

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 931**

51 Int. Cl.:

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2012 PCT/EP2012/057119**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12143418**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2012 E 12715107 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2699265**

54 Título: **Formulaciones líquidas farmacéuticas estables de la proteína de fusión TNFR:Fc**

30 Prioridad:

20.04.2011 EP 11163171

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

12.05.2020

73 Titular/es:

**SANDOZ AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DEUTEL, BRITTA;
LAUBER, THOMAS y
FUERTINGER, SABINE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 759 931 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 líquidas farmacéuticas estables de la proteína de fusión TNFR:Fc

5 La presente invención se refiere a formulaciones líquidas farmacéuticas estables de la proteína de fusión TNFR:Fc que comprenden diferentes sistemas de tampón y estabilizadores tal como se definen en las reivindicaciones. En particular, pudo demostrarse que la estabilidad física de TNFR:Fc se mejora significativamente usando un sistema de tampón citrato y lisina y/o prolina como estabilizador, tal como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

10 Comúnmente, los anticuerpos comerciales se formulan en tampón fosfato. Además, TNFR:Fc se tampona comúnmente en fosfato de sodio (documentos EP1478394, WO 03/072060 A2). Actualmente, por ejemplo, la proteína de TNFR:Fc etanercept se comercializa con el nombre comercial Enbrel® teniendo una composición tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1 Composición de Etanercept (Enbrel®)

	[mg/ml]	[mM]
Etanercept	50	0,3
Sacarosa	10	29
Cloruro de sodio	5,8	100
Clorhidrato de L-arginina	5,3	25
Fosfato de sodio monobásico	2,6	19
Fosfato de sodio dibásico	0,9	6
WFI	añadir 0,5/1,0 ml	
pH	6,3 ± 0,2	

15 La agregación de productos de anticuerpos puede controlarse mediante la adición de pequeñas moléculas anfífilas. Por tanto, L-arginina es el aminoácido de elección para suprimir las interacciones proteicas en formulaciones comerciales (Baynes *et al* (2005) 44 (12): 4919-25; documento EP1478394). Al ser un aditivo polar, impide la agregación de productos intermedios de plegamiento de proteínas.

Como la L-arginina, la L-lisina es capaz de impedir significativamente la agregación de lisozima inducida por calor y dilución (Shiraki *et al* (2002) J Biochem, 132 (4): 591-5).

20 Se ha establecido L-prolina como un estabilizador en preparaciones líquidas de inmunoglobulina como Sandoglobulin® o Privigen®. Como aminoácido hidrófobo, se supone que interfiere con las interacciones hidrófobas proteína-proteína y, por tanto, protege a la IgG de la desnaturalización y la agregación. Además, la L-prolina presenta un buen registro de seguridad cuando se administra a pacientes con inmunodeficiencias primarias y se encontró que representa un aminoácido de baja toxicidad en estudios con animales (Bolli *et al*, (2001) Biologicals, 38 (1): 150-7).

25 Estudios recientes contemplan que el tampón citrato es beneficioso en formulaciones de anticuerpos monoclonales, ya que minimiza eficazmente las degradaciones como desamidaciones de asparagina (Zheng y Janis, (2006) Int J Pharm, 308 (1-2): 46-51). Otra ventaja del tampón citrato es su capacidad para estabilizar el pH durante la congelación, mientras que el sistema de tampón fosfato establecido muestra el mayor cambio en el pH cuando se disminuyen las temperaturas desde +25 hasta -30°C (Kolhe *et al*, (2010) Biotechnol Prog, 26 (3): 727-33).

30 El documento WO 2007/092772 A2 da a conocer composiciones para proteínas que comprenden regiones Fc variantes, que no se producen de manera natural. El documento WO 2005/012353 A1 da a conocer un método para producir cristales proteicos de etanercept.

35 Las proteínas de fusión pueden generar una variedad de productos degradados y agregados que, posteriormente, pueden conducir a una actividad reducida e incluso a efectos adversos como inmunogenicidad. Por tanto, todavía existe la necesidad de una formulación líquida estable de la proteína de fusión TNFR:Fc.

Una formulación de este tipo deberá cumplir una variedad de tareas. Tiene que ser fisiológicamente aceptable y proporciona preferiblemente un entorno que garantice la estabilidad del fármaco biofarmacéutico en una concentración terapéuticamente eficaz. Además, la formulación debe permitir una semivida satisfactoria del fármaco.

40 Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar formulaciones farmacéuticas para TNFR:Fc que puedan usarse como alternativa a las formulaciones conocidas de la técnica anterior. Otro objeto de la presente invención es proporcionar formulaciones farmacéuticas para TNFR:Fc que sean ventajosas en comparación con formulaciones conocidas de la técnica anterior. Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar formulaciones

farmacéuticas para TNFR:Fc que provoquen menos agregación de fármacos que las formulaciones conocidas de la técnica anterior.

5 La presente invención demuestra que, al reemplazar, por ejemplo, el tampón fosfato usado comúnmente por un sistema de tampón citrato y el estabilizador arginina por lisina, la estabilidad física de TNFR:Fc puede mejorarse significativamente. El tampón ácido cítrico y el estabilizador lisina propuestos protegen TNFR:Fc frente a la degradación inducida por estrés mecánico y de temperatura (25 y 40°C) y, en el almacenamiento previsto a 2-8°C, la degradación de la proteína fue significativamente menor en las formulaciones propuestas en comparación con las formulaciones tamponadas con fosfato comúnmente usadas. Por tanto, los parámetros de calidad relacionados con la estabilidad física del producto pudieron mejorarse. La estabilidad física aumentada del fármaco permite una vida útil de almacenamiento prolongada en comparación con las formulaciones de productos comunes y garantiza la seguridad del producto.

Sumario de la invención

15 En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende TNFR:Fc de 0,15 mM a 0,5 mM, un tampón citrato a una concentración de desde 25 mM hasta 120 mM a un pH de desde 6,2 hasta 6,4, y un aminoácido a una concentración de desde 15 mM hasta 100 mM seleccionado del grupo que consiste en lisina y prolina y sus sales farmacéuticas aceptables; en la que TNFR:Fc es etanercept.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende una composición según el primer aspecto e instrucciones para el uso de dicha composición.

20 En todavía un tercer aspecto, la invención se refiere a un método de producción de una composición farmacéutica según el primer aspecto, que comprende combinar TNFR:Fc, un tampón citrato y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina y prolina y sus sales farmacéuticas aceptables.

25 En un aspecto final, la invención también se refiere a una composición según el primer aspecto para su uso en un tratamiento médico, en particular, en un tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad autoinmunitaria, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, enfermedad de Wegener (granulomatosis), enfermedad de Crohn (o enfermedad inflamatoria del intestino), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hepatitis C, endometriosis, asma, caquexia, dermatitis atópica, Alzheimer y cáncer.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

30 La formación de productos de degradación durante el almacenamiento de TNFR:Fc parece ser el atributo más crítico de la molécula. TNFR:Fc en formulaciones de citrato presenta, en general, un potencial de degradación inferior, lo que podría deberse a la mayor carga neta de citrato de sodio en comparación con fosfato de sodio y, por tanto, la posible interacción con la molécula de TNFR:Fc cargada.

35 Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende TNFR:Fc de 0,15 mM a 0,5 mM, un tampón citrato a una concentración de desde 25 mM hasta 120 mM a un pH de desde 6,2 hasta 6,4, y un aminoácido a una concentración de desde 15 mM hasta 100 mM seleccionado del grupo que consiste en lisina y prolina y sus sales farmacéuticas aceptables; en la que TNFR:Fc es etanercept.

40 El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) es un miembro de un grupo de citocinas que estimulan la reacción de fase aguda y, por tanto, es una citocina implicada en inflamación sistémica. TNF-alfa es capaz de inducir inflamación, inducir muerte celular apoptótica e inhibir la tumorigénesis y replicación viral. La desregulación de la producción de TNF-alfa se ha implicado en una variedad de enfermedades humanas como enfermedad autoinmunitaria, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, enfermedad de Wegener (granulomatosis), enfermedad de Crohn o enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hepatitis C, endometriosis, asma, caquexia, dermatitis atópica, Alzheimer, así como cáncer.

45 Sus moléculas receptoras incluyen TNFR1 (receptor de TNF tipo 1; CD120a; p55/60; para ser humano: RefSeq (ARNm): NM_001065, RefSeq (proteína): NP_001056 (SEQ ID NO:1)) y TNFR2 (receptor de TNF tipo 2; CD120b; p75/80; para ser humano: RefSeq (ARNm): NM_001066, RefSeq (proteína): NP_001057 (SEQ ID NO:2)). TNF-R1 se expresa en la mayoría de los tejidos y puede activarse completamente mediante las formas de TNF tanto trimérica soluble como unida a la membrana, mientras que TNF-R2 se encuentra solo en células del sistema inmunitario y responde a la forma unida a la membrana del homotrímero de TNF. Tras el contacto con TNF-alfa, los receptores de TNF forman trímeros y, de ese modo, inician la señalización celular intracelular.

