan a, células de *Escherichia coli*. Los ejemplos de cepas de *E. coli* apropiadas incluyen: HB101, DH5.alpha, GM2929,

JM109, KW251, NM538, NM539, y cualquier cepa de *E. coli* que no logre escindir el ADN extraño. Las células huésped fúngicas que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Aspergillus*. Algunos ejemplos de líneas celulares de animales que se pueden usar son CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, y W138. Se pueden establecer nuevas líneas celulares de animales usando métodos bien conocidos por los expertos en el arte (por ejemplo, por transformación, infección viral y/o selección). Opcionalmente, las células huésped pueden secretar el etanercept en el medio.

La purificación del etanercept expresado se puede realizar mediante cualquier método estándar. Cuando el etanercept se produce intracelularmente, los residuos en partículas se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando se secreta etanercept en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se pueden concentrar primero usando filtros estándar de concentración de polipéptidos. Los inhibidores de la proteasa también se pueden añadir para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de microorganismos.

El etanercept se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, y cualquier combinación de técnicas de purificación conocidas o aún por descubrir, que incluyen, pero no se limitan, cromatografía de proteína A, fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSSET®, cromatografía de resina de intercambio de aniones o catión (tales como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio.

Etanercept estabilizado con un ion de metal

La invención proporciona una composición farmacéutica acuosa estabilizada que no contiene arginina y que comprende etanercept y un estabilizante para inhibir la inestabilidad, agregación y/o fragmentación del etanercept, en la que el estabilizante comprende un ion metálico estabilizante, específicamente magnesio 2-10 mM.

Sin pretender vincularse a ninguna teoría particular de la invención, se cree que los iones metálicos, tales como el magnesio, actúan como estabilizantes conformacionales para reducir la tendencia del etanercept a agregarse. Se cree que la reducción en la agregación dura por un largo periodo de tiempo, por ejemplo, dos años o más. Sin desear estar ligado a una teoría particular, se cree que los iones metálicos pueden estabilizar composiciones farmacéuticas acuosas que contienen etanercept porque el metal se puede unir al estado nativo, donde ocurre la geometría correcta de los ligandos. Al hacerlo, hay una estabilización neta del estado nativo. Una vez que la proteína se despliega, el sitio de unión se pierde y el estado desnaturalizado no se ve afectado en términos de energía libre. El resultado es una estabilización neta de la conformación, que conduce a un mejor almacenamiento a largo plazo. Además, la unión de metales también puede mejorar la estabilidad coloidal de la proteína, lo que lleva a una disminución de la agregación y una mayor solubilidad. Los efectos de estabilización del ion metálico pueden no estar limitados a la reducción de agregados, pero también pueden abordar otros aspectos de la inestabilidad del monómero de etanercept en la formulación.

En una realización preferida, el ion metálico es cloruro de magnesio.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar combinando, un etanercept purificado y un ion metálico. Además, se pueden añadir según sea necesario una solución reguladora, un modificador de la tonicidad y un excipiente adicional y otros ingredientes inactivos de uso común. Para simplificar, estos se discuten con más detalle más adelante en la memoria descriptiva. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica entenderá que la combinación de los diversos componentes a incluir en la composición se puede realizar en cualquier orden apropiado. Por ejemplo, la solución reguladora se puede añadir primero, en la mitad o al final, y el modificador de la tonicidad también se puede añadir primero, en la mitad o al final. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica también entenderá que algunos de estos productos químicos pueden ser incompatibles en ciertas combinaciones, y de acuerdo con lo anterior, se pueden sustituir fácilmente con diferentes productos químicos que tienen propiedades similares pero que son compatibles en la mezcla relevante.

Según la invención, la concentración del ion metálico en las formulaciones proporcionadas es de 2 a 10 mM, preferiblemente de 1 mM a 10 mM.

Las fuentes de iones metálicos están disponibles de proveedores comerciales.

En una realización que usa cloruro de magnesio para la estabilización, una formulación de etanercept de la invención puede comprender de 25 a 50 mg/ml de etanercept; cloruro de magnesio de 1 mM a 10 mM; opcionalmente hasta 6% en peso de sacarosa; NaCl de 25 a 150 mM; fosfato de sodio de 1 a aproximadamente 30 mM; en la que la composición tiene un pH de 6.0 a pH 7.0, y más preferiblemente de 6.0 a 6.6 y más preferiblemente de 6.3 a 6.5.

Las composiciones estabilizadas con iones metálicos se caracterizan preferiblemente por tener un análisis de SEC en T<sub>2</sub> de: 80% en peso a 95% en peso del contenido de monómero; un análisis de SEC en T<sub>2</sub> del contenido de

agregados de menos de 4% en peso; y un análisis de SEC en T<sub>2</sub> del contenido del fragmento 3 de menos del 8% en peso.

En un aspecto, las formulaciones de etanercept que contienen un ion metálico estabilizante según la invención provocan una estabilidad caracterizada por:

5 (a) un análisis de SEC en T<sub>4</sub> superior a 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 o 97% en peso del contenido de monómero; y menos de 3, 2 o 1% en peso de contenido de agregados; y

10 (b) un análisis de HIC en T<sub>2</sub> en el que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 3, 2 o 1% en peso; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es mayor que 80, 81, 82, 83, 84 o 85% en peso; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, o 13 % en peso; y

(c) un análisis de HIC en T<sub>4</sub> en el que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 3, 2 o 1% en peso; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es mayor que 80, 81, 82, 83, 84 o 85% en peso; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14 o 13 % en peso.

15 Las formulaciones de etanercept de la presente invención que contienen iones metálicos para estabilización se caracterizan más preferiblemente por tener un análisis de HIC en T<sub>4</sub> o T<sub>2</sub> en el que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 1%; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es mayor que 95% en peso y más preferiblemente mayor que 99% en peso; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 3% en peso.

20 Los términos "SEC", "T<sub>2</sub>" "T<sub>4</sub>" "HIC" "contenido de monómero" "agregados (s)" y "fragmento 3" "pico 1", "pico 2" y "pico 3" son definidos anteriormente y en los ejemplos a continuación.

25 Las formulaciones de etanercept preferidas estabilizadas con cloruro de magnesio comprenden: cloruro de magnesio de 1 mM a 10 mM; opcionalmente hasta 6% en peso de sacarosa; NaCl 25 a 150 mM; fosfato de sodio 1 a 30 mM; en el que la composición tiene un pH de 6.0 a 6.6; y en el que la composición se caracteriza por: un análisis de SEC en T<sub>4</sub> de más del 97% en peso del contenido de monómero y menos de 1% en peso de contenido de agregados; un análisis de HIC en T<sub>2</sub> en el que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 4% en peso; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es más del 85% en peso; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 14% en peso; y un análisis de HIC en T<sub>4</sub> en el que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 2% en peso; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es más del 85% en peso; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 14% en peso.

35 En una realización adicional, la composición de etanercept estabilizada con iones metálicos, el estabilizante es cloruro de magnesio, la formulación está libre de arginina, y la formulación provoca una estabilidad de almacenamiento a largo plazo caracterizada por:

Análisis de SEC en M<sub>3</sub> de: contenido de monómero superior al 90%; contenido de agregados de menos de 3% en peso; y el contenido del fragmento 3 menos del 5% en peso; y

40 Análisis de HIC en M<sub>3</sub> en el que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 3% en peso; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es más del 80% en peso; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 20% en peso.

En una realización adicional, el estabilizante es cloruro de magnesio, y la composición estabilizada provoca una estabilidad de almacenamiento a largo plazo caracterizada por:

45 Análisis de SEC en M<sub>3</sub> o T<sub>4</sub> de más del 90% en peso del contenido de monómero; menos del 3% en peso de contenido de agregados; y menos del 5% en peso del fragmento 3; y

El análisis de HIC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub> en el que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 3% en peso; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es más del 80% en peso; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 20% en peso.

50 En una realización preferida adicional de la invención que usa cloruro de magnesio para la estabilización, una formulación de etanercept estabilizada que tiene las propiedades analíticas mencionadas anteriormente comprende: 50 mg/ml de etanercept; cloruro de magnesio 10 mM; fosfato de sodio 15 mM; cloruro de sodio 75 mM; y 3% en peso de sacarosa; y teniendo un pH de 6.3 a 6.5.

En otra realización preferida, una composición de etanercept estabilizada con cloruro de magnesio según la invención provoca una estabilidad de almacenamiento a largo plazo caracterizada por: un análisis de HIC en M<sub>3</sub> en la que la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es mayor que o igual al 95% en peso; y en la que, si el pico 3 está presente en el cromatograma de HIC, la cantidad de la composición representada por el pico 3 es menos de o igual al 1% en peso.

Se ha encontrado que las formulaciones de etanercept estabilizadas con ion metálico, que no contienen arginina, provocan una estabilidad durante tres meses de almacenamiento a 5 °C que es comparable o mejor que la formulación actualmente disponible que contiene arginina de Enbrel disponible comercialmente. De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere además a formulaciones de etanercept estabilizadas con iones metálicos, que no contienen arginina, y en las que la composición, después del almacenamiento a 5 °C durante uno, dos o tres meses, provoca una estabilidad de almacenamiento a largo plazo que cumple con uno o ambos los siguientes criterios cuando se evaluaron en un punto en el tiempo seleccionado de uno o más de los siguientes: a aproximadamente un mes, a aproximadamente dos meses o aproximadamente tres meses después del inicio del almacenamiento de la composición a una temperatura de almacenamiento de 5 °C:

(A) estabilidad comparable o mejor que el etanercept disponible comercialmente comercializado bajo la marca comercial Enbrel®, según se mide mediante (i) análisis de SEC de las cantidades de agregado (s), monómero y fragmento 3 en la composición (como se define en la memoria descriptiva) y (ii) análisis HIC de cantidades de material en la composición correspondiente a los picos 1, 2 y 3 del cromatograma de HIC (como se define en la memoria descriptiva); y

(B) un cromatograma de HIC en el que (i) el pico 3 está ausente, o esencialmente ausente y (ii) el pico 2 representa más del 95% en peso de la composición; un cromatograma de SEC que no contiene esencialmente ningún pico correspondiente a los agregados; y un cromatograma de SEC en el que el contenido de monómero representa al menos aproximadamente el 95% en peso de la composición.

