



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 311 094**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03716244 .3**
96 Fecha de presentación : **27.02.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1478394**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2004**

54 Título: **Composición estabilizada de TNFR-Fc que comprende arginina.**

30 Prioridad: **27.02.2002 US 360257 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2009

73 Titular/es: **IMMUNEX CORPORATION**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72 Inventor/es: **Gombotz, Wayne, R. y**
Remmele, Richard, L., Jr.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 311 094 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).

ES 2 311 094 T3

DESCRIPCIÓN

Composición estabilizada de TNFR-Fc que comprende arginina.

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de U.S. No. 60/360.257, registrada el 27 de Febrero de 2002.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a una composición acuosa farmacéutica adecuada para almacenamiento a largo plazo de polipéptidos que contienen TNFR:Fc, métodos de fabricación de la composición, métodos de administración y estuches que contienen la misma.

Antecedentes

15 Después de su producción, los polipéptidos deben almacenarse típicamente antes de su uso. Frecuentemente, cuando se almacenan durante largos periodos los polipéptidos son inestables en disolución (Manning *et al.*, 1989, Pharm. Res. 6:903-918). En consecuencia, se han desarrollado etapas adicionales de tratamiento para permitir un tiempo más largo de conservación sin deterioro, que incluyen secado, por ejemplo liofilización. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas liofilizadas son menos convenientes para el usuario final.

20 Se pueden considerar estrategias típicas para mejorar la estabilidad de los polipéptidos variando la concentración de elementos con la formulación, o añadiendo excipientes para modificar la formulación (Patentes de U.S. No. 5.580.856 y 6.171.586). El uso de aditivos, aunque mejora el almacenamiento, puede aún dar por resultado polipéptidos inactivos. Además, en el caso de liofilización, la etapa de rehidratación puede introducir condiciones que dan por resultado inactivación del polipéptido mediante, por ejemplo, agregación o desnaturalización (Hora *et al.*, 1992, Pharm. Res., 9:33-36; Liu *et al.*, 1991, Biotechnol. Bioeng., 37:177-184). En realidad la agregación de polipéptidos es indeseable porque puede dar por resultado inmunogenicidad (Cleland *et al.*, 1993, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems, 10:307-377; y Robbins *et al.*, 1987, Diabetes, 36:838-845). El documento EP 1314437 describe preparaciones estabilizadas que contienen anticuerpos.

La presente invención aborda estas cuestiones proporcionando una nueva formulación líquida estable que permite almacenamiento a largo plazo de TNFR:Fc.

Sumario

35 La invención se refiere, en parte, a una composición farmacéutica acuosa estable de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

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

45 La descripción se refiere también a un método para formular una composición farmacéutica, comprendiendo la composición un polipéptido que contiene un dominio Fc con un inhibidor de agregación seleccionado del grupo consistente en L-arginina y L-cisteína. Opcionalmente, se puede añadir también a la composición farmacéutica un tampón, un modificador de la tonicidad y/o un excipiente. En un aspecto, la composición farmacéutica se formula en un intervalo de pH entre pH 6,0 y 7,0.

50 La descripción se refiere también a un método, para tratar un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica descrita aquí, en donde el mamífero tiene una enfermedad o trastorno que se puede tratar beneficiosamente con un polipéptido que contiene un dominio Fc en la composición.

55 La descripción se refiere también a un método de prueba rápida de la estabilidad de un polipéptido que contiene un dominio Fc en una composición farmacéutica de la invención, que comprende las etapas de almacenar la composición a 37°C durante un mes y medir la estabilidad del polipéptido.

60 En otra realización, la presente invención se dirige a un estuche o envase que contiene una composición farmacéutica acuosa de la invención. El estuche puede estar acompañado de instrucciones de uso.

Breve descripción de los dibujos

65 Figura 1: Datos de cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) para los lotes A, B, C y D y el lote 1 almacenados hasta 1 año a 2-8°C.

Figura 2: Datos de SEC para los lotes A, B, C y D y el lote 1 almacenados hasta 1 año a 37°C.

ES 2 311 094 T3

Figura 3: Datos de SEC de desnaturalización (dSEC) para los lotes A, B, C y D y el lote 1 almacenados durante 1 año a 2-8°C.

Figura 4: Datos de dSEC para los lotes A, B, C y D y el lote 1 almacenados hasta 1 año a 37°C.

Figura 5: Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). Datos del pico 1 y el pre-pico 1 para los lotes A, B, C y D y el lote 1 almacenados hasta 1 año a 2-8°C.

Figura 6: Datos del pico 1 y pre-pico 1 HIC para los lotes A, B, C y D y lote 1 almacenados hasta 1 año a 37°C.

Figura 7: Datos del pico 2 HIC para los lotes A, B, C y D y lote 1 almacenados hasta 1 año a 2-8°C.

Figura 8: Datos del pico 2 HIC para los lotes A, B, C y D y lote 1 almacenados hasta 1 año a 37°C.

Figura 9: Datos del pico 3 HIC para los lotes A, B, C y D y lote 1 almacenados hasta 1 año a 2-8°C.

Figura 10: Datos del pico 3 HIC para los lotes A, B, C y D y lote 1 almacenados hasta 1 año a 37°C.

Figura 11: Actividad enlazante de los lotes A, B, C y D y lote 1 almacenados durante 12 meses a -70, 2-8, 30, y 37°C.

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

Descripción detallada

En el almacenamiento a largo plazo de composiciones farmacéuticas que contienen polipéptidos, incluyendo formulaciones acuosas y liofilizadas, se pueden perder polipéptidos activos debido a agregación y/o degradación. Así, la presente invención se dirige a una formulación acuosa que sorprendentemente permite almacenamiento estable a largo plazo de una composición farmacéutica en donde el ingrediente activo de la composición es TNFR:Fc. Esta formulación es útil, en parte, porque es más conveniente usar para el paciente porque esta formulación no requiere etapa extra alguna tal como rehidratación.