50 Por consiguiente, pueden usarse moléculas de TNFR solubles o fragmentos de las mismas, que son capaces de unirse a TNF-alfa, como inhibidor competitivo para TNF-alfa. La presente invención se refiere a tales moléculas de TNFR solubles fusionadas a una porción Fc de una inmunoglobulina humana (TNFR:Fc).

En el contexto de la presente divulgación, la parte de TNFR de TNFR:Fc se refiere a cualquier polipéptido de TNFR que tenga al menos el 90 %, preferiblemente al menos el 91 %, tal como al menos el 92 % o al menos el 93 %, más preferiblemente al menos el 94 %, tal como al menos el 95 % o al menos el 96 %, incluso más preferiblemente al menos el 97 %, tal como al menos el 98 % o al menos el 99 %, y lo más preferiblemente el 100 % de identidad con una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 150-250, preferiblemente al menos 175-245 de TNFR1 o TNFR2, preferiblemente TNFR2, más preferiblemente 200-240 y lo más preferiblemente 225-235 aminoácidos de la parte extracelular de TNFR2, y que todavía se une a TNF-alfa, tal como se determina mediante ELISA o cualquier otro ensayo conveniente. Más preferiblemente, dicho TNFR es capaz de unirse a TNF-alfa y linfotoxina alfa (LT-alfa), tal como se determina mediante ELISA o cualquier otro ensayo conveniente. Tales ensayos los conoce bien el experto.

Generalmente, un polipéptido tiene "al menos el x % de identidad" a lo largo de una longitud de aminoácidos definida con otro polipéptido si la secuencia en cuestión se alinea con la mejor secuencia coincidente de la secuencia de aminoácidos y la identidad de secuencia entre esas secuencias alienadas es al menos el x %. Una alineación de este tipo puede realizarse usando, por ejemplo, programas informáticos de homología públicamente disponibles tales como el programa "BLAST", tal como "blastp" proporcionado en la página del NCBI en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>, usando los parámetros por defecto proporcionados en la misma. En la técnica se conocen métodos adicionales de cálculo de los porcentajes de identidad de secuencia de conjuntos de polipéptidos.

La región Fc (región de fragmento cristalizante) se refiere a la región de cola de un anticuerpo, en el caso de IgG compuesta por el segundo y tercer dominios constantes de las dos cadenas pesadas del anticuerpo. En determinadas realizaciones, el polipéptido de Fc comprende la región constante de una cadena pesada de clase IgG o un fragmento y/o variante de la misma y en otras realizaciones puede usarse la región constante de otros isotipos de inmunoglobulina para generar tales fusiones TNFR:Fc. Por ejemplo, podría usarse un polipéptido de TNFR:Fc que comprende la región constante de una cadena pesada de clase IgM o un fragmento y/o variante de la misma. Preferiblemente, el fragmento Fc se deriva de IgG, más preferiblemente de IgG1, incluso más preferiblemente de IgG1 humana. La región constante de cadenas pesadas de inmunoglobulina, con un ejemplo específico de un dominio constante de cadena pesada de clase IgG1 humana proporcionada por SEQ ID NO: 3, comprende un dominio CH1 (aminoácidos 1 a 98 de SEQ ID NO:3), una región bisagra (aminoácidos 99 a 110 de SEQ ID NO:3), un dominio CH2 (aminoácidos 111 a 223 de SEQ ID NO:3) y un dominio CH3 (aminoácidos 224 a 330 de SEQ ID NO:3). Tal como se usa en el presente documento, un dominio Fc puede contener una o todos los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 de cadena pesada descritos anteriormente, o fragmentos o variantes de los mismos. Determinadas realizaciones de la invención incluyen TNFR:Fc que comprende todo o una porción del dominio extracelular de TNFR1 (SEQ ID NO: 1) o TNFR2 (SEQ ID NO:2) fusionado a toda o una porción de SEQ ID NO:3, opcionalmente con un polipéptido ligador entre la porción de TNFR y la porción de Fc de la TNFR:Fc. Por ejemplo, CH1, CH2 y la región bisagra entera pueden estar presentes en la molécula. En casos adicionales, una región constante de cadena pesada que comprende al menos una porción de CH1 es la porción de Fc de una TNFR:Fc. Determinados casos pueden incluir también, por ejemplo, toda la región bisagra o la mitad C-terminal de la región bisagra para proporcionar un puente disulfuro entre cadenas pesadas. Por ejemplo, CH1 puede estar presente junto con los primeros siete aminoácidos de la bisagra (aminoácidos 99 a 105 de SEQ ID NO: 3). En determinados casos, el polipéptido de TNFR está covalentemente unido, opcionalmente a través de un ligador polipeptídico, al extremo N-terminal de al menos una porción de una región CH1 de un dominio constante de cadena pesada para formar una TNFR:Fc.

Si se desea una TNFR:Fc dimérica, es importante incluir la porción de la región bisagra implicada en la formación de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas (por ejemplo, una porción de aminoácidos 99 a 110 de SEQ ID NO: 3 que incluye el aminoácido 109 de SEQ ID NO: 3). En casos adicionales, la TNFR:Fc puede comprender porciones del dominio CH3 que no incluyen el residuo de lisina C-terminal (aminoácido 330 de SEQ ID NO: 3), ya que se ha observado que este residuo se elimina en el procesamiento postraduccional de polipéptidos de cadena pesada de IgG. Se conocen bien en la técnica fusiones de Fc y fragmentos Fc.

En la presente invención, la TNFR:Fc es etanercept.

Etanercept es un dímero de dos moléculas de la porción extracelular del receptor de TNF-alfa p75, consistiendo cada molécula en polipéptido derivado de TNFR de 235 aminoácidos que se fusiona con una porción de Fc de 232 aminoácidos de IgG1 humana. La secuencia de aminoácidos del componente monomérico de etanercept se muestra como SEQ ID NO:4. En la forma dimérica de esta molécula, dos de estos polipéptidos de fusión (o "monómeros") se mantienen juntos mediante tres enlaces disulfuro que se forman entre las porciones de inmunoglobulina de los dos monómeros. El dímero de etanercept consiste, por tanto, en 934 aminoácidos, y tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilodaltons. En América del Norte, Amgen y Pfizer comercializan conjuntamente etanercept con el nombre comercial Enbrel® en dos formulaciones diferenciadas, una en forma de polvo, la otra como un líquido premezclado. Wyeth es el único comercializador de Enbrel® fuera de América del Norte excluyendo Japón donde Takeda Pharmaceuticals comercializa el fármaco.

La TNFR:Fc puede producirse de manera recombinante, preferiblemente usando un sistema de expresión basado en células de mamífero. Preferiblemente, dicho sistema de expresión basado en células de mamífero es al menos

uno seleccionado del grupo que consiste en líneas celulares de riñón de cría de hámster (por ejemplo, BHK21); líneas celulares de ovario de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DXB o CHO-dhfr-); líneas celulares de mieloma murino (por ejemplo, SP2/0); líneas celulares de mieloma de ratón (por ejemplo, NS0); líneas celulares de riñón embrionario humano (por ejemplo, HEK-293); líneas celulares derivadas de retina humana (por ejemplo, PER-C6) y/o líneas celulares de amniocitos (por ejemplo, CAP). Preferiblemente, están usándose sistemas de expresión basados en células de hámster. Las células BHK21 ("riñón de cría de hámster") pertenecen a una línea establecida casi diploide de células de hámster sirio, descendientes de un clon de cultivo primario de crecimiento inusualmente rápido de tejido de riñón de hámster recién nacido. Ejemplos no limitativos de líneas celulares BHK-21 que están disponibles comercialmente y pueden usarse en el contexto de la presente invención son BHK-21 (C-13); BHK21-pcDNA3.1-HC; BHK570; la línea celular Flp-In-BHK; y/o la línea celular de hámster BHK 21 (clon 13).

Las células de ovario de hámster chino (CHO) son una línea celular derivada del ovario del hámster chino. Se usan a menudo en investigación biológica y médica y se utilizan comercialmente en la producción de proteínas terapéuticas. Se introdujeron en la década de 1960 y se hicieron crecer originalmente como cultivo en monocapa. Hoy en día, las células CHO son los huéspedes de mamífero más comúnmente usados para la producción industrial de productos terapéuticos de proteínas recombinantes y se hacen crecer habitualmente en cultivo en suspensión.

Los ejemplos no limitativos de líneas celulares CHO que están disponibles comercialmente y pueden usarse en el contexto de la presente invención son células FreeStyle CHO-S; la línea celular ER-CHO; CHO 1-15 500 CHINESE HAM; CHO-DXB, CHOdhfr-, CHO DP-12 clon n.º 1934; CHO-CD36; CHO-ICAM-1; CHO-K1; Ovary; HuZP3-CHOLec3.2.8.1; xrs5; células CHO-K1/BB2; células CHO-K1/BB3; células CHO-K1/EDG8/Galfa15; células CHO-K1/M5; células CHO-K1/NK1; células CHO-K1/NK3; células CHO-K1/NMUR1; células CHO-K1/NTSR1; células CHO-K1/OX1; células CHO-K1/PAC1/Gα15; células CHO-K1/PTAFR; células CHO-K1/TRH1; células CHO-K1/V1B; la línea celular 5HT1A Galfa-15-NFAT-BLA CHO-K1; la línea celular AVPR2 CRE-BLA CHO-K1; células CHO-S adaptadas a SFM; células DG44; la línea celular Flp-In-CHO; la línea celular GeneSwitch-CHO; la línea celular NFAT-bla CHO-K1; la línea celular T-REX-CHO; la línea celular estable GenoStat CHO K-1; el kit de línea celular estable GenoStat CHO K-1; la línea celular CHO-K1 de hámster, la línea celular CHO-PEPT1, la línea celular CHO SSF3 y/o CHO-HPT1. En una realización particularmente preferida, el sistema de expresión basado en células de hámster es una línea celular CHO-dhfr-.