Los términos "SEC", "T<sub>2</sub>" "T<sub>4</sub>" "HIC" "contenido de monómero" "agregados (s)" y "fragmento 3" "pico 1", "pico 2" y "pico 3" son definidos anteriormente y en los ejemplos a continuación.

Componentes adicionales de las composiciones farmacéuticas proporcionadas

Las formulaciones de la invención también pueden incluir soluciones reguladoras, modificadores de tonicidad, excipientes, portadores farmacéuticamente aceptables y otros ingredientes inactivos usados comúnmente de las composiciones farmacéuticas. Para simplificar, estos se discuten más detalladamente más adelante en la aplicación.

Las soluciones reguladoras mantienen el pH en un intervalo deseado. Las soluciones reguladoras apropiadas incluyen histidina, fosfato de potasio, citrato de sodio o potasio, ácido maleico, acetato de amonio, tris-(hidroximetil)-aminometano (tris), diversas formas de acetato y dietanolamina. La concentración de la solución reguladora en la formulación está preferiblemente entre aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1M, y más preferiblemente aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM. Las soluciones reguladoras son bien conocidos en la técnica y se fabrican por métodos conocidos y están disponibles de proveedores comerciales.

Los ejemplos de soluciones reguladoras apropiadas son fosfato, histidina, citrato, maleato, tartrato, succinato, acetato, tris- (hidroximetil)-aminometano (tris), bicarbonato.

En una realización preferida, la solución reguladora es fosfato de sodio.

En una realización preferida, el pH de la composición farmacéutica está en o cerca de niveles fisiológicos. De este modo, preferiblemente, el pH de las composiciones proporcionadas está entre aproximadamente 5.8 y aproximadamente 8.4; e incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 6.2 y aproximadamente 7.4. Un experto en el arte entenderá que el pH se puede ajustar según sea necesario para maximizar la estabilidad y la solubilidad del etanercept en una formulación particular. De este modo, las formulaciones de etanercept a un pH fuera de los intervalos fisiológicos, pero tolerables para el paciente, también están dentro del alcance de la invención.

Un modificador de la tonicidad es una molécula que contribuye a la osmolalidad de una solución. La osmolalidad de una composición farmacéutica se ajusta preferiblemente para maximizar la estabilidad del ingrediente activo y/o para minimizar las molestias para el paciente tras la administración, generalmente se prefiere que una composición farmacéutica sea isotónica con suero, esto es, que tenga la misma o similar osmolalidad, que se logra mediante la adición de un modificador de la tonicidad.

En una realización preferida, la osmolalidad de las formulaciones proporcionadas es desde aproximadamente 180 a aproximadamente 420 mOsM. Sin embargo, se debe entender que la osmolalidad puede ser mayor o menor según lo requieran las condiciones específicas.

Los ejemplos de modificadores de tonicidad apropiados para modificar la osmolalidad incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (sin incluir la arginina) (por ejemplo, cisteína, histidina y glicina), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio y citrato de sodio) y/o sacáridos (por ejemplo, sacarosa, glucosa y manitol).

Los modificadores de tonicidad preferidos son glicina, alanina, cloruro de sodio, cloruro de potasio y sulfato de sodio.

5 En una realización preferida, la concentración del modificador de la tonicidad en la formulación está preferiblemente entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 1 M, más preferiblemente aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM. Los modificadores de tonicidad son bien conocidos en la técnica y se fabrican por métodos conocidos y están disponibles en proveedores comerciales.

10 Los excipientes, también denominados aditivos químicos, cosolutos o cosolventes, que estabilizan el polipéptido mientras están en solución (también en forma seca o congelada) también se pueden añadir a una composición farmacéutica. Los excipientes son bien conocidos en la técnica y se fabrican por métodos conocidos y están disponibles en proveedores comerciales.

15 Los ejemplos de excipientes apropiadas incluyen, pero no se limitan a, azúcares/polioles, tales como: sacarosa, lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa; polímeros tales como: albúmina sérica (albúmina sérica bovina (BSA), SA humana o HA recombinante), dextrano, poli (alcohol vinílico) PVA, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), polietilenimina, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC); solventes no acuosos tales como: alcoholes polihídricos (por ejemplo, PEG y glicerol) y dimetilformamida (DMF); aminoácidos tales como: prolina, L-serina, ácido glutámico de sodio, alanina, glicina, clorhidrato de lisina, sarcosina y ácido gamma-aminobutírico; surfactantes tales como: Tween®-80 (polisorbato 80), Tween®-20 (polisorbato 20), SDS, polisorbato, poloxámeros; y varios excipientes tales como: fosfato de potasio, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, trimetilamina N-óxido, betaína, iones metálicos (por ejemplo, zinc, calcio y magnesio), CHAPS, monolaurato, 2-O-beta -manoglicerato o cualquier combinación de los anteriores.

20 Los excipientes preferidos son sacarosa, lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa, albúmina de suero bovino (BSA), albúmina de suero humano (HSA), albúmina recombinante, dextrano, PVA, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), polietilenimina, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC), polietilenglicol, etilenglicol, glicerol, alanina, glicina, clorhidrato de lisina, sarcosina, SDS, polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 188, N-óxido de trimetilamina, betaína, iones de zinc, iones de calcio, iones de magnesio, CHAPS, monolaurato de sacarosa y 2-O-beta-mannoglicerato.

25 La concentración de uno o más excipientes en una formulación de la invención está/están preferiblemente entre aproximadamente el 0.001 y el 5 por ciento en peso, más preferiblemente entre el 0.1 y el 2 por ciento en peso.

#### Métodos de tratamiento

En otra realización, la invención proporciona una composición según cualquiera de las reivindicaciones para uso en terapia.

35 En una realización preferida, el etanercept se deriva de la misma especie de mamífero que se va a tratar con la composición.

En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

40 Las enfermedades o trastornos que se pueden tratar con las composiciones proporcionadas incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Wegener (granulomatosis), enfermedad de Crohn (o enfermedad inflamatoria intestinal), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), Hepatitis C, endometriosis, asma, caquexia, psoriasis y dermatitis atópica. Las enfermedades o trastornos adicionales que se pueden tratar con las composiciones de la presente invención incluyen las descritas en los documentos WO 00/62790, WO 01/62272, la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos No. 2001/0021380, y la Patente de los Estados Unidos 7,648,702 B2.

45 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas se pueden administrar a un sujeto que necesita tratamiento por inyección sistémica, tal como por inyección intravenosa; o por inyección o aplicación en el sitio relevante, tal como por inyección o aplicación directas en el sitio cuando el sitio está expuesto en cirugía; o por aplicación tópica.

50 La cantidad terapéuticamente eficaz del etanercept en las composiciones proporcionadas dependerá de la afección que se va a tratar, la gravedad de la afección, la terapia previa y la historia clínica y la respuesta del paciente al agente terapéutico. La dosis adecuada se puede ajustar según el criterio del médico que lo atiende, de modo que se pueda administrar al paciente una vez o durante una serie de administraciones.

En una realización, la cantidad eficaz de etanercept por dosis para adultos es desde aproximadamente 1-500 mg/m<sup>2</sup>, o desde aproximadamente 1-200 mg/m<sup>2</sup>, o desde aproximadamente 1-40 mg/m<sup>2</sup> o desde aproximadamente 5-25 mg/m<sup>2</sup>.

Alternativamente, se puede administrar una dosis plana, cuya cantidad puede variar de 2-500 mg/dosis, 2-100 mg/dosis o desde aproximadamente 10-80 mg/dosis.

5 Si la dosis se va a administrar más de una vez por semana, un intervalo de dosis de ejemplo es el mismo que el intervalo de dosis descrito anteriormente o menor, y preferiblemente se administra dos o más veces por semana en un intervalo de dosis de 25-100 mg/dosis.

En otra realización, una dosis aceptable para administración por inyección contiene 80-100 mg/dosis, o alteración nativa, que contiene 80 mg por dosis.

La dosis se puede administrar semanalmente, cada dos semanas o por varias semanas (por ejemplo, de 2 a 8).

En una realización, el etanercept se administra a 25 a 75 mg/ml mediante una única inyección subcutánea (SC).

10 En algunos casos, se obtendrá una mejora en la condición de un paciente administrando una dosis de hasta aproximadamente 100 mg de la composición farmacéutica una a tres veces por semana durante un período de al menos tres semanas. El tratamiento por períodos más largos puede ser necesario para inducir el grado deseado de mejoría. Para condiciones crónicas incurables, el régimen se puede continuar indefinidamente. Para pacientes pediátricos (edades 4-17), un régimen apropiado puede implicar administrar una dosis de 0.4 mg/kg a 5 mg/kg de etanercept, una o más veces por semana.