Como se usa aquí, la frase “composición farmacéutica” se entiende que se refiere a una formulación que comprende un polipéptido preparado de manera que es adecuado para inyección y/o administración a un paciente en necesidad de ello. Más concretamente, una composición farmacéutica es sustancialmente estéril y no contiene agentes que son indebidamente tóxicos o infecciosos al receptor. Además, se debe entender que, como se usa aquí, se considera que una formulación en disolución o líquida significa una preparación líquida que contiene una o más sustancias químicas disueltas en un disolvente o mezcla de disolventes adecuados mutuamente miscibles.

Además, como se usa aquí, el término “alrededor de” se entiende que significa que puede haber variación en la concentración de un componente de la formulación descrita que puede ser de 5%, 10%, 15%, o hasta e incluso 20% del valor dado. Por ejemplo, si una formulación tiene alrededor de 10 mg/ml de un polipéptido que contiene el dominio Fc, se considera que significa que una formulación puede tener de 8 a 12 mg/ml del polipéptido referido.

En una realización, la formulación comprende un polipéptido que contiene el dominio Fc, un inhibidor de agregación seleccionado del grupo consistente en L-arginina y L-cisteína, y opcionalmente un tampón, un modificador de la tonicidad y excipientes adicionales como sean necesarios. Se ha usado L-arginina para contribuir al nuevo plegamiento de polipéptidos insolubles, en particular los expresados en altos niveles en cuerpos de inclusión en bacterias. Sin embargo, no se ha utilizado exitosamente L-arginina para aumentar la estabilidad de polipéptidos que contienen el dominio Fc en composiciones farmacéuticas (Soejima *et al.*, 2001, *J. Biochem.*, 130:369-277).

Se contempla que la preparación de la composición se debe hacer considerando el malestar límite del lugar de inyección. Se contempla además que se pueden incluir también ingredientes activos adicionales en la composición ahora descrita, por ejemplo para reducir malestar del lugar de inyección. Tales ingredientes activos incluyen, pero no están limitados a, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, tales como por ejemplo, trometamina, en una dosis apropiada.

Polipéptidos

En una realización particular el polipéptido que contiene el dominio Fc es una forma soluble del receptor de TNF (referido como p55 y p75) unido a un dominio Fc (TNFR:Fc). Sin embargo, se debe entender que cualquier polipéptido que contiene un dominio Fc es adecuado para usar en la formulación instantánea. Un TNFR:Fc disponible comercialmente se conoce como etanercept (Enbrel[®], Immunex Corporation), que es un polipéptido de fusión dimerico que consiste en la parte enlazante del ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) de 75 kilodaltons (p75) humano unida a la parte Fc de la IgG1 humana. El componente Fc de etanercept contiene el dominio constante pesado 2 (CH2), el dominio constante pesado 3 (CH3) y la región bisagra, pero no el dominio constante pesado 1 (CH1) de la IgG1. Se debe entender que un dominio Fc puede contener uno o todos los dominios descritos anteriormente. Etanercept se produce por tecnología del DNA recombinante en un sistema de expresión ce-

ES 2 311 094 T3

ular mamífero de ovario de hámster chino (CHO). Consiste en 934 aminoácidos y tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilodaltons (Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc.).

Otros polipéptidos adecuados para usar en la presente formulación incluyen antígenos de diferenciación (referidos como polipéptidos CD) o sus ligandos o polipéptidos sustancialmente similares a cualquiera de éstos, que se unen a un dominio Fc de un anticuerpo. Tales antígenos se describen en *Leukocyte Typing VI* (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani *et al.* eds. Kobe, Japan, 1996). Polipéptidos CD similares se describen en congresos posteriores. Los ejemplos de tales antígenos incluyen CD27, CD30, CD39, CD40, y ligandos de ellos (ligando CD27, ligando CD30, etc.). Varios de los antígenos CD son miembros de la familia de receptores de TNF, que incluye también el ligando 41BB y OX40. Los ligandos son frecuentemente miembros de la familia del TNF, como son el ligando 41BB y el ligando OX40. Por tanto, se pueden formular miembros de las familias del TNF y TNFR de acuerdo con la presente descripción.

Se pueden formular polipéptidos o sus ligandos enzimáticamente activos de acuerdo con la descripción. Los ejemplos incluyen polipéptidos recombinantes de fusión que comprenden un dominio Fc de un anticuerpo unido a todo o parte de uno de los siguientes polipéptidos o sus ligandos o un polipéptido considerablemente similar a uno de éstos: miembros de la familia metaloproteasas-disintegrinas, diversas quinasas, glucocerebrosidasa, superoxidodismutasa, activador tisular del plasminógeno, Factor VIII, Factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, globinas, un antagonista IL-2, alfa-1 antitripsina, enzima convertidora del TNF-alfa, ligandos para cualquiera de las enzimas mencionadas anteriormente, y otras enzimas numerosas y sus ligandos.

Las formulaciones y métodos de la descripción se pueden usar también para preparar composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, es decir, anticuerpos que tienen dominios constantes de inmunoglobinas anticuerpos humanos copulados a uno o más dominios variables de inmunoglobulinas anticuerpos de muridos, y/o anticuerpos no humanos, o sus fragmentos. Los ejemplos específicos de anticuerpos adecuados para usar en la presente formulación incluyen anticuerpos disponibles comercialmente tales como muronab-CD3 (Orthoclone OKT-3[®], Ortho Biotech), abciximab (ReoProb[®], Lilly), rituximab (Rituxan[®], IDEC), dacliximab (zanapax[®], Roche Laboratories), basiliximab (Simulect[®], Novartis), infliximab (Remicade[®], Centocor), palivizumab (Synagis[®], MedImmune), trastuzumab (Herceptin[®], Genentech), gemtuzuman ozogamicina (Mylotarg[™], Wyeth-Ayerst), y alemtuzumab (Campath[®], Berlex). Actualmente cada uno de los anteriores está disponible como un polvo liofilizado que requiere rehidratación o como un concentrado que requiere dilución antes de la administración. La presente formulación obvia la necesidad de cualquier manipulación antes de la administración, por ejemplo, rehidratación o dilución, a la vez que mantiene estabilidad de los ingredientes activos durante almacenamiento a largo plazo.