La composición farmacéutica comprende TNFR:Fc a una concentración de desde 0,15 mM hasta 0,5 mM, tal como 0,4 mM o 0,45 mM, más preferiblemente a una concentración de desde 0,25 mM hasta 0,35 mM, tal como aproximadamente 0,3 mM.

El tampón citrato puede ser cualquier tampón citrato adecuado. Por ejemplo, el tampón citrato puede comprender o consistir en citrato de sodio, citrato de potasio, ácido cítrico, o mezclas de los mismos. El tampón citrato parece tener la mayor influencia sobre la estabilidad de la formulación. La estabilidad aumentada de una formulación en tampón citrato 50 mM en comparación con una formulación en tampón citrato 25 mM se muestra en los ejemplos. Un aumento de hasta al menos 120 mM podría conducir a efectos incluso aumentados. Un mínimo de tampón citrato 25 mM parece ser obligatorio para la estabilización. Por consiguiente, la composición farmacéutica comprende el tampón citrato a una concentración de desde 25 mM hasta 120 mM, tal como desde 30 mM hasta 115 mM, preferiblemente a una concentración de desde 40 mM hasta 110 mM, tal como desde 45 mM hasta 105 mM, más preferiblemente a una concentración de desde 50 mM hasta 100 mM, tal como a una concentración de 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, 80 mM, 85 mM, 90 mM o 95 mM. En otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende el tampón citrato a una concentración tal como se indica en las composiciones descritas en la sección de ejemplos.

El pH es de desde 6,2 hasta 6,4, tal como aproximadamente 6,3.

La composición farmacéutica comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina y prolina y sus sales farmacéuticas aceptables, tales como clorhidratos. El aminoácido puede estar en configuración D, L o DL, preferiblemente en configuración L.

A la adición de aproximadamente 25 mM el efecto adicional de la combinación con el aminoácido básico lisina es sorprendente. Se cree que la adición de lisina hasta 100 mM tiene un efecto adicional. Por tanto, la composición farmacéutica comprende el aminoácido a una concentración de desde 15 mM hasta 100 mM, preferiblemente a una concentración de desde 20 mM hasta 90 mM, más preferiblemente a una concentración de desde 25 mM hasta 75 mM. En otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende el aminoácido a una concentración tal como se indica en las composiciones descritas en la sección de ejemplos. En una realización particularmente preferida, el aminoácido es lisina, o sus sales farmacéuticas aceptables.

Además, la composición farmacéutica puede comprender, además, al menos un modificador de la tonicidad. Tal como se usa en el presente documento, el término "modificador de la tonicidad" pretende describir una molécula distinta de citrato, lisina o prolina que contribuye a la osmolalidad de una disolución. Preferiblemente, la osmolalidad de una composición farmacéutica se regula con el fin de estabilizar el principio activo y con el fin de minimizar las molestias para el paciente tras la administración. Generalmente, se prefiere que una composición farmacéutica sea isotónica con el suero teniendo la misma o similar osmolalidad, es decir, una osmolalidad de desde

aproximadamente 180 hasta 480 mosmol/kg. Preferiblemente, el al menos un modificador de la tonicidad se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio, cisteína, histidina, glicina, cloruro de potasio, sacarosa, glucosa y manitol, más preferiblemente el modificador de la tonicidad es cloruro de sodio y/o sacarosa. La composición farmacéutica puede comprender el al menos un modificador de la tonicidad a una concentración total de desde 5 mM hasta 200 mM, tal como desde 10 mM hasta 190 mM, desde 15 mM hasta 180 mM, desde 20 mM hasta 170 mM, desde 25 mM hasta 160 mM, desde 30 mM hasta 150 mM, desde 35 mM hasta 140 mM, desde 40 mM hasta 130 mM o desde 45 mM hasta 120 mM, por ejemplo, 110 mM, pero preferiblemente a una concentración de desde 50 mM hasta 100 mM. En otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende el/los modificador(es) de la tonicidad a una concentración tal como se indica en las composiciones descritas en la sección de ejemplos.

Además, la composición farmacéutica puede comprender al menos un excipiente. El término "excipiente" tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia farmacológicamente inactiva usada como portador para el agente activo en una composición farmacéutica. En algunos casos, una sustancia "activa" puede no administrarse y absorberse fácilmente por el cuerpo humano. En tales casos, la sustancia en cuestión puede mezclarse con un excipiente o disolverse en una disolución de excipiente. Los excipientes se usan también algunas veces para dar volumen a formulaciones que contienen principios activos muy potentes, con el fin de facilitar una dosificación conveniente y precisa. Además de su uso en la cantidad de dosificación individual, pueden usarse excipientes en el proceso de fabricación para optimizar la manipulación de la sustancia activa prevista. Dependiendo de la vía de administración y la forma de la composición farmacéutica, pueden usarse diferentes excipientes. Por tanto, los excipientes pueden comprender entre otros antiadherentes, aglutinantes, colorantes y conservantes tales como antioxidantes.

Por ejemplo, al menos un excipiente puede seleccionarse del grupo que consiste en lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa, albúmina sérica bovina (BSA), dextrano, poli(acetato de vinilo) (PVA), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polietilenimina (PEI), gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC), polietilenglicol (PEG), etilenglicol, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), L-serina, glutamato de sodio, alanina, glicina, sarcosina, ácido gamma-aminobutírico (GABA), monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween-20), monooleato de polioxietilensorbitano (Tween-80), dodecilsulfato de sodio (SDS), polisorbato, copolímero de polioxietileno, fosfato de potasio, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, N-óxido de trimetilamina, betaína, iones de zinc, iones de cobre, iones de calcio, iones de manganeso, iones de magnesio, CHAPS, monolaurato de sacarosa y 2-O-beta-manoglicerato. En una realización preferida, el excipiente puede elegirse de los descritos en la sección de ejemplos.

La composición farmacéutica puede comprender el al menos un excipiente a una concentración total de al menos 0,1 mM, por ejemplo, desde 0,1 mM hasta 0,7 mM, tal como a una concentración de 0,6 mM, preferiblemente a una concentración de desde 0,15 mM hasta 0,5 mM, tal como desde 0,2 mM hasta 0,4 mM, más preferiblemente a una concentración de desde 0,24 mM hasta 0,34 mM. En otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende el excipiente a una concentración tal como se indica en las composiciones descritas en la sección de ejemplos.

Preferiblemente, la composición es líquida. Sin embargo, en otra realización, la composición farmacéutica puede estar liofilizada, y puede reconstituirse, por ejemplo, mediante la adición de agua, formando una composición líquida. Por tanto, la composición farmacéutica puede comprender, además, un disolvente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, el disolvente farmacéuticamente aceptable es agua. Las concentraciones de componentes presentadas en el presente documento se refieren a una formulación líquida, así como a un liofilizado constituido o una formulación que va a liofilizarse.

Los excipientes pueden presentar un efecto protector durante la congelación de formulaciones liofilizadas, las denominadas características crioprotectoras. Además, pueden añadirse agentes quelantes de metales y tensoactivos. Algunos agentes pueden tener un papel doble, por ejemplo, algunos azúcares o alcoholes de azúcar pueden servir, por ejemplo, como excipiente, crioprotector y/o agente tonificante. La presente formulación en estado acuoso está lista para usarse, mientras que el estado liofilizado de la presente formulación puede transferirse a formulaciones líquidas mediante, por ejemplo, la adición de agua para inyección.