15 En otra realización, las formulaciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar en una formulación a granel, y como tales, los componentes de la composición farmacéutica se ajustan para ser más altos de lo que se requeriría para la administración y se diluyen apropiadamente antes de la administración.

20 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar como un único agente terapéutico o en combinación con terapias adicionales según sea necesario. De este modo, en una realización, las composiciones farmacéuticas proporcionadas se usan en combinación con la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo. El otro agente activo se puede administrar antes, durante o después de administrar las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Otro agente activo se puede administrar ya sea como parte de las composiciones proporcionadas, o alternativamente, como una formulación separada.

25 La administración de las composiciones farmacéuticas proporcionadas se puede lograr de diversas maneras, incluyendo inyección parenteral, peroral, bucal, sublingual, nasal, rectal, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intracardíaca, intraventricular, intracraneal, intratraqueal, administración intratecal, inyección intramuscular, inyección intravítrea y aplicación tópica.

30 Las composiciones farmacéuticas de esta invención son particularmente útiles para administración parenteral, esto es, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intracerebrospinal, intraarticular, intrasinovial, intravítrea y/o intratecal. La administración parenteral puede ser mediante inyección en bolo o infusión continua. Las composiciones farmacéuticas para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Además, se han desarrollado una serie de enfoques de administración de fármacos recientes y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son apropiadas para la administración usando estos nuevos métodos, por ejemplo, Injetease®, Genject®, 35 bolígrafos para inyectores tales como GenPen® y dispositivos sin agujas, tales como MediJector® y BioJector®. La presente composición farmacéutica también se puede adaptar para los métodos de administración aún por descubrir. Véase también Langer, 1990, Science, 249:1527-1533.

40 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, las formulaciones se pueden modificar con materiales poliméricos o hidrófobos apropiadas (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

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

50 También se describe un kit o recipiente, que contiene una composición farmacéutica acuosa de la invención. La concentración del polipéptido en la composición farmacéutica acuosa puede variar en un amplio intervalo, pero generalmente está dentro del intervalo desde aproximadamente 0.05 a aproximadamente 20,000 microgramos por mililitro ( $\mu\text{g/ml}$ ) de formulación acuosa. El kit también puede ir acompañado de instrucciones de uso.

La presente invención se describe más particularmente en los siguientes ejemplos que pretenden ser solo ilustrativos, ya que muchas modificaciones y variaciones en los mismos serán evidentes para los expertos en el arte.

Ejemplo 1

Etanercept estabilizado con cloruro de calcio (comparativo)

Las formulaciones de etanercept se pueden preparar usando los siguientes procedimientos:

5 Cada componente de formulación sólida se pesa a la cantidad requerida para un volumen dado de solución reguladora de formulación. Estos componentes se combinan en un vaso de precipitados o recipiente capaz de transportar y medir el volumen dado de solución reguladora de formulación. Se añade al vaso de precipitados un volumen de agua desionizada igual a aproximadamente  $\frac{3}{4}$  de la solución reguladora de formulación dada al objetivo, y luego se solubilizan los componentes. El pH de la solución reguladora se ajusta al pH de la formulación diana usando hidróxido de sodio 1 M y/o cloruro de hidrógeno 1 M. El volumen de la solución reguladora de formulación final se eleva luego al volumen diana mediante la adición de agua desionizada. La solución de proteína de etanercept se coloca en un recipiente de material de diálisis (tal como la unidad de diálisis Thermo Scientific Slide-A-Lyzer MINI de 10,000 MWCO), que luego se coloca en contacto con la solución reguladora de formulación deseada durante 12 horas a 4 °C. La proporción en la formulación de volumen de solución reguladora a volumen de solución de proteína no debe ser menos de 1000:1. El recipiente de diálisis y la solución de proteína que contiene se colocan luego en un segundo volumen igual de solución reguladora de formulación durante 12 horas adicionales a 4 °C. La solución de proteína resultante se retira del recipiente del material de diálisis y la concentración de proteína se determina mediante espectroscopia ultravioleta. La concentración de proteína se ajusta al nivel deseado mediante centrifugación (tales como los concentradores centrífugos Amicon Ultra 10,000 MWCO) y/o dilución con solución reguladora de formulación.

20 Las composiciones se pueden probar para determinar la estabilidad a largo plazo mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), SEC desnaturalizada (dSEC), cromatografía de interacción hidrofoba (HIC), electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y para la unión y bioactividad en diversos puntos de tiempo. La bioactividad se puede medir mediante cualquier número de ensayos conocidos.

25 Por ejemplo, las técnicas de cromatografía de exclusión por tamaño se describen en Hawe et al, Pharm. Res. 2011, 28: 2302 y/o van Marrschalkerweerd et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 2011, 78: 213. De manera similar, las técnicas de cromatografía de exclusión de tamaño desnaturalizado, cromatografía de interacción hidrofoba y electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio y poliacrilamida también son bien conocidas para los expertos en el arte.

Se cree que la composición será estable en el término de dos años o más.

(Formulación P1:1)

Ingrediente	concentración
Etanercept (ingrediente activo)	50 mg/ml
Cloruro de calcio (ingrediente inactivo)	2 mM
Fosfato de sodio, pH 6.3 (inactivo)	25 mM

30

(Formulación 1:11)

Ingrediente	concentración
Etanercept (ingrediente activo)	50 mg/ml
Cloruro de calcio (ingrediente inactivo)	2 mM
Fosfato de sodio, pH 6.3 (inactivo)	25 mM
NaCl (inactivo)	100 mM
Sacarosa (inerte)	2,5 % (p/v)

(Formulación 1:18)

Ingrediente	concentración
Etanercept (ingrediente activo)	50 mg/ml

Cloruro de calcio (ingrediente inactivo)	2 mM
Fosfato de sodio, pH 6.3 (inactivo)	25 mM
Xilitol (inactivo)	10 mM

(Formulación 3:6)

Ingrediente	concentración
Etanercept (ingrediente activo)	50 mg/ml
Cloruro de calcio (ingrediente inactivo)	2 mM
Fosfato de sodio, pH 6.3 (inactivo)	15 mM
NaCl (inactivo)	75 mM
Sacarosa (inactivo)	3 % (p/v)

(Formulación 3:9)

Ingrediente	concentración
Etanercept (ingrediente activo)	50 mg/ml
Cloruro de calcio (ingrediente inactivo)	1 mM
Fosfato de sodio, pH 6.6 (inactivo)	10 mM
NaCl (inactivo)	50 mM
Trehalosa (inactivo)	5 % (p/v)

5

Ejemplo 2

Etanercept estabilizado con cloruro de magnesio

Las formulaciones de etanercept estabilizadas con cloruro de magnesio se pueden preparar y probar usando los procedimientos similares a los descritos en el ejemplo 1. Las formulaciones de etanercept ejemplificadas a continuación no contienen arginina

10

(Formulación P1:2)

Ingrediente	concentración
Etanercept (ingrediente activo)	50 mg/ml
Cloruro de magnesio ingrediente inactivo)	2 mM
Fosfato de sodio, pH 6.3 inactivo)	25 mM

(Formulación 2:15)

Ingrediente	concentración
Etanercept (ingrediente activo)	50 mg/ml

## ES 2 734 070 T3

Cloruro de magnesio (ingrediente inactivo)	4 mM
Fosfato de sodio, pH 6.4 (inactivo)	25 mM
NaCl (inactivo)	100 mM
Sacarosa (inactivo)	2.5 % (p/v)

(Formulación 3:7)

Ingrediente	concentración
Etanercept (ingrediente activo)	50 mg/ml
Cloruro de magnesio (ingrediente inactivo)	5 mM
Fosfato de sodio, pH 6.3 (inactivo)	15 mM
NaCl (inactivo)	75 mM
Sacarosa (inactivo)	2.5% (p/v)

(Formulación 3:14)

Ingrediente	concentración
Etanercept (ingrediente activo)	50 mg/ml
Cloruro de magnesio (ingrediente inactivo)	10 mM
Fosfato de sodio, pH 6.3 (inactivo)	25 mM
NaCl (inactivo)	110 mM
Sacarosa (inactivo)	1 % (p/v)

5

(Formulación 4:2)

Ingrediente	concentración
Etanercept (ingrediente activo)	50 mg/ml
Cloruro de magnesio (ingrediente inactivo)	10 mM
Fosfato de sodio, pH 6.5 (inactivo)	15 mM
NaCl (inactivo)	75 mM
Sacarosa (inactivo)	3 % (p/v)

### Ejemplo 3

Etanercept estabilizado con cloruro de zinc (comparativo)

- 10 Las formulaciones de etanercept estabilizadas con cloruro de zinc se pueden preparar y probar usando los procedimientos similares a los descritos en el ejemplo 1.

La formulación de etanercept ejemplificada a continuación no contiene arginina

(Formulación P1:3)

Ingrediente	concentración

Etanercept (ingrediente activo)	50 mg/ml
Cloruro de zinc (ingrediente inactivo)	2 mM
Fosfato de sodio, pH 6.3 (inactivo)	25 mM

## Ejemplo 4

## Preparación de etanercept

5 Etapa 1. Expansión celular. De una manera conocida en la técnica, la expansión celular necesaria para generar un número suficiente de células para la inoculación de un biorreactor de producción se realiza usando un clon de células CHO que expresan la proteína de fusión etanercept. El producto de este procedimiento de expresión (un fluido de cultivo celular recolectado) da como resultado una mezcla de etanercept plegada correctamente, así como etanercept plegada y/o agregada incorrectamente, junto con impurezas adicionales. El fluido de cultivo celular recogido que comprende tal mezcla de proteínas se somete a inactivación viral del detergente.