La composición farmacéutica de la invención se puede usar también para almacenar polipéptidos que comprenden un anticuerpo conjugado con una sustancia citotóxica o luminiscente. Tales sustancias incluyen: derivados de maitansina (tales como DM1); enterotoxinas (tales como una enterotoxina estafilocócica); isótopos de yodo (tal como yodo-125); isótopos de tecnecio (tal como Tc-99m); fluorocromos de cianina (tal como Cy5.5.18); y polipéptidos inactivadores de ribosomas (tales como bouganina, gelonina, o saporina-S6).

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

Las formulaciones de la descripción se pueden usar también para anticuerpos anti-idiotípicos, o polipéptidos sustancialmente similares, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-idiotípicos para: un anticuerpo dirigido al antígeno tumoral gp72; un anticuerpo frente al gangliósido GD3, o un anticuerpo frente al gangliósido GD2.

El polipéptido que contiene el dominio Fc adecuado para almacenamiento en la presente composición farmacéutica puede producirse por células huésped vivas que expresan el polipéptido, tales como hibridomas en el caso de anticuerpos, o células huésped que han sido tratadas por ingeniería genética para producir el polipéptido en el caso de polipéptidos de fusión o anticuerpos. Los métodos de ingeniería genética de células para producir polipéptidos se conocen bien en la técnica. Ver, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds. (1990), *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley,

New York). Tales métodos incluyen introducir ácidos nucleicos que codifican y permiten expresión del polipéptido en células huésped vivas. Estas células huésped pueden ser células bacterianas, células fúngicas, o preferentemente células animales crecidas en cultivo. Las células huésped bacterianas incluyen, pero no están limitadas a, células de *Escherichia coli*. Los ejemplos de cepas adecuadas de *E. coli* incluyen: HB 101, DH5 α , GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, y cualquier cepa de *E. coli* que falla en dividir DNA extraño. Las células huésped fúngicas que se pueden usar incluyen, pero no están limitadas a, células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Aspergillus*. Algunos ejemplos de líneas celulares animales que se pueden usar son CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, y WI38. Se pueden establecer nuevas líneas celulares animales usando métodos muy conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, por transformación, infección vírica, y/o selección). Opcionalmente, el polipéptido puede ser secretado por las células huésped al medio.

La purificación del polipéptido expresado que contiene el dominio Fc se puede realizar por cualquier método estándar. Cuando el polipéptido que contiene el dominio Fc se produce intracelularmente, se separan los desechos de partículas, por ejemplo por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el polipéptido es secretado al medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se pueden concentrar primeramente usando filtros estándar de concentración de polipéptidos. Se pueden añadir también inhibidores de proteasas para inhibir proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de microorganismos.

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

Se pueden utilizar también, dependiendo de la necesidad, otras técnicas para purificación de polipéptidos tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase reversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía de heparina SEPHAROSETM, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poli(aspartico)), cromatoenfoco, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato amónico.

Composición Farmacéutica

La presente composición farmacéutica se prepara combinando, además de un polipéptido purificado descrito anteriormente, un inhibidor de agregación. Además se puede añadir como sea necesario un tampón, un modificador de tonicidad y un excipiente adicional. Se entenderá por un experto ordinario en la técnica que la combinación de diversos componentes a incluir en la composición se puede hacer en cualquier orden apropiado, a saber, el tampón se puede añadir en primer lugar, intermedio o últimamente y el modificador se puede añadir también en primer lugar, intermedio o últimamente. También se debe entender por un experto ordinario en la técnica que algunos de estos productos químicos pueden ser incompatibles en algunas combinaciones, y por tanto, son fácilmente sustituidos por diferentes productos químicos que tienen propiedades similares, pero son compatibles en la mezcla relevante.

Los inhibidores de agregación reducen la tendencia de un polipéptido a asociarse en complejos ternarios o cuaternarios inapropiados o indeseados. Inesperadamente los presentes inventores han encontrado que los aminoácidos L-arginina y/o L-cisteína actúan para reducir la agregación del polipéptido que contiene el dominio Fc en una formulación durante largos períodos, por ejemplo dos años o más. La concentración del inhibidor de agregación en la formulación es preferentemente entre alrededor de 1 mM a 1 M, más preferentemente alrededor de 10 mM a alrededor de 200 mM, más preferentemente alrededor de 10 mM a alrededor de 100 mM, incluso más preferentemente alrededor de 15 mM a alrededor de 75 mM, y aún más preferentemente alrededor de 25 mM. Estos compuestos están disponibles en proveedores comerciales.

Los agentes para tampones mantienen el pH en un intervalo deseado, y diversos tampones adecuados para usar en la composición farmacéutica de la invención incluyen histidina, fosfato potásico, citrato sódico o potásico, ácido maleico, acetato amónico, tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris), diversas formas de acetato y dietanolamina. Un tampón preferido es fosfato sódico porque su capacidad tamponante está a o cerca de pH 6,2. La concentración del tampón en la formulación es preferentemente entre alrededor de 1 mM a alrededor de 1 M, más preferentemente alrededor de 10 mM a alrededor de 200 mM. Los tampones son muy conocidos en la técnica y se fabrican por métodos conocidos y disponibles de los proveedores comerciales.

Cuando el pH de la composición farmacéutica se fija a o cerca de los niveles fisiológicos el confort del paciente tras la administración se maximiza. En particular, se prefiere que el pH esté dentro de un intervalo de pH de alrededor de 5,8 a 8,4, siendo preferido alrededor de 6,2 a 7,4, sin embargo se debe entender que el pH se puede ajustar como sea necesario para maximizar la estabilidad y solubilidad del polipéptido en una formulación particular y como tal, un pH fuera de los intervalos fisiológicos, aún tolerables para el paciente está dentro del alcance de la invención.