Composiciones particularmente preferidas comprenden o consisten en etanercept de 0,15 mM a 0,5 mM, tampón citrato de 25 mM a 120 mM, por ejemplo, citrato de sodio, lisina de 15 mM a 100 mM, por ejemplo, clorhidrato de lisina, sacarosa de 10 mM a 100 mM y cloruro de sodio de 5 mM a 200 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 50 mM, por ejemplo, citrato de sodio, lisina 25 mM, por ejemplo, clorhidrato de lisina, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 75 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

En todavía otra realización preferida, la composición farmacéutica puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 25 mM, por ejemplo, citrato de sodio, lisina 25 mM, por ejemplo, clorhidrato de lisina, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 88 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

La composición farmacéutica también puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 75 mM, por ejemplo, citrato de sodio, lisina 50 mM, por ejemplo, clorhidrato de lisina y cloruro de sodio 59 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

5 La composición farmacéutica también puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 25 mM, por ejemplo, citrato de sodio, lisina 25 mM, por ejemplo, clorhidrato de lisina, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 75 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

La composición farmacéutica también puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 25 mM, por ejemplo, citrato de sodio, lisina 50 mM, por ejemplo, clorhidrato de lisina, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 75 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

10 La composición farmacéutica también puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 50 mM, por ejemplo, citrato de sodio, lisina 25 mM, por ejemplo, clorhidrato de lisina, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 75 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

15 La composición farmacéutica también puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 50 mM, por ejemplo, citrato de sodio, lisina 50 mM, por ejemplo, clorhidrato de lisina, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 75 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

La composición farmacéutica también puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 50 mM, por ejemplo, citrato de sodio, lisina 50 mM, por ejemplo, clorhidrato de lisina, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 48 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

20 La composición farmacéutica también puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 25 mM, por ejemplo, citrato de sodio, lisina 25 mM, por ejemplo, clorhidrato de lisina, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 88 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

La composición farmacéutica también puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 25 mM, por ejemplo, citrato de sodio, prolina 25 mM, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 88 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

25 La composición farmacéutica también puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 25 mM, por ejemplo, citrato de sodio, prolina 25 mM, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 100 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

30 La composición farmacéutica también puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 50 mM, por ejemplo, citrato de sodio, lisina 50 mM, por ejemplo, clorhidrato de lisina, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 50 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

La composición farmacéutica también puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 75 mM, por ejemplo, citrato de sodio, lisina 25 mM, por ejemplo, clorhidrato de lisina, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 50 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

35 La composición farmacéutica también puede comprender o consistir en etanercept 0,3 mM, tampón citrato 65 mM, por ejemplo, citrato de sodio, lisina 25 mM, por ejemplo, clorhidrato de lisina, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 55 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.

Preferiblemente, la composición farmacéutica es una composición líquida estable. El término “estable” tal como se usa en el presente documento significa que la TNFR:Fc presenta una o más de las siguientes características:

40 (i) presenta menos del 99 % de productos de agregación (SUMA DE AP) en comparación con la misma TNFR:Fc formulada en la formulación tamponada con fosfato comúnmente usada que contiene etanercept 0,3 mM en una matriz que consiste en tampón fosfato 25 mM, arginina 25 mM y cloruro de sodio en una molaridad mayor de 75 mM o en la cantidad necesaria para ajustar la isotonicidad, más preferiblemente menos del 98,5 % de SUMA DE AP, incluso más preferiblemente menos del 98 % de SUMA DE AP, lo más preferiblemente menos del 97,5 % de SUMA DE AP, tal como se determina tras tres meses de almacenamiento a 40°C mediante SEC;

45 (ii) y/o presenta menos del 99 % de productos de degradación (SUMA DE DP) en comparación con la misma TNFR:Fc formulada en la formulación tamponada con fosfato comúnmente usada que contiene etanercept 0,3 mM en una matriz que consiste en tampón fosfato 25 mM, arginina 25 mM y cloruro de sodio en una molaridad mayor de 75 mM o en la cantidad necesaria para ajustar la isotonicidad, más preferiblemente menos del 98 % de SUMA DE DP, tal como menos del 97 % de SUMA DE DP, incluso más preferiblemente menos del 96 % de SUMA DE DP, tal como menos del 95 % de SUMA DE DP, lo más preferiblemente menos del 94 % de SUMA DE DP, tal como menos del 93 % de SUMA DE DP, tal como se determina tras tres meses de almacenamiento a 40°C mediante SEC.

Por tanto, la formulación farmacéutica según la invención puede formularse adecuadamente para almacenamiento a largo plazo. Tal como se usa en el presente documento, el término “almacenamiento a largo plazo” se referirá al almacenamiento de una composición que comprende la formulación farmacéutica durante más de 1 mes, preferiblemente durante más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o incluso 12 meses.

- 5 Tal como se ejemplifica a continuación, la estabilidad de formulaciones que contienen un sistema de tampón o bien citrato o bien fosfato en combinación con o bien lisina o bien prolina como estabilizador se evaluó durante un estudio de estabilidad de tres meses en la condición de almacenamiento prevista (2-8°C), así como acelerada (25 y 40°C). Se determinó de ese modo que las formulaciones que contenían el sistema de tampón citrato eran superiores en comparación con formulaciones que contenían el sistema de tampón fosfato con respecto a la formación de picos posteriores (tal como se determina, por ejemplo, mediante RPC), la formación de productos de degradación (tal como se determina, por ejemplo, mediante SEC) y la formación de picos de ácido (tal como se determina, por ejemplo, mediante CEX).

- 10 Los efectos descritos fueron parcialmente incluso más pronunciados, incluyendo la estabilización superior de TNFR:Fc formulada en la matriz de formulación de citrato/lisina, si las formulaciones se almacenaron en viales, presentando una mayor superficie de interacción líquido/aire. La determinación de la estabilidad de una composición líquida se ejemplifica adicionalmente en la sección de ejemplos y, en particular, en el ejemplo 3.

- 15 La composición farmacéutica según el primer aspecto puede usarse en un tratamiento médico. Las enfermedades que pueden tratarse usando la composición farmacéutica de la invención incluyen, pero no se limitan a enfermedades autoinmunitarias, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, enfermedad de Wegener (granulomatosis), enfermedad de Crohn o enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hepatitis C, endometriosis, asma, caquexia, dermatitis atópica, enfermedad de Alzheimer y cáncer. Por consiguiente, también se contempla un método de tratamiento, que comprende administrar la composición según el primer aspecto a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que padece una de las enfermedades mencionadas anteriormente.

- 20 La dosificación de la TNFR:Fc dependerá de la enfermedad, la gravedad del estado, la historia clínica del paciente y la respuesta a la terapia (previa), y la ajustará y monitorizará un médico. La composición farmacéutica puede administrarse por vía parenteral, tal como por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intracerebroespinal, por vía intraarticular, por vía intrasinovial y/o por vía intratecal mediante o bien inyección en bolo o bien infusión continua.

- 25 La dosificación de TNFR:Fc por adulto puede oscilar entre 1-500 mg/m², o entre aproximadamente 1-200 mg/m², o entre aproximadamente 1-40 mg/m² o aproximadamente 5-25 mg/m². Alternativamente, puede administrarse una dosis fija, en la que la cantidad puede oscilar entre 2-500 mg/dosis, 2-100 mg/dosis o entre aproximadamente 10-80 mg/dosis. La dosis puede administrarse más de una vez a la semana, tal como dos o más veces a la semana a un intervalo de dosis de 25-100 mg/dosis. En otra realización, una dosis aceptable para administración por inyección contiene 80-100 mg/dosis, por ejemplo, 80 mg por dosis. Las dosis pueden administrarse semanalmente, bisemanalmente o separadas por varias semanas, por ejemplo, por tres semanas.

- 30 Se contempla, además, que se obtendrá una mejora del estado del paciente mediante una dosis de hasta 100 mg de la composición farmacéutica de una a tres veces por semana a lo largo de un periodo de al menos tres semanas, aunque puede ser necesario un tratamiento durante periodos más prolongados para inducir el grado deseado de mejora. Sin embargo, para estados crónicos incurables, el régimen puede continuarse indefinidamente. Un régimen adecuado para pacientes pediátricos (edades de 4-17) puede implicar una dosis de 0,4 mg/kg a 5 mg/kg de TNFR:Fc, administrada una o más veces a la semana.

Más específicamente, en el caso de artritis reumatoide, pueden administrarse 25 mg de TNFR:Fc dos veces a la semana. Alternativamente, se ha mostrado que 50 mg administrados una vez a la semana es seguro y eficaz.

- 35 En el caso de artritis psoriásica y espondilitis anquilosante, la dosis recomendada es de 25 mg de TNFR:Fc administrados dos veces a la semana o 50 mg administrados una vez a la semana. Volviendo a la psoriasis en placas, la dosis recomendada de TNFR:Fc es 25 mg administrados dos veces a la semana o 50 mg administrados una vez a la semana. Alternativamente, pueden usarse 50 mg administrados dos veces a la semana durante hasta 12 semanas seguidas, si es necesario, por una dosis de 25 mg dos veces a la semana o 50 mg una vez a la semana. El tratamiento con TNFR:Fc debe continuar hasta que se logra la remisión, durante hasta 24 semanas. La terapia continua más allá de 24 semanas puede ser apropiada para algunos pacientes adultos. El tratamiento debe interrumpirse en pacientes que no muestran respuesta tras 12 semanas. Si se indica retratamiento con TNFR:Fc, debe seguirse la misma orientación sobre la duración del tratamiento. La dosis debe ser de 25 mg dos veces a la semana o 50 mg una vez a la semana.

- 40 Con respecto a la artritis idiopática juvenil (edad de 4 años y más), pueden administrarse 0,4 mg/kg (hasta un máximo de 25 mg por dosis) tras la reconstitución de 25 mg de TNFR:Fc en 1 ml de disolvente, dos veces a la semana como una inyección subcutánea con un intervalo de 3-4 días entre dosis.