10 Etapa 2. Cromatografía de afinidad. La cromatografía de afinidad se realiza en el cultivo celular recolectado obtenido en la etapa 1 anterior usando una columna de afinidad de Proteína A convencional de una manera bien conocida. La recuperación del producto es de aproximadamente el 85%. El producto obtenido es una mezcla de proteínas complejas que comprende etanercept plegado correctamente, etanercept plegado incorrectamente y/o agregados de etanercept plegado correctamente y/o incorrectamente, o fragmentos de proteínas. El producto obtenido de esta  
15 etapa de purificación de la columna de afinidad de la Proteína A se ajusta a pH 3.5 y luego se somete a una etapa de inactivación viral. Después de la inactivación viral, el producto se ajusta a pH 5.5 y luego se aclara más de una manera conocida usando un filtro de cápsula obtenido comercialmente.

20 Etapa 3A. Cromatografía de intercambio catiónico en modo mixto. Se usa una columna de cromatografía GE Healthcare Capto MMC de lecho empacado de 31.8 L (45 cm de diámetro x 20 cm de altura de lecho) para purificar el producto obtenido en la etapa 2 anterior. Antes de usar, la columna se equilibra con 2 CV de acetato 25 mM pH 5.5 y se desinfecta con 2 CV de NaOH 0.1 N, NaCl 1 M y se neutraliza con 2 CV de acetato 25 mM, NaCl 0.7 M, pH 5.5. La columna se equilibra luego con 8-10 CV de acetato 25 mM, pH 5.5, hasta que el efluente tiene un pH 5.5 y 3.5 mS/cm. La mezcla de Proteína A de la etapa 2 anterior se diluye a  $\leq 6$  mS/cm con WFI y se aplica a una columna de carga de hasta 15 g/L de medio para cada ciclo. La columna se opera a una velocidad lineal de 200 cm/h para  
25 dar un tiempo de residencia de 6 minutos. Después de cargar, la columna se lava con 2 CV de acetato 25 mM, pH 5.5. El producto se eluye luego con un gradiente de 8,5 CV, 15% a 85% de acetato 25 mM, pH 5.5 a acetato 25 mM, NaCl 0.7 M, pH 5.5. La recolección del producto comienza a 0.15 OD (A280, longitud de recorrido de 1.0 cm) y la recolección termina al 50% del máximo pico. El volumen de eluato es de aproximadamente 5 CV. El producto residual y los contaminantes se eliminan de la columna con 2 CV de Tris 10 mM, NaCl 1 M, pH 8.0 y se desechan. El  
30 producto obtenido de la columna de modo mixto se filtra usando un filtro de cápsula Durapore Millipore Opticap XL10, de 0.22  $\mu\text{m}$ , (0.69 m<sup>2</sup>). El producto obtenido de esta etapa representa una recuperación de aproximadamente el 70% del material de Proteína A obtenido en la etapa 2

## Etapa 3B. Cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto.

35 Se usa una columna de cromatografía GE Healthcare Capto Adhere de lecho empacado de 27.0 L (45 cm de diámetro x 17 cm de altura) para purificar aún más el producto obtenido en la etapa 3A anterior. Antes de usar, la columna se equilibra con 2 CV de Tris 25 mM, pH 8.0 y se desinfecta con 2 CV de NaOH 0.1 N, NaCl 1 M y se neutraliza y se equilibra con 2 CV de Tris 25 mM, pH 8.0. Antes de cargar el producto, la columna se equilibra con 3 CV de Tris 10 mM, pH 8.0. La mezcla Capto MMC de la etapa 3A anterior se ajusta a pH 8.1 con  $\sim 0.045$  kg de Tris 1 M, pH 8.3 por kg de mezcla. El producto de la etapa 3A anterior se diluyó en línea 1:3.8 con WFI para ajustar la conductividad a 12.0 mS/cm y pH 8.0. El material resultante se aplica luego a una columna de carga de hasta 15 g/L de medio. La columna se opera a una velocidad lineal de 170 cm/h para dar un tiempo de residencia de 6 minutos. Después de la carga, la columna se lava con 2 CV de Tris 25 mM, pH 8.0. El producto se eluye luego con un gradiente de 10 CV (20% a 90%) de Tris 25 mM, pH 8.0 a Tris 10 mM, NaCl 1 M, pH 8.0. La recolección del producto se inicia a 0.15 OD (A280, longitud de recorrido de 1.0 cm) y la recolección finaliza al 25% del máximo pico.  
40 El volumen de eluato es 4-6 CV. El producto eluido se filtra usando un filtro de cápsula disponible en el mercado y luego se somete de manera conocida a la filtración viral y las etapas de filtración de flujo tangencial. La recuperación total del producto de la etapa 3B (incluidas las etapas finales de filtración de flujo tangencial y viral) fue de aproximadamente el 68%. La recuperación del producto medida antes de las etapas de filtración fue aproximadamente 75%. En la figura 12 se representa una representación esquemática de los datos de HIC  
45 obtenidos en las fracciones de elución de esta etapa.

Análisis: Se encuentra que el producto filtrado final obtenido en este ejemplo tiene más de aproximadamente 90% en peso de etanercept plegado correctamente según lo determinado por HIC; menos del 5% en peso de especies de etanercept plegadas incorrectamente según lo determinado por HIC; menos de aproximadamente 3% en peso de

material recortado por análisis de HIC (se cree que son fragmentos de etanercept en los que se ha truncado la parte de TNFR) y una cantidad combinada de etanercept plegada correcta e incorrectamente de más del 95% en peso según lo determinado por la cromatografía de exclusión de tamaño.

Análisis de las formulaciones de etanercept

#### 5 A. Almacenamiento de estabilidad térmica

Después de la diálisis y la concentración, las muestras de las formulaciones de etanercept ejemplificadas anteriormente se filtraron de forma estéril en un gabinete de seguridad biológica. Usando pipetas esterilizadas y puntas de pipeta esterilizadas en autoclave, las muestras de las formulaciones de etanercept se transfirieron a viales de liofilización preetiquetados y autoclavados. Los viales se taparon con tapones de butilo estériles y se doblaron con tapas de aluminio. Luego todos los viales se transfirieron a hornos de estabilidad térmica. Las muestras se sometieron a dos regímenes de estabilidad térmica: (1) dos semanas a 40 °C y (2) cuatro semanas a 25 °C. A lo largo de esta especificación, estos dos regímenes de temperatura se denominan "T<sub>2</sub>" y "T<sub>4</sub>", respectivamente.

#### B. Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)

Las formulaciones de etanercept descritas en este documento se analizaron usando la técnica bien conocida de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), un método de cromatografía líquida de alto rendimiento en el que los analitos se separan por tamaño (véase Rogner, M. (2000). Cromatografía de exclusión de tamaño. Cromatografía líquida de proteínas. M. Kastner. Ámsterdam, Elsevier. 61: 89-145.). Para evaluar la estabilidad térmica de las muestras de etanercept descritas anteriormente, las muestras se examinaron mediante un método SEC basado en la literatura (van Maarschalkerweerd, A., G. J. Wolbink, et al. (2011). "Comparison of analytical methods to detect instability of etanercept during thermal stress testing." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 78(2): 213-221). La solución reguladora de fase móvil se preparó para contener monohidrato monobásico de fosfato de sodio 50 mM y arginina 150 mM. El pH se ajustó a 6.5 usando HCl 1M. Todas las separaciones se realizaron usando una columna protectora Tosoh TSK-Gel SWxl de 6 mm x 4 cm (No. de catálogo 8543) unida linealmente a una Tosoh TSK-Gel G4000 SWxl de 7,8 mm x 30 cm (No. de catálogo 8542). Para realizar una separación, las columnas se llevaron a temperatura ambiente (23 °C) y se equilibraron con la fase móvil a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Se inyectaron 5 microlitros de 50 mg/mL de formulación de etanercept en la columna usando un inyector automático. La separación se realizó durante 30 minutos a una velocidad de flujo de 0.5 mL/minuto. El eluyente de la columna se controló a una longitud de onda de 280 nm durante este tiempo.

#### C. Integración de cromatogramas de cromatografía de exclusión de tamaños

Toda la integración se realizó usando el software Chromeleon (Dionex). Antes de la integración, el cromatograma de SEC para una solución reguladora que no contenía etanercept se sustrajo de todos los cromatogramas. Toda la integración se realizó entre tiempos de retención de 12 minutos y 26 minutos. Se usaron varios parámetros para definir un pico. El área mínima para un pico detectado se estableció en 0.05 mAu \* min. La sensibilidad bidimensional para la detección de picos se estableció en 0.01 mAu y 75 segundos. Los hombros de pico se añadieron manualmente usando una herramienta de integración manual. Todos los picos detectados se ajustaron manualmente en dos etapas. Primero, las líneas de base de los picos (el límite inferior del pico) se ajustaron a la horizontal. En segundo lugar, las posiciones verticales de las líneas de base pico se ajustaron a las de la línea de base del cromatograma. El valor de líneas de base del cromatograma se definió como la señal en ausencia de analito. La señal en ausencia de analito se definió como la absorbancia en mAu a los 12 minutos de tiempo de retención.