Un modificador de la tonicidad se entiende que es una molécula que contribuye a la osmolalidad de una disolución. La osmolalidad de una composición farmacéutica se regula preferentemente para maximizar la estabilidad del ingrediente activo y también para minimizar el malestar al paciente tras la administración. Cuando el suero es

ES 2 311 094 T3

aproximadamente 300 +/- 50 miliosmolal por kilogramo. Se prefiere generalmente que una composición farmacéutica sea isotónica con el suero, es decir, que tenga la misma o similar osmolalidad, que se consigue por adición de un modificador de la tonicidad; así, se contempla que la osmolalidad será de desde alrededor de 180 a alrededor de 420 miliosmolal. Sin embargo, se debe entender que la osmolalidad puede ser más alta o más baja porque lo requieran las condiciones específicas. Los ejemplos de modificadores de tonicidad adecuados para modificar la osmolalidad incluyen, pero no están limitados a, aminoácidos, (por ejemplo, arginina, cisteína, histidina y glicina), sales (por ejemplo, cloruro sódico, cloruro potásico y citrato sódico) y/o sacáridos (por ejemplo, sacarosa, glucosa y manitol). La concentración del modificador de la tonicidad en la formulación es preferentemente entre alrededor de 1 mM a 1 M, más preferentemente alrededor de 10 mM a alrededor de 200 mM. Se conocen bien modificadores de tonicidad en la técnica y se fabrican por métodos conocidos y están disponibles a través de proveedores comerciales.

Los excipientes, también referidos como aditivos químicos, co-solutos, o co-disolventes, que estabilizan al polipéptido cuando está en disolución (también en las formas seca o congelada), se pueden añadir también a una composición farmacéutica. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a azúcares/polioles tales como: sacarosa, lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa; polímeros tales como: seroalbúmina (seroalbúmina de bovino (BSA), SA humana o HA recombinante), dextrano, PVA, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), poli(etilenoimina), gelatina, poli(vinilpirrolidona) (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC); disolventes no acuosos tales como: alcoholes polihidroxílicos (por ejemplo, PEG, etilenglicol y glicerol), dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF); aminoácidos tales como: prolina, L-serina, glutamato sódico, alanina, glicina, hidrocloreuro de lisina, sarcosina y ácido gamma-aminobutírico; tensioactivos tales como: monooleato de polioxietilen-sorbitán (Tween-80), monolaurato de polioxietilen-sorbitán (Tween 20), SDS, polysorbato, copolímero de poli(oxietileno); y excipientes misceláneos tales como: fosfato potásico, acetato sódico, sulfato amónico, sulfato magnésico, sulfato sódico, N-óxido de trimetilamina, betaína, iones metálicos (por ejemplo, cinc, cobre, calcio, manganeso, y magnesio), CHAPS, monolaurato, 2-O-beta-manoglicerato o cualquier combinación de los anteriores.

La concentración de uno o más excipientes en una formulación de la invención es/son preferentemente entre alrededor de 0,001 a 5 por ciento en peso, más preferentemente alrededor de 0,1 a 2 por ciento en pes. Se conocen muy bien los excipientes en la técnica y se fabrican por métodos conocidos y están disponibles en los proveedores comerciales.

En una realización ilustrativa, una formulación de la invención puede comprender alrededor de 25 a alrededor de 50 mg de TNFR:Fc (etanercept), L-arginina alrededor de 10 mM a alrededor de 100 mM, fosfato sódico alrededor de 10 mM a alrededor de 50 mM, alrededor de 0,75% a alrededor de 1,25% de sacarosa, NaCl alrededor de 50 mM a alrededor de 150 mM, a pH de alrededor de 6,0 hasta alrededor de 7,0. En otra realización se puede reemplazar L-arginina por L-cisteína (a alrededor de 1 hasta alrededor de 500 micromolar) en la formulación. También en otra realización, el pH puede ser alrededor de 7,0. En otra realización específica, una formulación de la invención puede comprender alrededor de 25 mg/ml de TNFR:Fc, L-arginina alrededor de 25 mM, fosfato sódico alrededor de 25 mM, cloruro sódico alrededor de 98 mM, y alrededor de 1% de sacarosa a pH alrededor de 6,2.

Una formulación de la descripción puede comprender alrededor de 10 a alrededor de 100 mg/mL de RANK:Fc en L-arginina alrededor de 10 mM a alrededor de 100 mM, fosfato sódico alrededor de 10 mM a alrededor de 50 mM, sacarosa alrededor de 0,75% a alrededor de 1,25%, NaCl alrededor de 50 mM a alrededor de 150 mM, a pH alrededor de 6 a pH alrededor de 7. La formulación puede comprender 50 mg/ml de RANK:Fc en L-arginina alrededor de 50 mM, fosfato sódico alrededor de 25 mM, cloruro sódico alrededor de 98 mM, y alrededor de 1% de sacaros a pH alrededor de 6,2.

Una formulación de la descripción puede comprender una cantidad eficaz de un polipéptido que contiene el dominio Fc, alrededor de 10 mM a alrededor de 100 mM de L-arginina, alrededor de 10 mM a alrededor de 50 mM de fosfato sódico, alrededor de 0 a 5% de manitol y 0 a 2% de Tween-20 a pH alrededor de 6 a 7. Una formulación puede comprender una cantidad eficaz de anticuerpo, tal como Emab (un anticuerpo específico anti-CD22), alrededor de 25 mM de L-arginina, alrededor de 25 mM de fosfato sódico, alrededor de 4% de manitol, alrededor de 0,02% de Tween-20 y a pH alrededor de 6,0.

Otra descripción proporciona un método para tratar un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica descrita en este documento, en donde el mamífero tiene una enfermedad o trastorno que se puede tratar beneficiosamente con un polipéptido que contiene el dominio Fc en la composición. El polipéptido que contiene el dominio Fc se deriva de la misma especie de mamífero que se ha de tratar con la composición. En una realización particular, el mamífero es un paciente humano con necesidad de tratamiento. Cuando el polipéptido que contiene el dominio Fc de la composición es TNFR:Fc, los ejemplos de enfermedades o trastornos que se pueden tratar incluyen, pero no están limitados a, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Weneger (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 TNFR:Fc incluyen las descritas en los documentos WO 00/62790, WO 01/62272 y la Solicitud de Patente de U.S. No. 2001/0021380.