5 Con respecto a la psoriasis en placas pediátrica (edad de 8 años y más), pueden administrarse 0,8 mg/kg (hasta un máximo de 50 mg por dosis) una vez a la semana durante hasta 24 semanas. El tratamiento debe interrumpirse en pacientes que no muestran respuesta tras 12 semanas. Si se indica retratamiento con TNFR:Fc, debe seguirse la orientación anterior sobre la duración del tratamiento. La dosis debe ser de 0,8 mg/kg (hasta un máximo de 50 mg por dosis) una vez a la semana.

En caso de alteración renal y hepática, no se requiere ajuste de la dosis.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende una composición según el primer aspecto e instrucciones para el uso de la presente composición, tal como se define en las reivindicaciones.

10 En una realización preferida, la composición está contenida en una jeringa precargada. En otra realización preferida, la composición está contenida en un vial precargado. El kit puede comprender una o más formas de dosificación unitaria que contienen la composición farmacéutica de la invención. Ejemplos de jeringas adecuadas son jeringas precargables de vidrio BD Hipak SCF de 1 ml de largo, ensambladas con tapones recubiertos con PTFE (calidad de caucho 4023/50 de West). Los viales de vidrio pueden ser, por ejemplo, viales de vidrio 6R (clase hidrolítica I) ensamblados con tapones recubiertos con PTFE (calidad de caucho 4023/50 de West). Sin embargo, puede usarse cualquier otra jeringa o vial adecuado. El kit puede comprender también la composición farmacéutica según la invención en otro recipiente secundario, tal como en un autoinyector.

20 La jeringa precargada puede contener la formulación en forma acuosa. La jeringa descrita puede suministrarse, además, con un autoinyector, que a menudo es un artículo desechable para un único uso solo, y puede tener, por ejemplo, un volumen de entre 0,1 y 1 ml. Sin embargo, la jeringa o el autoinyector puede ser también para múltiples usos o múltiples dosificaciones. El vial descrito puede contener la formulación en estado liofilizado o acuoso, y puede servir como dispositivo de un solo o múltiples usos. El vial puede tener, por ejemplo, un volumen de entre 1 y 10 ml. En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método de producción de una composición farmacéutica según el primer aspecto, que comprende combinar TNFR:Fc, un tampón citrato y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina y prolina y sus sales farmacéuticas aceptables.

25 En una realización particular, el método puede comprender una etapa adicional de añadir un disolvente farmacéuticamente aceptable tal como se definió anteriormente. El método puede comprender, además, la etapa de añadir al menos un modificador de la tonicidad, tal como cloruro de sodio y/o sacarosa, y opcionalmente un excipiente tal como se definió anteriormente. En una realización preferida final, el método puede comprender, además, una etapa de liofilización, etapa que puede ser antes o después de añadir el al menos un modificador de la tonicidad, y/o un excipiente tal como se definió anteriormente.

30 La invención se entenderá más completamente mediante referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Descripción de materiales

35 La TNFR:Fc que se usó para los ejemplos descritos se deriva de células CHO recombinantes, que se han cultivado en un proceso de alimentación discontinua en medio químicamente definido. La TNFR:Fc se purifica de la cosecha libre de células mediante métodos convencionales incluyendo cromatografía de afinidad en resinas de proteína A y mediante etapas cromatográficas y de filtración adicionales.

Descripción de los métodos

General

40 Todos los métodos cromatográficos se realizaron en sistemas de HPLC Agilent 1100 y 1200 equipados con detección de UV y fluorescencia.

Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

45 Se usó cromatografía de exclusión molecular para separar variantes de TNFR: Fc de masa molecular inferior y superior, así como cualquier impureza y componente de la formulación. Los resultados se describieron como la suma de picos de agregación (AP) y la suma de picos de degradación (DP). En SEC, la identidad de las muestras de prueba se determinó comparando el tiempo de retención cromatográfica de los picos principales con el tiempo de retención del pico principal de un patrón de referencia.

50 Se realizó SEC usando dos columnas secuenciales Tosoh Bioscience TSK-Gel G3000SWXL (5 µm, 250 Å, 7,8 mm de D.I. x 300 mm de longitud) (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania) y una fase móvil que contenía fosfato de potasio 150 mM, pH 6,5. La velocidad de flujo se ajustó a 0,4 ml/min y la temperatura de la columna a 30°C. Las muestras se diluyeron con fase móvil hasta una concentración de 0,75 mg/ml y el volumen de inyección fue de 10 µl.

Cromatografía de fase inversa (RP-HPLC o RPC)

5 El contenido de las muestras se determinó mediante RP-HPLC usando una columna C8 (5 μm , 300 \AA , 2,1 mm de D.I. x 75 mm de longitud) a una temperatura de columna de 70°C. La separación de las variantes del producto se logró aplicando un gradiente lineal de desde el 20 hasta el 30 % de la fase móvil B (fase móvil A: el 10 % de acetonitrilo, el 0,3 % de PEG 300, el 0,1 % de TFA; fase móvil B: el 90 % de acetonitrilo, el 0,3 % de PEG 300, el 0,1 % TFA) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. Las muestras se desialilaron y se diluyeron hasta una concentración de 2,5 mg/ml antes de la inyección. Se usaron cromatogramas de detección UV para la evaluación de la pureza. Los resultados se mostraron como contenido, así como picos posteriores (suma de PP).

Cromatografía de intercambio catiónico (CEX)

10 La separación por intercambio catiónico se realizó usando una resina de intercambio catiónico a base de sílice con un recubrimiento unido de poli(ácido aspártico) (100 mm de longitud x 4,6 mm de D.I.; partículas de 3 μm). Antes de la inyección, se desialilaron las muestras y se ajustó la concentración a 2,5 mg/ml con tampón de desialilación. Se eluyeron las muestras mediante un gradiente lineal de desde el 30 hasta el 50 % de fase móvil B a lo largo de 20 min (A: acetato de sodio 50 mM, pH 5,2; B: acetato de sodio 50 mM, NaCl 250 mM, pH 5,2). La velocidad de flujo y la temperatura se establecieron en 1,0 ml/min y 30°C, respectivamente. Se usaron cromatogramas de detección UV para la evaluación de datos. Los resultados se muestran como suma de picos ácidos (suma de AP) y suma de picos básicos (suma de BP)

Método de recuento de partículas (PC)

20 El recuento de partículas se realizó mediante oscurecimiento de la luz, usando un instrumento Accusizer Nicomb SIS 780. Esta técnica detecta la luz dispersada por una partícula/agregado dentro de un entorno líquido. La señal se calculará en el radio hidrodinámico para la partícula/agregado detectado. Se calculó una media de tres mediciones utilizando un volumen de muestra total de 2,8 ml. Se usaron los siguientes parámetros del instrumento: Intervalo: 0,5 - 500 μm (512 canales; escala logarítmica); velocidad de flujo: 5 ml/min.

25 Se evaluó la influencia de los excipientes sacarosa, arginina y NaCl sobre la agregación de TNFR:Fc antes de realizar las pruebas descritas en los ejemplos 1-3. Las formulaciones resultantes se sometieron a un estudio de estabilidad al estrés que incluía agitación y remoción. Se detectaron agregados con un radio de hasta 200 nm por medio del método de SEC, mientras que el recuento de partículas determina partículas en el intervalo de 500 nm a 400 μm .

Arginina:

30 El análisis de formulaciones sometidas a estrés por medio de SEC reveló la reducción de agregados debido a la adición de arginina. Al mismo tiempo, se detectó la formación de partículas de mayor tamaño con una molaridad creciente de la arginina por medio del método de PC. Por tanto, puede concluirse que cantidades crecientes de arginina en formulaciones de TNFR:Fc facilitan la disminución de partículas de menor tamaño (r = hasta 200 nm), lo que probablemente se debe a la agrupación de agregados en partículas de mayor tamaño que solo son detectables por medio del método de recuento de partículas.

35 NaCl:

La adición de mayores molaridades de NaCl condujo a los mismos resultados de PC que para la adición de arginina. La cantidad de DP, detectada por medio del método de SEC, aumentó con molaridades crecientes de NaCl

Sacarosa:

40 La adición de molaridades crecientes de sacarosa parecía conducir a la reducción del radio detectado de las partículas por medio del método de PC. No se detectaron resultados significativos por medio de SEC.

Ejemplo 1

Examen de la formulación

45 La evaluación se realizó mediante una combinación de un DoE (diseño de experimentos) y estudios de parámetros individuales. Todas las formulaciones contenían TNFR:Fc 50 mg/ml, NaCl 100 mM y se ajustaron a un pH de alrededor de pH 6,3. Las formulaciones se dividieron en grupos denominados tensioactivos, tampón, estabilizador I (que contiene azúcares y alcoholes de azúcar), así como estabilizador II (aminoácidos), mientras que los grupos de estabilizador se diseñaron y evaluaron mediante un diseño estadístico (tabla 3). Los resultados de estos grupos se evaluaron para determinar su significación estadística. Los resultados se compararon, además, con la formulación de la técnica anterior correspondiente a Enbrel® (tabla 1) de la TNFR:Fc.