#### D. Fracciones de SEC de las formulaciones de etanercept

En el análisis de SEC de las formulaciones de etanercept descritas anteriormente, se identificaron y estudiaron tres fracciones de cromatografía de SEC. Las fracciones que se analizaron fueron, en el orden de elución de la columna de SEC: (1) una fracción de alto peso molecular que representa agregados de la proteína de fusión TNFR:FC intacta de etanercept probablemente ensamblada mediante atracción electrostática no covalente entre moléculas de etanercept intactas (en lo que sigue "agregado (s)" o contenido (s) agregado (s)); (2) contenido de monómero, que representa la proteína de fusión TNFR: Fc de etanercept intacta (en lo que sigue denominado "monómero" de "contenido de monómero"); (3) una fracción que probablemente represente un fragmento o una población de fragmentos de la molécula de etanercept en la que una parte de la proteína de fusión TNFR:molécula se ha escindido del monómero; en la pérdida de un brazo de la parte Fab de la proteína de fusión en la región bisagra de la molécula. El fragmento o especie recortada más común, medido por SEC, se denomina fragmento 3. Al realizar el análisis de SEC, se observará que los agregados se eluyen primero, seguido del monómero, seguido del fragmento 3.

Las siguientes tablas muestran las cantidades relativas de agregado(s), monómero y fragmento 3 determinadas por análisis de SEC como se describió anteriormente.

# ES 2 734 070 T3

Tabla 1

Análisis de SEC del monómero			
Nota: Cantidades reportadas en las tablas I, II y III son porcentajes en peso T <sub>0</sub> = formulación mantenida a 5 C y analizada dentro de las 24 horas de la creación. T <sub>1</sub> = formulación almacenada durante una semana a 40°C T <sub>2</sub> = formulación almacenada durante dos semanas a 40 C			
Formulación No.	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>
Enbrel comercial (comparativo) [1:2]	98.81	92.58	87.64
1:11	98.60	92.08	89.71
1:18	98.27	92.89	88.21
2:15	98.18	--	88.22
3:6	98.07	--	90.75
3:7	98.09	--	89.60
3:9	97.90	--	91.44
3:14	98.22	--	90.54
4:2	98.62		90.47

Tabla II

Análisis de SEC de agregados			
Nota: Cantidades reportadas en las tablas I, II y III son porcentajes: en peso T <sub>0</sub> = formulación mantenida a 5 C y analizada dentro de las 24 horas de la creación. T <sub>1</sub> = formulación almacenada durante una semana a 40°C T <sub>2</sub> = formulación almacenada durante dos semanas a 40 C			
Formulación No.	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>
Enbrel comercial (comparativo)	0.09	0.59	1.02
1:11	0.1.2	0.50	0.64
1:18	0.24	0.65	1.61
2:15	0.27	--	1.83
3:6	0.23	--	1.27
3:7	0.28	--	0.93
3:9	0.37	--	0.73
3:14	0.25	--	0.91
4:2			1.56

Tabla III

Análisis del fragmento 3			
Nota: Cantidades reportadas en las tablas I, II y III son porcentajes en peso			
T <sub>0</sub> = formulación mantenida a 5 C y analizada dentro de las 24 horas de la creación.			
T <sub>1</sub> = formulación almacenada durante una semana a 40°C			
T <sub>2</sub> = formulación almacenada durante dos semanas a 40 C			
Formulación No	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>
Enbrel comercial (comparativo)	0.00	3.30	6.29
1:11	0.00	3.92	4.71
1:18	0.00	3.05	4.65
2:15	0.00		5.56
3:6	0		4.72
3:7	0		4.37
3:9	0		3.48
3:14	0		3.83
4:2			5.40

Tabla IV

Análisis de SEC del contenido de monómero		
(T <sub>4</sub> = 4 semanas/25°C)		
La tabla IV a continuación muestra el contenido de monómeros (etanercept) de las formulaciones de etanercept preparadas según la presente invención, cuando se almacenan durante cuatro semanas a 25 °C, indicada por el símbolo T <sub>4</sub> . En la siguiente tabla, T <sub>0</sub> representa las mediciones de SEC realizadas dentro de las 24 horas posteriores a la preparación de la formulación, a una temperatura de la muestra de 5 °C; y T <sub>4</sub> representa muestras de formulación de etanercept sometidas a análisis de SEC después de 4 semanas de almacenamiento a 25 °C.		
Formulación No.	Contenido de monómeros T <sub>0</sub>	Contenido de monómeros T <sub>4</sub>
Enbrel comercial (comparativo)	98.15	97.86
3:6	98.07	94.84
3:7	98.09	97.75
3:9	97.90	97.44
3:14	98.22	97.79
4:2	98.62	94.70

Tabla V

Análisis de SEC del contenido de agregados		
(T <sub>4</sub> = 4 semanas/25°C)		
La tabla V a continuación muestra el contenido de los agregados de las formulaciones de etanercept preparadas según la presente invención después del almacenamiento durante cuatro semanas a 25 °C. En la siguiente tabla, T <sub>0</sub> representa las mediciones de SEC realizadas dentro de las 24 horas posteriores a la preparación de la formulación, a una temperatura de la muestra de 5 °C; y T <sub>4</sub> representa muestras de formulación de etanercept sometidas a análisis de SEC después de 4 semanas de almacenamiento a 25 °C.		
Formulación No.	T <sub>0</sub> Contenido de agregado(s)	T <sub>4</sub> Contenido de agregado(s)
Enbrel comercial (comparativo)	0.28	0.25
3:6	--	0.57
3:7	0.28	0.31
3:9	0.37	0.41
3:14	0.25	0.28
4:2	--	0.57

## Análisis de HIC de las formulaciones de etanercept

5 Las siguientes tablas (Tablas VI y VII) muestran los resultados de la cromatografía de interacción hidrófoba ("cromatografía HIC") realizada en muestras 3: 5 y 3: 8. La cromatografía de HIC se llevó a cabo de una manera conocida en la técnica y generalmente se describe en la Patente de los Estados Unidos 7,294,481. Las muestras se evaluaron a (dentro de las 24 horas de la preparación a 5 °C) y nuevamente después de dos semanas de almacenamiento a 25 °C (t<sub>2</sub>) (véase la tabla VI) o después de 4 semanas de almacenamiento a 25 °C. (t<sub>4</sub>) (Véase la tabla VII) Se cree que el pico 1 en el cromatograma de HIC es o incluye "Fragmento 3", que se identifica y cuantifica usando SEC, como se menciona anteriormente en la discusión de los datos de SEC; el Pico 2 es el monómero de etanercept como se menciona anteriormente en la discusión de los datos de la SEC, y el Pico 3 incluye "Agregado (s)" como se menciona anteriormente en la discusión de los datos de la SEC. Además, se debe entender que los términos "pico 1", "pico 2" y "pico 3", como se usa en este documento, también constituye una referencia al pico 1, el pico 2 y el pico 3 de HIC mencionados y descritos en la figura 4 de la Patente de los Estados Unidos 7,294,481 incorporada en este documento como referencia.

15

Tabla VI

Datos de HIC después de dos semanas de almacenamiento a 40°C. (T <sub>2</sub> )						
Forma. #	Pico 1		Pico 2		Pico 3	
	T <sub>0</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>2</sub>
Enbrel comercial (comparativo)	0.91	3.23	86.72	83.41	12.33	13.36
3:6	0.72	3.44	85.91	83.26	13.36	13.30
3:7	0.74	3.52	86.11	82.41	13.15	14.07
3:9	0.69	2.39	90.93	85.09	8.38	12.52
3:14	0.71	2.51	87.14	84.54	12.15	12.95

Tabla VII

Datos de HIC después del almacenamiento a 25°C, durante 4 semanas (T <sub>4</sub> )						
Forma.#	Pico 1		Pico 2		Pico 3	
	T <sub>0</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>4</sub>
Enbrel comercial (comparativo)	0,91	1.09	86.76	86.95	12.33	11.97
3:6	0.55	1.40	85.50	84.07	13.96	14.53
3:7	0.74	1.63	86.11	85.65	13.15	12.72
3:9	0.69	1.05	90.93	86.46	8,38	12.50
3:14	0.71	1.13	87.14	85.58	12.15	13.29
4:2	0.63	1.38	85.16	84.38	14.21	14.25

Las tablas VIII a XVI, a continuación, contienen los resultados de las pruebas de estabilidad realizadas en las formulaciones 3:6 y 4:2. y que contiene material de etanercept producido de la manera generalmente descrita en el ejemplo 4 (Preparación de Etanercept). La estabilidad de las formulaciones se evaluó mediante el análisis de SEC, HIC y FlowCam para partículas subvisibles, con base en uno, dos y tres meses de almacenamiento a diversas temperaturas, incluyendo 5 °C. A continuación se presenta la metodología usada para realizar estos experimentos de estabilidad:

Almacenamiento a granel de etanercept. El etanercept a granel no formulado se almacenó a 2-8 °C como se indica en el prospecto de Enbrel®.

Espectroscopia UV. Se usó espectroscopia UV para determinar la concentración de proteína en diversas muestras de estabilidad. Se determinó que la absorbancia a 280 nm de la sustancia a granel (50 mg/mL de Enbrel) era de 0.625 usando una célula de longitud de recorrido de 0.1 mm, lo que lleva a un coeficiente de extinción de 1.30 mL/mg \* cm. Este valor fue utilizado para todos los cálculos en este proyecto.

Diálisis y concentración de la formulación de etanercept. Todos las soluciones reguladoras se prepararon en dos volúmenes de 1 L que contenían todos los componentes de la solución reguladora.