Además, la presente composición farmacéutica proporciona almacenamiento a largo plazo mejorado de manera que el ingrediente activo, por ejemplo TNFR:Fc, es estable a lo largo del curso del almacenamiento en estado líquido o congelado. Como se usa aquí, la frase almacenamiento "a largo plazo" se entiende que significa que la composición

ES 2 311 094 T3

farmacéutica se puede almacenar durante tres meses o más, durante seis meses o más, y preferentemente durante un año o más. Se entiende también que almacenamiento a largo plazo significa que la composición farmacéutica se almacena como un líquido a 2-8°C o se congela, por ejemplo, a -20°C o más fría. Se contempla también que la composición se puede congelar y descongelar más de una vez. El término “estable” con respecto al almacenamiento a largo plazo se entiende que significa que el polipéptido activo de la composición farmacéutica no pierde más del 20%, o más preferentemente el 15%, o incluso más preferentemente el 10%, y lo más preferentemente el 5% de su actividad respecto a la actividad de la composición al comienzo del almacenamiento.

Dosis Eficaz de la Composición Farmacéutica

La dosificación apropiada, o cantidad terapéuticamente eficaz, del polipéptido que contiene el dominio Fc de la formulación dependerá de la enfermedad a tratar, gravedad de la enfermedad, terapia anterior, y la historia clínica del paciente y respuesta al agente terapéutico. La dosis conveniente se puede ajustar de acuerdo con el dictamen del médico asistente de manera que se pueda administrar al paciente una vez o a lo largo de una serie de administraciones. La composición farmacéutica se puede administrar como una sola terapéutica o en combinación con terapias adicionales según se necesiten.

En una descripción, la cantidad eficaz de polipéptido que contiene el dominio Fc por dosis de adulto varía desde alrededor de 1-500 mg/m², o desde alrededor de 1-200 mg/m², o desde alrededor de 1-40 mg/m² o alrededor de 5-25 mg/m². Alternativamente, se puede administrar una dosis uniforme cuya cantidad puede variar desde 2-500 mg/dosis, 2-100 mg/dosis o desde alrededor de 10-80 mg/dosis. Si la dosis se ha de administrar más de una vez por semana, un intervalo de dosis ejemplar es el mismo que los intervalos anteriores de dosis descritos o inferior y preferentemente administrada dos o más veces por semana en una cantidad por dosis de 25-100 mg/dosis. En otra descripción, una dosis aceptable para administración por inyección contiene 80-100 mg/dosis o, alternativamente, contiene 80 mg por dosis. La dosis se puede administrar en dosis bisemanalmente, semanalmente, o separadas por varias semanas (por ejemplo 2 a 8). En este ejemplo se administra TNFR:Fc (etanercept) generalmente a 25 mg por una sola inyección subcutánea (SC).

En muchos casos se obtendrá una mejoría en la enfermedad de un paciente por una dosis de hasta alrededor de 100 mg de la composición farmacéutica una a tres veces por semana a lo largo de un periodo de al menos tres semanas, aunque puede ser necesario tratamiento durante periodos más largos para inducir el grado de mejoría deseado. Para enfermedades crónicas incurables el régimen se puede continuar indefinidamente. Para pacientes pediátricos (edades 4-17), un régimen adecuado implica una dosis de 0,4 mg/kg a 5 mg/kg de uno de los polipéptidos de la invención, administrada una o más veces por semana.

En otra descripción se contempla que la formulación farmacéutica de la invención se prepara como una formulación aproximada, y como tal los componentes de la composición farmacéutica se ajustan para que sea superior a la que se requeriría para administración y se diluya convenientemente antes de la administración.

Administración de la Composición Farmacéutica

Las composiciones farmacéuticas de esta descripción son particularmente útiles para administración parenteral, es decir, subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente, intraperitoneal, intracerebroespinal, intra-articular, intrasnovial, y/o intratecal. La administración parenteral puede ser por inyección de bolos o infusión continua. Las composiciones farmacéuticas para inyección se pueden presentar en forma de dosificación por unidades, por ejemplo, en ampollas o envases multi-dosis, con agentes de conservación añadidos. Además, se ha desarrollado un número de procedimientos recientes de liberación de fármacos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son adecuadas para administración usando estos nuevos métodos: por ejemplo, Inject-easeTM, GenjectTM, plumas inyectoras tales como GenPenTM, y dispositivos sin agujas tales como MediJectoTM y BioJectorTM. La presente composición farmacéutica se puede adaptar también para métodos de administración aún por descubrir. Ver también Langer, 1990, Science, 249:1527-1533.

La composición farmacéutica puede formularse también como una preparación de depósito. Tales formulaciones de larga actuación se pueden administrar por implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Así por ejemplo, las formulaciones pueden modificarse con materiales adecuados poliméricos o hidrofóbicos. (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo como un sal poco soluble.

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

En otra realización la presente invención se dirige a un estuche o envase que contiene una composición farmacéutica acuosa de la invención. La concentración del polipéptido en la composición farmacéutica acuosa puede variar en un intervalo amplio, pero generalmente es dentro del intervalo de desde alrededor de 0,05 a alrededor de 20.000 microgramos por mililitro ($\mu\text{g/ml}$) de formulación acuosa. El estuche puede también estar acompañado por instrucciones de uso.

ES 2 311 094 T3

La invención se entenderá más completamente por referencia a los ejemplos siguientes. Los ejemplos no deben, sin embargo, construirse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

5 Ejemplo 1

Con el fin de determinar el mejor excipiente para impedir la agregación de un polipéptido que contiene el dominio Fc, se produjo TNFR:Fc y se probó para dispersión de luz de una muestra (Is) que contenía TNFR:Fc con varios excipientes tras incubación a 51°C +/- 1°C, y se comparó con la dispersión de luz de una muestra control (Ic) con TNFR:Fc solo almacenada a 2-8°C. La relación se midió como Is/Ic, y una relación de uno representa una línea de base teórica en donde no hay cambio en la dispersión de luz, es decir, agregación, del compuesto de prueba. Los diversos excipientes probados incluían ácido ascórbico al 5%, manitol al 5%, sacarosa al 10%, poli(vinilpirrolidona) (PVP-K15) al 1%, poli(etilenglicol) (PEG, Mw=1000) al 0,1%, etanol al 0,6%, glicina al 1,2%, L-arginina al 2%, Pluronic F68 al 0,01%, betaína al 1,6% y L-cisteína al 1,5%. Sorprendentemente, L-arginina fue el único inhibidor de agregación encontrado para mantener la relación Is/Ic por debajo de uno durante el periodo entero de prueba de 200 horas.