50

Tabla 3. Factores evaluados durante el examen de la formulación de TNFR:Fc

<i>Factores evaluados</i>	<i>Intervalo aplicado</i>
<i>Azúcares - Estabilizador I</i>	
Sacarosa	0-100 mM
Trehalosa	0-100 mM
Sorbitol	0-100 mM
<i>Aminoácidos - Estabilizador II</i>	
Glicina	0-100 mM
Lisina	0-100 mM
Prolina	0-100 mM
Arginina	0/100 mM
<i>Tampón</i>	
Fosfato	0/25 mM
Succinato	0/25 mM
Histidina	0/25 mM
Citrato	0/25 mM
<i>Agente de tonicidad</i>	
NaCl	100/150 mM

Las formulaciones resultantes (tabla 4) se sometieron a estrés mecánico y se sometieron a un estudio de estabilidad al estrés a corto plazo (tabla 5). Como referencia sirvió la formulación de etanercept (es decir, tal como se describe en la tabla 1).

Tabla 5. Métodos analíticos y condiciones de estrés aplicados durante la fase de examen de la formulación. Rotaciones por minuto (rpm); agitación por minuto (apm)

<i>Métodos</i>	<i>Condiciones de estrés</i>	<i>Puntos de extracción</i>
<i>Agitación (180 apm*)</i>		
SEC	Formulaciones 1 - 20	6 horas
SEC	Formulaciones 1 - 20	16 horas
<i>Agitación (600 rpm **)</i>		
SEC	Formulaciones 1 - 20	6 horas
SEC	Formulaciones 1 - 20	16 horas
<i>Ciclos de congelación/descongelación</i>		
SEC	Formulaciones 1, 2, 3 y 20	1 ciclo
SEC	Formulaciones 1, 2, 3 y 20	3 ciclos
<i>Temperaturas</i>		
SEC, CEX, RPC	Formulaciones 3 - 20	0 semanas
SEC, CEX, RPC	Formulaciones 3 - 20	2 semanas
SEC, CEX, RPC	Formulaciones 3 - 20	4 semanas

Una influencia positiva sobre los atributos de calidad de TNFR:Fc para los parámetros de salida RPC, CEX y SEC se definió como:

- 5
- Contenido (RPC) - sin disminución
 - Suma de AP (CEX) - nivel bajo
 - Suma de BP (CEX): comparable a la formulación basada en la técnica anterior
 - Suma de AP (SEC) - nivel bajo
 - Suma de DP (SEC) - nivel bajo
- 10 Los resultados se compararon, además, con la TNFR:Fc en la formulación de la técnica anterior correspondiente a Enbrel® y se marcaron como positivos si eran al menos comparables con los resultados de la formulación de la técnica anterior correspondiente a Enbrel® o si los excedían según los parámetros mencionados anteriormente. Una influencia positiva sobre la estabilidad de TNFR:Fc en la formulación mostraron los factores evaluados prolina, lisina, sacarosa y citrato (tabla 6).
- 15 Tabla 6. Resultados del examen de la formulación. La influencia de los diversos factores se describe con un símbolo de menos (-) o más (+); - refleja una influencia negativa en comparación con la formulación de la técnica anterior correspondiente a Enbrel® y/o el desenlace esperado, mientras que + refleja una influencia positiva en comparación con la formulación de la técnica anterior correspondiente a Enbrel® y/o el desenlace esperado; el resultado entre paréntesis indica efectos menos pronunciados; los resultados no significativos no se rellenan; los factores marcados en negrita muestran un impacto positivo sobre la calidad del producto; los factores marcados en cursiva se investigaron adicionalmente (véase el ejemplo 3); los factores marcados con un asterisco (*) muestran efectos adversos y se excluyeron de investigaciones adicionales.
- 20

Factores evaluados	RPC	CEX		SEC	
	Contenido	Suma de AP	Suma de BP	Suma de AP	Suma de DP
Aminoácidos					
Glicina (*)		(-)			
Lisina		+		+	-
Prolina		+		+	-
Azúcares					
Sacarosa	(-)	(+)			
<i>Trehalosa</i>		+			
Sorbitol (*)		(-)			
Tampones					
Fosfato				(-)	(-)
<i>Succinato</i>		+	(+)	+	-
Histidina (*)		+	-	(-)	(-)
Citrato	(+)	+	(+)	+	+

Ejemplo 2

Examen enfocado

- 5 Se evaluaron adicionalmente factores seleccionados del examen de la formulación que proporcionaban efectos significativos combinándolos en otro enfoque de DoE (formulaciones 1-13; factores: prolina, lisina, fosfato, citrato), así como formulaciones que varían en parámetros individuales (lisina/succinato (formulación 15); prolina/succinato (formulación 16); lisina/citrato/poloxámero (formulación 17); trehalosa/citrato/lisina (formulación 18)). La formulación 19 presenta la formulación de la técnica anterior correspondiente a la formulación de Enbrel®.

Las formulaciones resultantes se sometieron a un estudio de estabilidad al estrés a corto plazo (tabla 8). Se aplicaron los métodos analíticos SEC, CEX y RPC.

Tabla 8. Métodos analíticos y condiciones de estrés aplicados durante el examen enfocado

Métodos	Condiciones de estrés	Puntos de extracción
<i>Agitación (600 rpm)</i>		
SEC	Formulaciones 1 - 19	48 horas
<i>Ciclos de congelación/descongelación</i>		
SEC	Formulaciones 1 - 19	3 ciclos
<i>Temperaturas</i>		
SEC	Formulaciones 1 - 13	0 semanas
SEC	Formulaciones 1 - 13	2 semanas
SEC	Formulaciones 1 - 13	4 semanas
SEC, CEX, RPC	Formulaciones 14-19	0 semanas
SEC, CEX, RPC	Formulaciones 14-19	2 semanas
SEC, CEX, RPC	Formulaciones 14-19	4 semanas

5 Se evaluaron los factores lisina, prolina, tampón citrato y tampón fosfato con respecto a la formación de productos de degradación debido al almacenamiento de formulaciones de TNFR:Fc a 25 (A) y 40°C (B), así como debido al estrés aplicado durante la agitación durante 48 h (C) y tres ciclos de congelación y descongelación (D). Una influencia positiva sobre los atributos de calidad de TNFR:Fc para los parámetros de salida de SEC se definió como:

- Suma de DP (SEC): nivel bajo, sin aumento

10 Se determinó un efecto significativamente positivo para el factor tampón citrato, que condujo a niveles bajos de productos de degradación en las formulaciones de TNFR:Fc resultantes en las condiciones descritas en la tabla 8. Además de eso, solo la prolina mostró un efecto ligeramente significativo en el almacenamiento a 25°C y después de 48 h de agitación a 600 rpm, donde los productos de degradación aumentaban con el estrés aplicado.

15 La evaluación de los excipientes tampón succinato, en combinación con lisina o prolina, poloxámero y trehalosa, se evaluó por medio de análisis de RPC, SEC y CEX (tabla 9). Una influencia positiva sobre los atributos de calidad de TNFR:Fc se definió como:

- Contenido (RPC): sin disminución
- Suma de AP (CEX): nivel bajo
- Suma de DP (SEC): nivel bajo

20 Las formulaciones que contienen succinato (formulación 15 (que incluye lisina), formulación 16 (que incluye prolina)) mostraron la formación de picos de degradación adicionales en almacenamiento a 40°C. Por tanto, se excluyó el succinato de evaluaciones adicionales. Como el tensioactivo poloxámero y el estabilizador trehalosa no mostraron un impacto superior sobre la estabilidad (en el intervalo de la formulación de la técnica anterior correspondiente a Enbrel®), también se excluyeron poloxámero y trehalosa de evaluaciones adicionales.

25 Tabla 9. Resumen de las influencias de los excipientes succinato, poloxámero y trehalosa evaluados durante el examen enfocado.

	Succinato		Poloxámero	Trehalosa	Objetivo
	Lisina	Prolina			
Contenido (RPC)	Disminución	Disminución	Sin disminución	Sin disminución	Sin disminución
DP (SEC)	Aumento	Aumento	Nivel bajo	Nivel bajo	Nivel bajo
AP (CEX)	Aumento	Aumento	Nivel bajo	Nivel bajo	Nivel bajo

Ejemplo 3

Optimización de la formulación

Las cuatro formulaciones más prometedoras (formulaciones 1-4) de las evaluaciones previas se sometieron a un estudio de estabilidad a largo plazo en condiciones de almacenamiento previstas (2-8°C), así como aceleradas (25 y

40°C). El estudio de estabilidad a largo plazo se realizó con jeringas (0,5 ml) y viales (1 ml) llenos de la formulación de TNFR:Fc. La tabla 10 ofrece una visión general de las formulaciones sometidas a prueba. Como referencia, sirvió la formulación de la técnica anterior correspondiente a Enbrel® (formulación 5). Todas las formulaciones se compararon entre sí, así como con la referencia descrita.