El material a granel se cargó en unidades de diálisis Slide-A-Lyzer (corte de 10 kD, volumen de uno a tres mL) después de un enjuague de cinco minutos de los casetes en agua desionizada. Las muestras de diálisis se sometieron a una diálisis de cinco horas a 2-8 °C en 1 L de solución reguladora, seguido de una segunda diálisis a 2-8 °C, durante la noche en un segundo 1 L de solución reguladora. Cuando se dializó la formulación de etanercept 3: 5, se usaron dos eventos de diálisis de 4 L, ya que se necesitaron 24 mL de proteína de reserva para la formulación.

Todas las muestras se concentraron por encima de su valor objetivo usando filtros de centrifuga de corte Amicon Ultra 10K (tamaño de 2 ml). Se usó UV para determinar la nueva concentración de muestras, que luego se diluyeron al nivel apropiado usando una solución reguladora de formulación.

Incubación de la muestra de estabilidad térmica. Después de la diálisis y la concentración, las muestras de estabilidad térmica se filtraron de forma estéril en una cabina de bioseguridad. Usando pipetas esterilizadas y puntas de pipeta esterilizadas en autoclave, las muestras se transfirieron a viales de liofilización de 1 ml precargados y autoclavados. Los viales se taparon con tapones de butilo estériles y se doblaron con tapas de aluminio. Luego, todos los viales se transfirieron a hornos de estabilidad térmica.

Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). La cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) se realizó usando diferentes métodos. En uno de los métodos SEC identificados en este documento como "Método 2", la solución reguladora de fase móvil se preparó para contener monohidrato monobásico de fosfato de sodio 50 mM y arginina HCl 150 mM. El pH se ajustó a 6.5 usando NaOH 1M. Las separaciones se realizaron usando un Phenomonex Yarra de 3 micras SEC 3000, 30 cm x 4.6 mm. Para realizar una separación, las columnas se llevaron a temperatura ambiente (23 °C) y se equilibraron con la fase móvil a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Se inyectó un microlitro de 50 mg/mL de formulación de etanercept en la columna usando un inyector automático. La separación se realizó durante 10 minutos a una velocidad de flujo de 0.5 mL/minuto. El eluyente de la columna se controló a una longitud de onda de 280 nm durante este tiempo.

En un método SEC alternativo, en lo que sigue denominado "Método 3", se usó NaCl como sal para la fase móvil a una concentración de 100 mM, pH 6.3, en reemplazo de arginina HCl.

En un método de SEC alternativo adicional, denominado en este documento "Método 1", el análisis de SEC se realizó de la siguiente manera: La solución reguladora de fase móvil se preparó para contener monohidrato monobásico de fosfato de sodio 50 mM y arginina 150 mM. El pH se ajustó a 6.5 usando HCl 1M. Toda la separación se realizó usando una columna protectora Tosoh TSK-Gel SWxl de 6 mm x 4 cm (No. de catálogo, 8543) unida linealmente a una Tosoh TSK-Gel G4000 SWxl de 7.8 mm x 30 cm (No. de catálogo 8542). Para realizar una separación, las columnas se llevaron a temperatura ambiente (23 °C) y se equilibraron con la fase móvil a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Se inyectaron 5 microlitros de 50 mg/mL de formulación de etanercept en la columna usando un inyector automático. La separación se realizó durante 30 minutos a una velocidad de flujo de 0.5 mL/minuto. El eluyente de la columna se controló a una longitud de onda de 280 nm durante este tiempo.

- 5
- 10 Integración de cromatograma de cromatografía de exclusión de tamaño. Toda la integración se realizó usando el software Chromeleon (Dionex). Antes de la integración, el cromatograma de SEC para una solución reguladora que no contenía etanercept se sustrajo de todos los cromatogramas. Toda la integración se realizó entre tiempos de retención de 2 minutos y 8 minutos. Se usaron varios parámetros para definir un pico. El área mínima para un pico detectado se estableció en 0.05 mAu \* min. La sensibilidad bidimensional para la detección de picos se estableció en 0.01 mAu y 75 segundos. Los hombros de pico se añadieron manualmente usando una herramienta de integración manual. Todos los picos detectados se ajustaron manualmente en dos etapas. Primero, las líneas de base de los picos (el límite inferior del pico) se ajustaron a la horizontal. En segundo lugar, las posiciones verticales de las líneas de base del pico se ajustaron a las de la línea de base del cromatograma. El valor de la línea base del cromatograma se definió como la señal en ausencia de analito. En este caso, la señal en ausencia de analito se definió como la absorbancia en mAu a los 2 minutos de tiempo de retención.
- 15
- 20

Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Las muestras de formulación se cargaron en viales de HPLC sin dilución antes de la inyección en columnas de cromatografía. Las muestras se separaron mediante HIC según los parámetros que se enumeran en la tabla a continuación.

Tabla 4. Descripción del método de HIC

Solvente A: sulfato de amonio 1.8 M, acetato de sodio 0.1 M pH 6.0					
Solvente B: 0.1 M acetato de sodio pH 6.0					
Temperatura de la columna: 35°C Columna: TSK-Gel Butyl NPR 14947					
Velocidad de flujo: 1.0 mL/min					
Detección: 280 nM					
Inyección: 0.5 uL, 50 mg/mL de Enbrel					
Gradiente A					
tiempo/minutos	% B				
0	0				
40	50				
50	100				
50.1	0				
55	0				

- 25 Descripción del método FlowCAM® para pruebas de formulaciones 3:6 y 4:2. El trabajo de desarrollo del método se realizó el 7/10/12 inicialmente usando un procedimiento de Manuel Prime Sin muestra (interfase de líquido a líquido). Se observaron efectos de mezcla pronunciados en la celda de flujo, por lo que se seleccionó un procedimiento de espacio de aire alternativo (Manual Prime con muestra) para la evaluación de la muestra.

- 30 Las formulaciones de referencia (T0) 3:6 y 4:2 se recibieron congeladas y se almacenaron a -20 °C hasta que se descongelaron a temperatura ambiente. Una vez descongelada, la formulación se almacenó a temperatura de refrigeración (2-8 °C). El método de muestra Tf0 incluyó un paso de tratamiento previo con solución reguladora correspondiente para acondicionar la celda de flujo. Antes de cargar la muestra, se vaciaron a través del sistema 0.4 mL o más de la solución reguladora de formulación correspondiente. Se determinó que este tratamiento previo no era necesario y, por lo tanto, no se usó para el punto de tiempo de prueba t3.
- 35

Las muestras de formulación 3:6 y 4:2 que habían sufrido tres meses de estrés por calor a 5 °C y 25 °C se evaluaron en el análisis FlowCAM. Todas las muestras se descongelaron el día en que se analizaron. Una vez descongeladas, se almacenaron a temperatura de refrigeración (2-8 °C).

## ES 2 734 070 T3

### Instrumentación y accesorios

Instrumento FlowCAM	Modelo VS1, Serial # 551 con cámara Sony SX90 y bomba C70 con una jeringa de 1 mL (Fluid Imaging Technologies)
Software FlowCAM:	Versión de firmware DSP: 54; versión 3.0.3
Celda de flujo:	Campo de visión (FOV FC80) con una profundidad de 80 $\mu\text{m}$ y un ancho de 700 $\mu\text{m}$ (Tecnologías de imágenes de fluidos)
Objetivo:	10X

### Configuración de contexto (Método y parámetros de configuración)

Método;	Manual Prime con muestra (espacio de aire)
Análisis de muestras;	Se analizó un volumen de 0.200 mL con 0.170 mL
Velocidad de flujo:	0.100 ml/min
Velocidad de imagen automática:	22 cuadros por segundo
Eficiencia:	38.7%
Tiempo de ejecución:	1.7 minutos
Distancia al más cercano	
Vecino:	0 micras
Agujero cerrado:	5 iteraciones
Imágenes:	Relleno de la frontera de la imagen del collage de 5
Segmentación de partículas:	Umbral oscuro 15.00, Umbral luminoso 15.00
Región aceptable:	izquierda 15, derecha 1255, parte superior 0, parte inferior 959
Cámara:	Obturador 8
Ganancia	57
Velocidad de imagen automática:	22 cuadros por segundo
Retardo del flash de la cámara:	100 microsegundos
Duración del flash:	18.5 microsegundos
Diámetro (ESD):	Mín. 2.00, Máx. 1000.00 micras

- 5 Antes de la ejecución de las muestras, se instalaron la celda de flujo y el objetivo y se realizaron la optimización del campo de visión y el enfoque. La calificación del sistema incluyó blancos de agua de análisis y estándar de tamaño de partícula en múltiples réplicas. Antes de analizar las muestras, se llevó a cabo un procedimiento de limpieza para garantizar que los recuentos de partículas estuvieran en niveles aceptables, por lo general, por debajo de 1000 partículas/mL entre muestras o menos del 5% de las partículas de muestra/mL entre muestras duplicadas. El
- 10 procedimiento de limpieza de rutina usó agua (Millipore Direct-Q tipo 1, filtrada de 0.22  $\mu\text{m}$ , 18.2 M $\Omega$ ) entre los agentes de limpieza y como descarga final antes de determinar los niveles de recuento. Una vez que el recuento de partículas alcanzó un nivel aceptable de partículas por mL, la muestra se pipeteó cuidadosamente en la punta de la muestra y se cargó en el flujo antes de iniciar el análisis de la muestra.
- 15 La calidad de la ejecución se determinó durante e inmediatamente después de cada ejecución usando una serie de herramientas de diagnóstico en VisualSpreadSheet, incluida la gráfica de captura x-y (para visualizar la dinámica del patrón de flujo), la proporción del aspecto con la gráfica de tamaño de diámetro (identificar las partículas pegadas), revisión de imágenes durante el análisis de la imagen al finalizar la ejecución usando diversas características de partículas (por ejemplo, tamaño, circularidad, longitud, proporción de aspecto),

El tamaño de partícula individual se determinó con la técnica de medición de software de Fluid imaging Technologies conocida como diámetro esférico equivalente (ESD). ESD es la medida de feret media de la partícula basada en 36 mediciones de muestra (realizadas cada 5 °). Una medida de feret es la distancia perpendicular entre las tangentes paralelas que tocan los lados opuestos de la partícula.