20 Ejemplo 2

TNFR:Fc producido e indicado como lotes A, B, C y D se evaluó frente a TNFR:Fc producido por un método diferente y que tenía mayor agregación inicial (lote 1) con relación a la estabilidad en una formulación líquida (fosfato 25 mM, L-arginina 25 mM, NaCl 98 mM, sacarosa al 1%, a pH 6,2) en jeringas o viales de vidrio a -70°C, -20°C, 2-8°C, 30°C, y 37°C. Las muestras se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), SEC desnaturalizada (dSEC), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), electroforesis en geles de poli(acrilamida) y dodecilsulfato sódico, y se analizaron respecto a enlace y bioactividad a diversos tiempos. La bioactividad se puede medir por cualquier número de ensayos que incluyen por SEC, dSEC, HIC, actividad enlazante y bioactividad, como se describe más adelante.

30 *Cromatografía de exclusión por Tamaños*

Se usó SEC para evaluar el nivel de especies de alto peso molecular (HMW) (agregados que se formaron) en la muestras durante el almacenamiento. Las especies de bajo peso molecular (LMW) se resuelven mejor por dSEC y esos datos se pueden encontrar en la próxima sección. La Figura 1 muestra los datos de SEC para las muestras almacenadas a 2-8°C y la Figura 2 muestra los datos de SEC para muestras almacenadas bajo condiciones aceleradas de 37°C.

Se recogieron también datos para muestras almacenadas a 30°C (dato no mostrados) y los niveles de especies de HMW fueron intermedios a los observados a 2-8°C y 37°C. Durante el almacenamiento a lo largo de 1 año a 2-8°C los niveles de agregados permanecieron estables o aumentaron menos de 0,6% en el peor caso para el lote A. No se observaron aumentos significativos durante el almacenamiento a 2-8°C. Bajo condiciones aceleradas durante el almacenamiento a 37°C, los niveles de agregados en el lote 1 aumentaron a 19% durante 12 meses y a 14% y 12% en el lote A y B, respectivamente. La pendiente de las líneas fue muy similar, mostrando que las moléculas se agregaron a la misma velocidad, y que las diferencias entre los lotes A-D y el lote 1 son debidas a los niveles iniciales de agregados, mayores en el lote 1 que en los lotes A-D. Para el lote B no hubo diferencias entre las muestras almacenadas en un vial a -70°C, en una jeringa a -70°C, en una jeringa a -20°C, o en una jeringa después de tratamiento térmico y almacenamiento a -20°C (datos no mostrados). Todos los valores estuvieron a menos del 0,4% del control vial a -70°C (y el valor a tiempo 0) tras 12 meses de almacenamiento.

50 *Cromatografía de Exclusión por Tamaños Desnaturalizada*

La determinación cuantitativa por SEC desnaturalizada (dSEC) de las especies de bajo peso molecular (LMW) se muestra en la Figura 3 para muestras almacenadas a 2-8°C, y la Figura 4 para muestras almacenadas a 37°C. Los lotes A-D y el lote 1 se analizaron por dSEC tras almacenamiento hasta 1 año a 2-8°C, pero los lotes C y D no se analizaron pasados 6 meses de almacenamiento bajo las condiciones aceleradas a 37°C. Durante el almacenamiento a 37°C, el lote 1 y los lotes A, B y C mostraron degradación similar, mientras que el lote D mostró mayor degradación durante el calentamiento que el lote 1 y los otros lotes. La similitud en los lotes A y B y el lote 1 se observó también durante almacenamiento a 30°C (datos no mostrados), con niveles de degradación intermedios a los observados a 2-8°C y 37°C. Para el lote B no hubo diferencia entre las muestras almacenadas en un vial a -70°C, en una jeringa a -70°C, en una jeringa a -20°C, o en una jeringa tras tratamiento térmico y almacenamiento a -20°C (datos no mostrados). Todos los valores después de 12 meses de almacenamiento a -70°C y -20°C estuvieron a menos del 0,7% unos de otros y del valor a tiempo 0.

Durante el almacenamiento a 30°C (datos no mostrados) el % de especies LMW determinado por dSEC para el lote A se acerca bien al del lote B, aunque ambos lotes muestran niveles de degradación ligeramente mayores que el lote 1 a esta temperatura. El lote D muestra niveles mayores de especies de LMW tanto a 2-8°C como a 37°C a cualquier tiempo, incluyendo el tiempo 0. Los productos de degradación en el lote D parecen ser de mayor tamaño que lo que se observa típicamente por análisis mediante dSEC de muestras desnaturalizadas de TNFR:Fc. Estas diferentes especies se observan tras almacenamiento a 2-8°C y 37°C.

ES 2 311 094 T3

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Se usó HIC para separar diversas especies relacionadas con TNFR:Fc. Se ha demostrado que el pico 1 (y un pico de elución previo indicado como pre-pico 1) consiste principalmente de especies de bajo peso molecular. El pico 2 incluye el dímero plegado intacto (activo). El pico 3 incluye material agregado y menos dímeros activos.

En la Figura 5 se han mostrado datos del pico 1 de HIC para muestras almacenadas a 2-8°C y la Figura 6 para muestras almacenadas a 37°C. Para todos los lotes excepto el lote D, los niveles de especies de LMW permanecen relativamente constantes (a menos de 1,2% de diferencia a lo largo de 12 meses) para muestras almacenadas a 2-8°C. Si se usa el valor promedio para las muestras de -70°C en lugar del valor a tiempo 0 para el lote A, las curvas para todos los lotes excepto el lote D se alinean bien. El lote D muestra más pico 1 que los otros lotes, corroborando los altos niveles de especies de LMW observados por dSEC. Tras someter al calor las muestras a 37°C hasta 1 año, el lote B y el lote 1 muestran aproximadamente 30% de pico 1 de HIC, mientras que el lote A muestra aproximadamente 45% del pico 1 de HIC. El lote D mostró 47% de pico 1 de HIC tras solamente 6 meses de sometimiento a 37°C.