5 Tabla 10. Visión general de las formulaciones sometidas a prueba, optimización de la formulación

Lote	Concentración [mg/ml]	Composición	Volumen de llenado [ml]	Recipiente
1030ML220_1_s	50	citrato 50 mM, sacarosa 29 mM, NaCl 25 mM, L-lisina 25 mM, pH 6,3	0,5	jeringa
1030ML220_2_s	50	citrato 25 mM, sacarosa 29 mM, NaCl 63 mM, L-lisina 25 mM, pH 6,3	0,5	jeringa
1030ML220_3_s	50	citrato 25 mM, sacarosa 29 mM, NaCl 75 mM, L-prolina 25 mM, pH 6,3	0,5	jeringa
1030ML220_4_s	50	fosfato 25 mM, sacarosa 29 mM, NaCl 75 mM, L-lisina 25 mM, pH 6,3	0,5	jeringa
1030ML220_5_s	50	fosfato 25 mM, sacarosa 29 mM, NaCl 75 mM, L-arginina 25 mM, pH 6,3	0,5	jeringa
1030ML220_1_v	50	citrato 50 mM, sacarosa 29 mM, NaCl 25 mM, L-lisina 25 mM, pH 6,3	1,0	vial 2R
1030ML220_2_v	50	citrato 25 mM, sacarosa 29 mM, NaCl 63 mM, L-lisina 25 mM, pH 6,3	1,0	vial 2R
1030ML220_3_v	50	citrato 25 mM, sacarosa 29 mM, NaCl 75 mM, L-prolina 25 mM, pH 6,3	1,0	vial 2R
1030ML220_4_v	50	fosfato 25 mM, sacarosa 29 mM, NaCl 75 mM, L-lisina 25 mM, pH 6,3	1,0	vial 2R
1030ML220_5_v	50	fosfato 25 mM, sacarosa 29 mM, NaCl 75 mM, L-arginina 25 mM, pH 6,3	1,0	vial 2R

Se declaró un efecto positivo para los factores evaluados lisina y prolina como estabilizador, así como para los sistemas de tampones citrato y fosfato si la estabilidad para la suma de parámetros de salida de pico posterior (RPC), la suma de productos de agregación y degradación (SEC), así como la suma de picos de ácido (CEX) se excedía en comparación con la referencia. Los objetivos para los parámetros de salida se describen en la tabla 11.

10 Tabla 11. Descripción del objetivo durante la optimización de la formulación

Parámetro de salida	Método	Objetivo
Suma de picos posteriores	RPC	Nivel bajo
Suma de productos de agregación	SEC	Nivel bajo
Suma de productos de degradación	SEC	Nivel bajo
Suma de picos ácidos	CEX	Nivel bajo

Los resultados para los parámetros de salida RPC / suma de pico posterior (PP), SEC / suma de productos de agregación (AP) y de degradación (DP) y CEX / suma de picos de ácido (AP) se presentan en la tabla 12, 13 (almacenamiento a 2-8°C), tabla 14, 15 (almacenamiento a 25°C), así como tabla 16, 17 (almacenamiento a 40°C). El análisis de las muestras se realizó al inicio del estudio de estabilidad, así como después de 1, 2 y 3 meses de almacenamiento a las temperaturas declaradas.

Resumen de resultados para la formulación de TNFR:Fc almacenada a 2-8, 25 y 40°C durante tres meses (tabla 12)

1) RPC: suma de los picos posteriores (suma de PP)

Después de tres meses de almacenamiento a 2-8, 25 y 40°C, las formulaciones de TNFR:Fc que contenían un sistema de tampón citrato (formulaciones 1-3) presentaban valores inferiores de picos posteriores en comparación con formulaciones que contenían un tampón fosfato (formulaciones 4 y 5). El valor más bajo absoluto se detectó para la formulación que contenía tampón citrato 50 mM y lisina 25 mM (formulación 1). El efecto descrito fue incluso más pronunciado para formulaciones de TNFR:Fc almacenadas en viales.

2) SEC - Suma de productos de agregación (suma de AP)

Después de 3 meses de almacenamiento a 2-8, 25 y 40°C, las formulaciones de TNFR:Fc 1 a 5 son comparables con respecto a la cantidad de productos de agregación. Además, no se detectaron diferencias entre las formulaciones cargadas en viales o jeringas.

3) SEC - Suma de productos de degradación (suma de DP)

5 Después de tres meses de almacenamiento a 2-8, 25 y 40°C, las formulaciones de TNFR:Fc que contenían un sistema de tampón citrato (formulaciones 1-3) presentaban valores significativamente inferiores de productos de degradación en comparación con formulaciones que contenían un tampón fosfato (formulaciones 4 y 5). El valor más bajo absoluto se detectó para la formulación que contenía tampón citrato 50 mM y lisina 25 mM (formulación 1). El efecto descrito fue incluso más pronunciado para formulaciones de TNFR:Fc almacenadas en viales.

10 4) CEX - Suma de picos ácidos (suma de AP)

Después de tres meses de almacenamiento a 2-8, 25°C y 40°C, las formulaciones de TNFR:Fc en jeringas precargadas, que contenían un sistema de tampón citrato (formulaciones 1-3) presentaban valores significativamente inferiores de picos ácidos en comparación con formulaciones que contenían un tampón fosfato (formulaciones 4 y 5). El efecto descrito fue más pronunciado para formulaciones de TNFR:Fc almacenadas a 2-8°C en viales.

Conclusión de la optimización de la formulación

La estabilidad de las formulaciones 1 a 5 durante almacenamiento de tres meses a 2-8, 25 y 40°C se evaluó por medio de análisis de RPC, SEC y CEX. Se determinó que las formulaciones que contenían un sistema de tampón citrato (formulaciones 1-3) eran superiores en comparación con las formulaciones que contenían un sistema de tampón fosfato (formulaciones 4 y 5) con respecto a la formación de picos posteriores (RPC), la formación de productos de degradación (SEC) y la formación de picos de ácido (CEX). Los mejores resultados absolutos se determinaron mediante RPC y SEC para la formulación que contenía un sistema de tampón citrato 50 mM y lisina 25 mM como estabilizador. Entre las peores, si no la peor formulación, estaba la referencia, la formulación de la técnica anterior correspondiente a Enbrel® (formulación 5). La degradación de TNFR:Fc, determinada por medio de RPC, SEC y CEX, fue, en general, más pronunciada si las formulaciones se almacenaban en viales. Esto probablemente se deba a la mayor superficie de interacción líquido/aire que presentan los viales en comparación con las jeringas. Por tanto, los efectos fueron incluso parcialmente más pronunciados, incluyendo la estabilización superior de TNFR:Fc formulada en la matriz de formulación de citrato/lisina.

Tabla 12. Resultados de resumen de la optimización de la formulación

	RPC suma de PP	Suma de AP	SEC Suma de DP	CEX Suma de AP
2-8°C	Las formulaciones que contienen citrato presentan valores significativamente más bajos que las que contienen fosfato; viales: efecto más pronunciado; mejor formulación: citrato 50 mM/lisina 25 mM;	Las formulaciones 1 a 5 son comparables	Las formulaciones que contienen citrato presentan valores significativamente más bajos que las que contienen fosfato; viales: efecto más pronunciado; mejor formulación: citrato 50 mM/lisina 25 mM;	Las formulaciones que contienen citrato presentan valores significativamente más bajos que las que contienen fosfato; viales: efecto más pronunciado;
25°C	Véase 2-8°C	Véase 2-8°C	Véase 2-8°C	Las formulaciones que contienen citrato muestran valores significativamente más bajos que las que contienen fosfato;
40°C	Véase 2-8°C	Véase 2-8°C	Véase 2-8°C	Véase 25°C

30 *TNFR:Fc almacenada a 2-8°C - jeringas y viales*

Tabla 13. Jeringas - 2-8°C

RPC Suma de PP	Citrato 50 mM/lisina 25 mM	Citrato 25 mM/lisina 25 mM	Citrato 25 mM/prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/arginina 25 mM
T0	10,2	10,2	10,2	10,3	10,3
3M	11,2	11,6	11,7	12,5	12,7

ES 2 759 931 T3

SEC Suma de AP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ Arginina 25 mM
T0	0,7	0,8	0,7	0,7	0,7
1M	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7
2M	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
3M	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8
SEC Suma de DP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	4,0	4,1	3,9	4,4	4,4
1M	4,8	4,8	4,9	7,4	7,5
2M	6,0	6,2	6,1	10,3	10,0
3M	6,0	6,5	6,5	12,8	12,8
CEX Suma de AP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	9,3	8,3	9,1	8,2	9,2
3M	10,0	10,5	10,8	12,7	13,1

Tabla 14. Viales - 2-8°C

RPC Suma de PP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	10,1	10,2	10,2	10,3	10,3
3M	11,5	11,9	12,1	13,1	13,0
SEC Suma de AP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7
1M	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6
2M	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
3M	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7
SEC Suma de DP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	4,0	4,1	4,3	4,7	4,9
1M	6,2	6,3	6,5	8,8	9,0
2M	6,5	7,7	8,8	12,9	13,5
3M	6,1	9,6	9,9	17,1	17,4

ES 2 759 931 T3

CEX Suma de AP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	8,2	9,0	8,3	9,1	8,8
3M	11,2	11,5	12,5	13,4	14,3