- 5 Las siguientes tablas de datos describen el comportamiento de la formulación 3:5 durante tres meses de estrés térmico a temperaturas variables.

(Nota: En las tablas VIII a XIII, el número entre paréntesis (por ejemplo, 3:6) se refiere a las formulaciones que se están probando. La designación "C" es una muestra de control en la que se preparan 50 mg/ml de etanercept según el ejemplo 4 estaba presente en una formulación que consistía en solución reguladora de fosfato 25 mM, sacarosa al 1%, cloruro sódico 100 mM y clorhidrato de arginina 25 mM.)

10

Tabla VIII

Contenido del monómero de datos de SEC de estabilidad de uno, dos y tres meses (Formulación 3:6 y 4:2 y Comparador)					
Duración de almacenamiento	Contenido de monómeros previo al almacenamiento y al estrés térmico	Contenido de monómeros a Temp. de almacenamiento de -80°C	Contenido de monómeros a Temp. de almacenamiento de 5°C	Contenido de monómeros a Temp. de almacenamiento de 25°C	Contenido de monómeros a Temp. de almacenamiento de 40°C
Un Mes <sup>1</sup>	99.45 (3:6)	99.43 (3:6)	99.20 (3:6)	96.18 (3:6)	86.08 (3:6)
	99.33 (4:2)	99.16 (4:2)	99.21 (4:2)	95.87 (4:2)	79.32 (4:2)
	99.45 (C)	99.38 (C)	99.37 (C)	96,54 (C)	87.83 (C)
Un Mes <sup>2</sup>	94.89 (3:6)	--	95.89 (3:6)	93.55(3:6)	80.83(3:6)
	93.57 (4:2)		95.63 (4:2)	93.55(4:2)	72.26 (4:2)
	95.52 (C)		95.01 (C)	94.30 (C)	84.69 (C)
Dos Meses <sup>2</sup>	94.89 (3:6)	--	95.05 (3:6)	92.82 (3:6)	72.15 (3:6)
	93.57 (4:2)		95.66 (4:2)	91.84 (4:2)	46.23 (4:2)
	95.52 (C)		95.89 (C)	93.60 (C)	68.88 (C)
Un Mes <sup>3</sup>	95.43 (3:6)	--	94,49 (3:6)	93.15 (3:6)	81.46 (3:6)
	93.95 (4:2)		94.13 (4:2)	92.23 (4:2)	73.23 (4:2)
	95.08 (C)		94.04 (C)	92.64 (C)	83.96 (C)
Dos Meses <sup>3</sup>	95.43 (3:6)		93.38 (3:6)	91.44 (3:6)	71.92(3:6)
	93,95 (4:2)		93.47(4:2)	90.90 (4:2)	46.27(4.:2)
	95.08 (C)		94,34 (C)	92.22 (C)	68.34 (C)
Tres Meses <sup>3</sup>	95.43 (3:6)		93,99 (3:6)	91.16 (3:6)	56.09 (3:6)
	93,95 (4:2)		94.07 (4:2)	90.33 (4:2)	9.77 (4:2)
	95.08 (C)		94.75 (C)	91.79 (C)	47.46 (C)

<sup>1</sup> Método SEC 1; <sup>2</sup> Método SEC 2. <sup>3</sup> Método SEC 3

ES 2 734 070 T3

Tabla IX

Fragmento 3-datos de SEC de estabilidad de uno, dos y tres meses (Formulación 3:6 y 4:2 y comparador)				
Duración de almacenamiento	Contenido del fragmento 3 antes del almacenamiento/estrés térmico	Contenido del fragmento 3 a Temp. de almacenamiento de 5°C	Contenido del fragmento 3 a Temp. de almacenamiento de 25°C	Contenido del fragmento 3 a Temp. de almacenamiento de 40°C
Un Mes <sup>2</sup>	3.89 (3:6) 4-16 (4:2) 3.27 (C)	2.81(3:6) 2.93(4:2) 3.75(C)	4.53 (3:6) 4.20 (4:2) 4.12 (C)	8.28 (3:6) 8.34 (4:2) 7.28 (C)
Dos Meses <sup>2</sup>	3.89 (3:6) 4.16.(4:2) 3.27 (C)	3.56 (3:6) 2.94 (4:2) 3,00 (C)	4.60 (3:6) 4.94 (4:2) 4.16 (C)	10.48 (3:6) 9.16 (4:2) 10.76 (C)
Un Mes <sup>3</sup>	3.35 (3:6) 4.36 (4:2) 3.68 (C)	4.00 (3:6) 4.11 (4:2) 4.57 (C)	4.67 (3:6) 5.30 (4:2) 5.82 (C)	---
Dos Meses <sup>3</sup>	3.35 (3:6) 4.36 (4:2) 3.68 (C)	4.93 (3:6) 4.65 (4:2) 4.22 (C)	5.75 (3:6) 5.84 (4:2) 6.12 (C)	---
Tres Meses <sup>3</sup>	3.35 (3:6) 4.36 (4:2) 3.68 (C)	4.45 (3:6) 4.21 (4:2) 3.84 (C)	5.82 (3:6) 5.40 (4:2) 5.56 (C)	---

<sup>2</sup> Método SEC 2. <sup>3</sup> Método SEC 3

Tabla X

"Agregados" datos de SEC de estabilidad de dos meses (Formulación 3:6 y 4:2 y comparador)			
Duración de almacenamiento	Contenido de agregados a Temp. de almacenamiento de 5°C	Contenido de agregados a Temp. de almacenamiento de 25°C	Contenido de agregados a Temp. de almacenamiento de 40°C
Un Mes <sup>2</sup>	0 (3:6) 0 (4:2) 0 (C)	0 (3:6) 0 (4:2) 0 (C)	2.49 (3:6) 10.43 (4:2) 1.28 (C)
Dos Meses <sup>2</sup>	0 (3:6) 0 (4:2) 0 (C)	0 (3:6) 0 (4:2) 0 (C)	6.14 (3:6) 40.35 (4:2) 8.11 (C)

<sup>2</sup> Método SEC 2.

Tabla XI

Pico 1 HIC almacenamiento de uno, dos y tres meses (Formulación 3:6 y 4:2 y comparador)				
Duración de almacenamiento	Contenido del Pico 1 antes del almacenamiento/estrés térmico	Contenido del Pico 1 a temperatura de almacenamiento de 5°C	Contenido del Pico 1 a temperatura de almacenamiento de 25°C	Contenido del Pico 1 a temperatura de almacenamiento de 40°C
Un Mes	2.16 (3:6) 1.85 (4:2) 1.85 (C)	1.58 (3:6) 2,02 (4:2) 1.71 (C)	2.06 (3:6) 2.28 (4:2) 1.70 (C)	5.62 (3:6) 5.45 (4:2) 5.29 (C)
Dos Meses	2.16 (3:6) 1.85 (4:2)	1.69 (3:6) 1.41 (4:2)	2.29 (3:6) 2.70 (4:2)	8.32 (3:6) 7.90 (4:2)

ES 2 734 070 T3

	1.85 (C)	1.78 (C)	2.71 (C)	8.17 (C)
Tres Meses	2.16 (3:6) 1.85 (4:2) 1.85 (C)	1.24 (3:6) 1.02 (4:2) 1.42 (C)	3.07 (3:6) 3.10 (4:2) 2.44 (C)	7.78 (3:6) 3.88 (4:2) 8.05 (C)

Tabla XII

Pico 2 HICV almacenamiento de uno, dos y tres meses (Formulación 3:6 y 4:2 y comparador)				
Duración de almacenamiento	Contenido pico 2 antes del almacenamiento/estrés térmico	Contenido pico 2 a temperatura de almacenamiento de 5°C	Contenido pico 2 a temperatura de almacenamiento de 25°C	Contenido pico 2 a temperatura de almacenamiento de 40°C
Un Mes	97.84 (3:6)	98.42 (3:6)	97.94 (3:6)	85.35 (3:6)
	98.15 (4:2)	97.98 (4:2)	97.72 (4:2)	75.34 (4:2)
	98.15 (C)	98.29 (C)	98.30 (C)	88.39 (C)
Dos Meses	97.84 (3:6)	98.31 (3:6)	97.71 (3:6)	79.03 (3:6)
	98.15 (4:2)	98.59 (4:2)	97.30 (4:2)	50.41 (4:2)
	98.15 (C)	98.22 (C)	97.29 (C)	73.93 (C)
Tres Meses	97.84 (3:6)	98.58 (3:6)	96.93 (3:6)	64.57 (3:6)
	98.15 (4:2)	98.76 (4:2)	96.90 (4:2)	11.64 (4:2)
	98.15 (C)	98.58 (C)	97,56 (C)	54.28 (C)