Como se ha indicado anteriormente, el pico 2 de HIC representa las especies activas más deseadas. Las Figuras 7 y 8 muestran el % del pico 2 de HIC para muestras almacenadas a 2-8°C y 37°C, respectivamente. Aunque el lote 1 parte a un % inicial de pico 2 inferior, retiene el nivel de especies activas durante el almacenamiento a lo largo de 12 meses a 2-8°C. Los lotes A, B y C retienen también especies activas durante los 12 meses de almacenamiento refrigerado. Bajo condiciones aceleradas de 37°C, todos los lotes probados pierden pico 2 de HIC durante el almacenamiento.

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

Electroforesis en Geles de Poli(acrilamida)-Dodecilsulfato Sódico

Se realizó análisis SDS-PAGE de muestras almacenadas durante 12 meses a -70°C, -20°C, 2-8°C, 30°C, y 37°C. El lote A tuvo un aumento en las bandas asociadas a un fragmento de degradación de ~50 kD y ~34 kD tras almacenamiento a 2-8°C durante 1 año. A temperaturas elevadas se observó degradación importante, mostrando muchas bandas de bajo peso molecular intensidades mayores.

El lote 1 no mostró cambio alguno tras 1 año de almacenamiento a 2-8°C, pero mostró mayores fragmentos de degradación de ~50 kD y ~34 kD tras 1 año a 30 y 37°C. El lote B no mostró cambios algunos durante almacenamiento a lo largo de 12 meses a -70°C (vial o jeringa) o en jeringas a -20°C, con o sin tratamiento térmico para eliminar sobreenfriamiento. Sin embargo, tras 12 meses a 2-8°C mostraron mayor intensidad bandas correspondientes a fragmentos de degradación tanto de ~50 kD como ~34 kD. El almacenamiento a 30 o 37°C durante 1 año dio por resultado degradación, con muchas bandas de bajo peso molecular además de los fragmentos de degradación de ~50 kD y ~34 kDa discutidos anteriormente.

Los lotes C y D se analizaron tras almacenamiento durante 12 meses a -70°C y 2-8°C. El lote 1 y los lotes B, C y D se analizaron tras almacenamiento durante 12 meses a -70°C y 2-8°C y mostraron modelos similares de degradación como se han indicado anteriormente.

Enlace y Bioactividad

La Figura 11 muestra los datos de actividad enlazante derivados de un ELISA, para los lotes A-D y el lote 1 almacenados durante 6 y 12 meses a -70°C, 2-8°C, 30°C, y 37°C. Las barras de error sobre las muestras de -70°C indican +/-30%. Solamente se considerarán significativos los valores fuera de estas barras de error debido a variabilidad de ensayos. Los lotes A y B retenían la actividad enlazante completa tras 6 meses a 2-8°C y 30°C, pero a los 12 meses solamente las muestras almacenadas a 2-8°C mantenían la actividad enlazante íntegra. El lote 1 fue capaz de mantener la actividad íntegra hasta 12 meses tras almacenamiento a 2-8°C y 30°C, a pesar de mostrar niveles de LMW de 13,6% (por dSEC; datos no mostrados) y 8% de HMW (por SEC, datos no mostrados) tras 1 año a 30°C. Los lotes C y D también retuvieron la actividad enlazante íntegra tras 1 año de almacenamiento a 2-8°C, pese a mayores niveles de productos de degradación observados en el lote D por dSEC y HIC.

Un ejemplo de un bioensayo de TNFR:Fc es inhibir la respuesta negativa de crecimiento de una línea celular al TNF-alfa. La presencia de TNF-alfa inhibe el crecimiento celular mediante inducción de apoptosis. La presencia del receptor rhuTNF soluble biológicamente activo (TNFR:Fc) neutraliza específicamente el TNF-alfa de un modo dependiente de la dosis. Se añaden un patrón de referencia de TNFR, control, y muestras y se valoran en un formato de placa de microvaloración de 96 pozitos. Se añade a cada pozito una concentración conocida de células seguido por adición de TNF-alfa. Tras un período de incubación se separan las células no adherentes por lavado suave con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y las células restantes se tiñen. Tras un período de incubación se lee

ES 2 311 094 T3

cada pozito. Las unidades de cada pozito son directamente proporcionales a la actividad específica de TNFR. Los resultados del ensayo de bioactividad (Figura 12) corroboran los datos del ensayo enlazante.

Conclusiones

5

Los lotes B y C formulados en una formulación de fosfato líquida (25 mM de fosfato, 25 mM de L-arginina, 98 mM de NaCl, 1% de sacarosa, pH 6,2) mostraron ser tan estables como el lote 1 en la misma formulación durante 1 año a -70°C o 2-8°C. Los lotes A-D mostraron menos agregación que el lote 1, y fueron equivalentes en términos de degradación a especies de bajo peso molecular (menos que 4% de LMW por dSEC a los 12 meses). El lote 1 y los lotes A-D mostraron mayor degradación y agregación a temperaturas elevadas de 30 y 37°C, pero los lotes que actuaron igual que el lote 1 hasta 1 año a 2-8°C mostraron equivalencia al lote 1 durante sometimiento térmico a lo largo de 1 año. El lote D se mostró menos estable en el ensayo acelerado con altos niveles de productos de degradación de bajo peso molecular.

10

15

Los datos de las pruebas aceleradas de estabilidad a 30 y 37°C concuerdan con la estabilidad a largo plazo a 2-8°C, y por tanto proporcionan un método para acelerar las pruebas de estabilidad a largo plazo de un polipéptido formulado a bajas temperaturas sin requerir una evaluación de la estabilidad a largo plazo. Las muestras del lote B almacenadas congeladas en jeringas a -70°C y -20°C mostraron estabilidad similar a la de muestras almacenadas congeladas en un vial a -70°C, lo que apoya el uso de una realización de un jeringa pre-rellena almacenada congelada hasta su entrega al paciente.