TNFR:Fc almacenada a 25°C – jeringas y viales

Tabla 15. Jeringas - 25°C

RPC Suma de PP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	10,2	10,2	10,2	10,3	10,3
1M	11,1	11,4	11,4	12,2	12,4
2M	11,9	12,3	12,3	14,0	14,0
3M	13,3	13,9	13,7	16,4	16,1
SEC Suma de AP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1M	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2M	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
3M	1,9	2,0	2,0	2,0	1,9
SEC Suma de DP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1M	8,3	8,7	8,3	13,4	12,8
2M	9,8	10,8	10,7	18,1	17,6
3M	11,6	12,8	12,6	21,3	20,7
CEX Suma de AP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ Arginina 25 mM
T0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1M	10,0	10,7	10,4	12,6	12,8
2M	12,7	13,1	12,9	15,2	15,3
3M	12,9	13,4	13,5	17,8	18,5

ES 2 759 931 T3

Tabla 16. Viales - 25°C

RPC Suma de PP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	10,1	10,2	10,2	10,3	10,3
1M	11,4	11,9	11,8	11,7	14,1
2M	12,0	12,8	12,9	17,4	17,8
3M	13,3	14,1	14,3	19,2	20,7
SEC					
Suma de AP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1M	0,9	1,0	0,9	0,9	0,8
2M	1,6	1,6	1,6	1,4	1,3
3M	1,9	2,0	2,0	1,6	1,5
SEC					
Suma de DP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1M	8,9	10,1	10,0	23,5	24,3
2M	11,2	12,6	12,4	30,9	32,5
3M	13,3	14,8	14,4	36,5	39,0
CEX					
Suma de AP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1M	10,5	10,5	10,9	10,7	15,8
2M	12,8	13,7	13,7	19,6	19,9
3M	14,3	15,4	12,0	14,2	14,2

TNFR:Fc almacenada a 40°C - jeringas y viales

Tabla 17. Jeringas - 40°C

RPC Suma de PP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	10,2	10,2	10,2	10,3	10,3
1M	12,8	13,2	13,2	14,7	14,8
2M	16,8	16,9	17,0	18,8	18,8
3M	19,6	19,6	19,5	22,5	22,9

ES 2 759 931 T3

SEC Suma de AP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	0,7	0,8	0,7	0,7	0,7
1M	3,0	3,0	3,0	3,2	3,2
2M	3,1	3,6	3,6	3,8	3,8
3M	7,9	8,2	7,9	8,2	8,3
SEC Suma de DP					
T0	4,0	4,1	3,9	4,4	4,4
1M	9,8	10,0	9,9	13,3	13,0
2M	14,9	14,7	14,4	19,0	19,5
3M	18,4	18,9	18,8	24,3	24,2
CEX Suma de AP					
T0	9,3	8,3	9,1	8,2	9,2
1M	13,6	13,1	13,2	15,1	14,5
2M	18,0	19,2	18,9	20,5	19,9
3M	28,1	27,1	26,3	29,8	30,6

Tabla 18. Viales - 40°C

RPC Suma de PP	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	10,1	10,2	10,2	10,3	10,3
1M	13,3	13,0	13,0	14,9	15,2
2M	15,8	16,2	15,6	18,7	18,5
3M	19,1	20,0	19,6	23,9	24,1
SEC Suma de AP					
T0	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7
1M	2,9	2,8	2,8	2,9	2,8
2M	3,5	3,7	3,6	3,7	3,7
3M	7,5	7,8	7,5	7,5	7,6
SEC Suma de DP					
T0	4,0	4,1	4,3	4,7	4,9

ES 2 759 931 T3

1M	10,9	11,4	11,1	15,5	15,4
2M	15,1	15,9	15,1	21,4	20,9
3M	19,5	20,3	19,9	27,5	27,6
CEX Suma de AP					
	Citrato 50 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ lisina 25 mM	Citrato 25 mM/ prolina 25 mM	Fosfato 25 mM/ lisina 25 mM	Fosfato 25 mM/ arginina 25 mM
T0	8,2	9,0	8,3	9,1	8,8
1M	14,1	14,6	13,6	15,6	15,7
2M	19,0	19,3	18,5	20,5	21,7
3M	28,0	26,8	26,9	29,9	32,4

Lista de secuencias

- <110> Sandoz AG
- 5 <120> Formulaciones líquidas farmacéuticas estables de la proteína de fusión TNFR:Fc
- <130> Documento EPA-117 965
- <160> 4
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 455
- <212> PRT
- 15 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 759 931 T3

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
 85 90 95

Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175

ES 2 759 931 T3

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

5 <210> 2
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 759 931 T3

<400> 2

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
 85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190

ES 2 759 931 T3

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255

Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly
 260 265 270

Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys
 275 280 285

Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro
 290 295 300

Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu
 305 310 315 320

Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser
 325 330 335

Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly
 340 345 350

Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser
 355 360 365

Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile
 370 375 380

Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln
 385 390 395 400

Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
 405 410 415

Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser
 420 425 430

Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro
 435 440 445

Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
 450 455 460

5 <210> 3
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 759 931 T3

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

ES 2 759 931 T3

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
 85 90 95
 Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
 100 105 110
 Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
 115 120 125
 Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
 130 135 140
 Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
 145 150 155 160
 Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
 165 170 175
 Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
 180 185 190
 His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
 195 200 205
 Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
 210 215 220
 Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica, que comprende TNFR:Fc de 0,15 mM a 0,5 mM, un tampón citrato a una concentración de desde 25 mM hasta 120 mM a un pH de desde 6,2 hasta 6,4, y un aminoácido a una concentración de desde 15 mM hasta 100 mM seleccionado del grupo que consiste en lisina y prolina y sus sales farmacéuticas aceptables; en la que TNFR:Fc es etanercept.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el aminoácido es lisina o su sal farmacéutica aceptable.
- 10 3. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, un modificador de la tonicidad seleccionado del grupo que consiste en cloruro de sodio, cisteína, histidina, glicina, cloruro de potasio, sacarosa, glucosa y manitol.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que el modificador de la tonicidad es cloruro de sodio y/o sacarosa.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 3 o 4, que comprende al menos un modificador de la tonicidad a una concentración total de desde 5 mM hasta 200 mM.
- 15 6. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, al menos un excipiente seleccionado del grupo que consiste en lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa, albúmina sérica bovina (BSA), dextrano, poli(acetato de vinilo) (PVA), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polietilenimina (PEI), gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC), polietilenglicol (PEG), etilenglicol, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), L-serina, glutamato de sodio, alanina, glicina, sarcosina, ácido gamma-aminobutírico (GABA); monolaurato de polioxietilensorbitano, preferiblemente Tween-20; monooleato de polioxietilensorbitano, preferiblemente Tween-80; dodecilsulfato de sodio (SDS), polisorbato, copolímero de polioxietileno, fosfato de potasio, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, N-óxido de trimetilamina, betaína, iones de zinc, iones de cobre, iones de calcio, iones de manganeso, iones de magnesio, CHAPS, monolaurato de sacarosa y 2-O-beta-manoglicerato.
- 20 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, que comprende el al menos un excipiente a una concentración total de desde 0,1 mM hasta 0,7 mM.
8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende TNFR:Fc a una concentración de 50 mg/ml.
- 30 9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende, además, un disolvente farmacéuticamente aceptable.
10. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la composición está liofilizada.
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 1,
que comprende lisina de 15 mM a 100 mM, sacarosa de 10 a 100 mM y cloruro de sodio de 5 mM a 200 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3; o
- 35 que comprende prolina de 15 mM a 100 mM, sacarosa de 10 mM a 100 mM y cloruro de sodio de 5 mM a 200 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.
12. Composición farmacéutica según la reivindicación 1,
que comprende TNFR:Fc 0,3 mM, tampón citrato 50 mM, lisina 25 mM, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 75 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3; o
- 40 que comprende TNFR:Fc 0,3 mM, tampón citrato 25 mM, lisina 25 mM, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 88 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3; o
que comprende TNFR:Fc 0,3 mM, tampón citrato 25 mM, prolina 25 mM, sacarosa 29 mM y cloruro de sodio 75 mM a un valor de pH de aproximadamente 6,3.
- 45 13. Kit que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores e instrucciones para el uso de dicha composición, preferiblemente en el que la composición está contenida en una jeringa precargada o en el que la composición está contenida en un vial precargado, más preferiblemente en el que la composición está liofilizada y contenida en un vial.
- 50 14. Método de producción de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende combinar TNFR:Fc, un tampón citrato y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina y prolina y sus sales farmacéuticas aceptables.

15. Método según la reivindicación 14, que comprende, además, añadir al menos un modificador de la tonicidad, y/o un disolvente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un excipiente tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.

16. Método según la reivindicación 14 o 15, que comprende, además, una etapa de liofilización.

- 5 17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en un tratamiento médico, en particular, en un tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo de enfermedades que consiste en enfermedad autoinmunitaria, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, enfermedad de Wegener (granulomatosis), enfermedad de Crohn o enfermedad inflamatoria del
- 10 intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hepatitis C, endometriosis, asma, caquexia, dermatitis atópica, Alzheimer y cáncer.