Tabla XIII

Pico 3 HIC almacenamiento de uno, dos y tres meses (Formulación 3:6 y 4:2 y comparador)				
Duración de almacenamiento	Contenido pico 3 antes del almacenamiento/estrés térmico	Contenido pico 3 a temperatura de almacenamiento de 5°C	Contenido pico 3 a Temp. de almacenamiento de 25°C	Contenido pico 3 a Temp. de almacenamiento de 40°C
Un Mes	0 (3:6)	0 (3:6)	0 (3:6)	9.03 (3:6)
	0 (4:2)	0 (4:2)	0 (4:2)	19.21 (4:2)
	0 (C)	0 (C)	0 (C)	6.32 (C)
Dos Meses	0 (3:6)	0 (3:6)	0 (3:6)	12.66 (3:6)
	0 (4:2)	0 (4:2)	0 (4:2)	41.70 (4:2)
	0 (C)	0 (C)	0 (C)	17.90 (C)
Tres Meses	0 (3:6)	0 (3:6)	0 (3:6)	27.64 (3:6)
	0 (4:2)	0 (4:2)	0 (4:2)	84.48 (4:2)
	0 (C)	0 (C)	0 (C)	37.34 (C)

5

10

La formulación 4:2 se evaluó para partículas subvisibles usando el sistema de formación de imágenes de flujo FlowCam. Estos instrumentos están diseñados para medir los niveles de partículas subvisibles (SVP). Estos se midieron inicialmente (Tabla XIV) y luego después de tres meses a 5 °C (Tabla XV) y 25 °C (Tabla XVI). De acuerdo con los datos de SEC e HIC mostrados anteriormente que indican bajos niveles de agregados o material de plegado incorrecto en la formulación 4.2 después de tres meses de estrés térmico, la formulación 4.2 exhibió bajos niveles de partículas subvisibles (menos de 10000 partículas por mL que tienen un tamaño superior a 5 µm por mL).

## ES 2 734 070 T3

Tabla XIV

Número inicial de partículas/mL de tamaños diferentes según se mide por FlowCam para la formulación 4.2 (antes del estrés térmico)		
	Forma. 4:2	comparador
2-5 $\mu\text{m}$	14000 $\pm$ 7200	7400 $\pm$ 8000
5-10 $\mu\text{m}$	3100 $\pm$ 1400	1900 $\pm$ 1800
10-15 $\mu\text{m}$	530 $\pm$ 100	290 $\pm$ 260
15-25 $\mu\text{m}$	180 $\pm$ 90	100 $\pm$ 80
25-40 $\mu\text{m}$	30 $\pm$ 40	50 $\pm$ 40
40-50 $\mu\text{m}$	0 $\pm$ 10	10 $\pm$ 10
> 50 $\mu\text{m}$	10 $\pm$ 10	10 $\pm$ 20
> 2 $\mu\text{m}$	18000 $\pm$ 8800	9700 $\pm$ 11000
> 5 $\mu\text{m}$	3900 $\pm$ 1600	2300 $\pm$ 2200

Tabla XV

Número de partículas/mL de tamaños diferentes según se mide por FlowCam para la formulación 4.2 almacenada a 5°C durante tres meses		
	Formulación 4:2	comparador
2-5 $\mu\text{m}$	24000 $\pm$ 22000	7900 $\pm$ 4200
5-10 $\mu\text{m}$	5800 $\pm$ 4700	1600 $\pm$ 700
10-15 $\mu\text{m}$	760 $\pm$ 320	150 $\pm$ 30
15-25 $\mu\text{m}$	120 $\pm$ 100	40 $\pm$ 30
25-40 $\mu\text{m}$	60 $\pm$ 20	10 $\pm$ 10
40-50 $\mu\text{m}$	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
> 50 $\mu\text{m}$	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
> 2 $\mu\text{m}$	30000 $\pm$ 27000	9600 $\pm$ 4900
> 5 $\mu\text{m}$	6700 $\pm$ 5100	1800 $\pm$ 700

Tabla XVI

Número de partículas/mL de tamaños diferentes según se mide por FlowCam para la formulación 4.2 almacenada a 25°C durante tres meses		
	Formulación 4:2	comparador
2-5 $\mu\text{m}$	2000 $\pm$ 900	15000 $\pm$ 10000
5-10 $\mu\text{m}$	700 $\pm$ 280	3200 $\pm$ 2000
10-15 $\mu\text{m}$	100 $\pm$ 50	310 $\pm$ 190
15-25 $\mu\text{m}$	20 $\pm$ 20	170 $\pm$ 140
25-40 $\mu\text{m}$	10 $\pm$ 10	50 $\pm$ 40
40-50 $\mu\text{m}$	0 $\pm$ 0	10 $\pm$ 10

## ES 2 734 070 T3

$> 50 \mu\text{m}$	$0 \pm 0$	$10 \pm 10$
$> 2 \mu\text{m}$	$2800 \pm 1100$	$19000 \pm 13000$
$> 5 \mu\text{m}$	$820 \pm 280$	$3800 \pm 2300$

Los datos presentados en las tablas VIII a XVI anteriores demuestran que una formulación estabilizada de iones metálicos según la presente invención es capaz de lograr una estabilidad de almacenamiento comparable o mejor que la de una formulación de comparador que comprende arginina como estabilizante.

5

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica acuosa que no contiene arginina que comprende etanercept y un estabilizante para inhibir la inestabilidad, la agregación, el plegado incorrecto y/o la fragmentación del etanercept, en la que el estabilizante comprende de 2 a 10 mM de magnesio.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además uno o más componentes adicionales seleccionados de: una solución reguladora; un modificador de la tonicidad, y un excipiente.
3. La composición de etanercept estabilizada de la reivindicación 2, en la que la composición provoca una estabilidad de almacenamiento a largo plazo  
caracterizada por:
- 10 análisis de SEC en T<sub>2</sub> de: contenido de monómero superior al 90%; contenido de agregados de menos de 3% en peso; y el contenido del fragmento 3 es menos del 5% en peso.
4. La composición de etanercept estabilizada de la reivindicación 2, en la que el estabilizante es cloruro de magnesio y la formulación comprende cloruro de magnesio de 2 mM a 10 mM; opcionalmente hasta 6% en peso de sacarosa; NaCl de 25 a 150 mM; fosfato de sodio de 1 a 30 mM; en la que la composición tiene un pH de 6.0 a 6.6.
- 15 5. La composición estabilizada con cloruro de magnesio de la reivindicación 4 que provoca una estabilidad de almacenamiento a largo plazo caracterizada por:  
análisis de SEC en T<sub>2</sub> de más del 90% en peso del contenido de monómero; menos del 3% en peso de contenido de agregados; y menos del 5% en peso del fragmento 3; y  
análisis de HIC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub>, en el que la cantidad de la composición representada por el pico 1 del cromatograma de HIC es menos del 3% en peso; la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es más del 80% en peso; y la cantidad de la composición representada por el pico 3 del cromatograma de HIC es menos del 20% en peso.
- 20 6. La composición estabilizada con cloruro de magnesio de la reivindicación 5, que provoca una estabilidad de almacenamiento a largo plazo caracterizada por: un análisis HIC en M<sub>3</sub> o T<sub>2</sub> o T<sub>4</sub>, en la que la cantidad de la composición representada por el pico 2 del cromatograma de HIC es mayor que o igual a 95 % en peso; y en la que, si el pico 3 está presente en el cromatograma de HIC, la cantidad de la composición representada por el pico 3 es menos de o igual al 3% en peso.
- 25 7. La composición estabilizada con cloruro de magnesio de la reivindicación 5, que tiene, en promedio, no más de 10,000 partículas subvisibles por mL que tienen un tamaño superior a 5 µm.
- 30 8. La composición estabilizada con cloruro de magnesio de la reivindicación 5, que comprende:  
50 mg/ml de etanercept; cloruro de magnesio 10 mM; fosfato de sodio 10-30 mM; cloruro de sodio menos de 150 mM; y menos de 3% en peso de sacarosa; y teniendo un pH de 6.3 a 6.5; o  
50 mg/ml de etanercept; cloruro de magnesio 5 mM; fosfato de sodio menos de 30 mM; cloruro de sodio menos de 100 mM; y menos de 4% en peso de sacarosa; y teniendo un pH de 6.3 a 6.5; o
- 35 50 mg/ml de etanercept; cloruro de magnesio 4 mM; fosfato de sodio menos de 30 mM; cloruro de sodio 100 mM; y 2.5% en peso de sacarosa; y teniendo un pH de 6.3 a 6.5; o  
50 mg/ml de etanercept; cloruro de magnesio 10 mM; fosfato de sodio de menos de 30 mM; cloruro de sodio menos de 100 mM; y menos de 5% en peso de sacarosa; y teniendo un pH de 6.3 a 6.5.
- 40 9. Una composición de etanercept acuosa estabilizada que no contiene arginina que comprende magnesio de 2 a 10 mM en la que la composición en T<sub>2</sub> provoca una estabilidad de almacenamiento a largo plazo que cumple los siguientes criterios:  
(A) un cromatograma de HIC en el que (i) el pico 3 está ausente, y (ii) el pico 2 representa más del 95% en peso de la composición;
- 45 (B) un cromatograma de SEC en el que (i) ningún pico corresponde a (el) (los) agregado (s); y (ii) el contenido de monómero representa al menos el 95% en peso de la composición.
10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en terapia.
11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en el tratamiento de artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Wegener (granulomatosis), enfermedad de Crohn,

enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), hepatitis C, endometriosis, asma, caquexia, psoriasis o dermatitis atópica.

- 5 12. Uso de magnesio de 2 a 10 mM para estabilizar una composición farmacéutica acuosa que comprende etanercept para permitir el almacenamiento estable a largo plazo de dicha composición, en la que la composición está libre de arginina.