20

Equivalentes y referencias

La presente invención no ha de limitarse en alcance por las realizaciones específicas descritas aquí, que están consideradas como simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y métodos y componentes funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. En efecto, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas aquí se harán evidentes para los expertos en la técnica desde la descripción anterior y los dibujos adjuntos. Tales modificaciones se consideran que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 311 094 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que es una formulación acuosa estable que comprende TNFR:Fc y un inhibidor de agregación, en donde el inhibidor de agregación es L-arginina.
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un tampón.
- 10 3. La composición de la reivindicación 2, en donde el tampón se selecciona del grupo consistente en fosfato sódico, histidina, fosfato potásico, citrato sódico o potásico, ácido maleico, acetato amónico, tris-(hidroximetil)-aminometano (tris), acetato y dietanolamina.
4. La composición de la reivindicación 3, en donde la L-arginina está presente en una concentración de desde 10 mM a 100 mM.
- 15 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, ó 4, que comprende además un modificador de tonicidad.
- 20 6. La composición de la reivindicación 5, en donde el modificador de tonicidad se selecciona del grupo consistente en arginina, cisteína, histidina, glicina, cloruro sódico, cloruro potásico, citrato sódico, sacarosa, glucosa y manitol.
7. La composición de la reivindicación 6, en donde el modificador de tonicidad es cloruro sódico.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, ó 4, que comprende además un excipiente.
- 25 9. La composición de la reivindicación 6, que comprende además un excipiente.
10. La composición de la reivindicación 7, que comprende además un excipiente.
- 30 11. Una composición de la reivindicación 8, en donde el excipiente se selecciona del grupo consistente en sacarosa, lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa, seroalbúmina de bovino (BSA), SA humana o HA recombinante, dextrano, PVA, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), poli(etilenimina), gelatina, poli(vinilpirrolidona) (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC), poli(etilenglicol), etilenglicol, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), prolina, L-serina, glutamato sódico, alanina, glicina, hidrocloreto de lisina, sarcosina, ácido gamma-aminobutírico, monolaurato de polioxietilen-sorbitán, monooleato de polioxietilen-sorbitán, SDS, polisorbato, copolímero de poli(oxietileno), fosfato potásico, acetato sódico, sulfato amónico, sulfato magnésico, sulfato sódico, N-óxido de trimetilamina, betaína, iones zinc, iones cobre, iones calcio, iones manganeso, iones magnesio, CHAPS, monolaurato de sacarosa, y 2-O-beta-manoglicerato.
- 35 12. La composición de la reivindicación 11, en donde el excipiente es sacarosa.
- 40 13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende TNFR:Fc, L-arginina, fosfato sódico, cloruro sódico y sacarosa, en donde TNFR:Fc está presente en una concentración de 10 mg/ml a 100 mg/ml.
- 45 14. La composición de la reivindicación 13, en donde la L-arginina está presente en una concentración de 10 mM a 75 mM.
15. La composición de la reivindicación 13, en donde el fosfato sódico está presente en una concentración de 5 mM a 100 mM.
- 50 16. La composición de la reivindicación 13, en donde el cloruro sódico está presente en una concentración de 5 mM a 200 mM.
17. La composición de la reivindicación 13, en donde la sacarosa es de 0,5% a 1,5%.
- 55 18. La composición de la reivindicación 13, en donde el pH es 5,5 a 7,8.
19. La composición de la reivindicación 13, que tiene 25 mg/ml de TNFR:Fc, L-arginina 25 mM, fosfato sódico 25 mM, cloruro sódico 98 mM, sacarosa al 1% a pH 6,2.
- 60 20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 13 ó 19, en donde la composición es líquida.
21. La composición de la reivindicación 20, en donde la composición se congela.
- 65 22. Un método para formular una composición que comprende combinar TNFR:Fc aislado con L-arginina.
23. El método de la reivindicación 22, que comprende además las etapas de combinar un tampón, un modificador de tonicidad, y un excipiente con la composición.

ES 2 311 094 T3

24. El método de la reivindicación 22 ó 23, en donde la composición es líquida.

25. Un estuche que comprende una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende TNFR:Fc y L-arginina.

5

26. El estuche de la reivindicación 25, en donde la composición es líquida.

27. El estuche de la reivindicación 25 ó 26, en donde la composición se almacena en una jeringa estéril pre-rellena.

10

28. El estuche de la reivindicación 27. en donde la jeringa se puede almacenar a -20°C a -70°C .

29. Una composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13 para usar en un método para tratar un mamífero con necesidad de ello que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición.

15

30. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde TNFR:Fc es etanercept.

20

31. La composición de la reivindicación 30 que comprende 25 a 50 mg de etanercept, L-arginina 10 mM a 100 mM, fosfato sódico 10 a 50 mM, 0,75% a 1,25% de sacarosa, NaCl 50 a 150 mM, a pH 6,0 a pH 7,0.

32. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en donde el TNFR:Fc es etanercept.

25

33. El método de la reivindicación 23, en donde el excipiente es un tensioactivo tal como monooleato de polioxietilen-sorbitán, monolaurato de polioxietilen-sorbitán, SDS, polisorbato, y copolímero de poli(oxietileno).

30

35

40

45

50

55

60

65

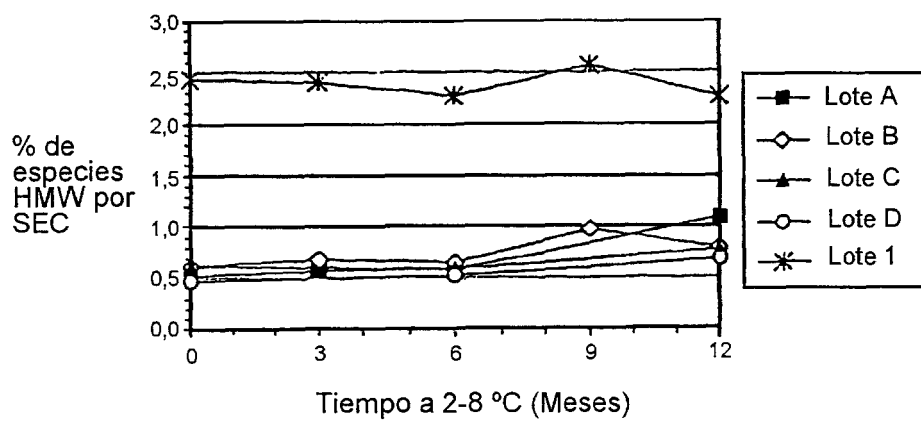


Figura 1

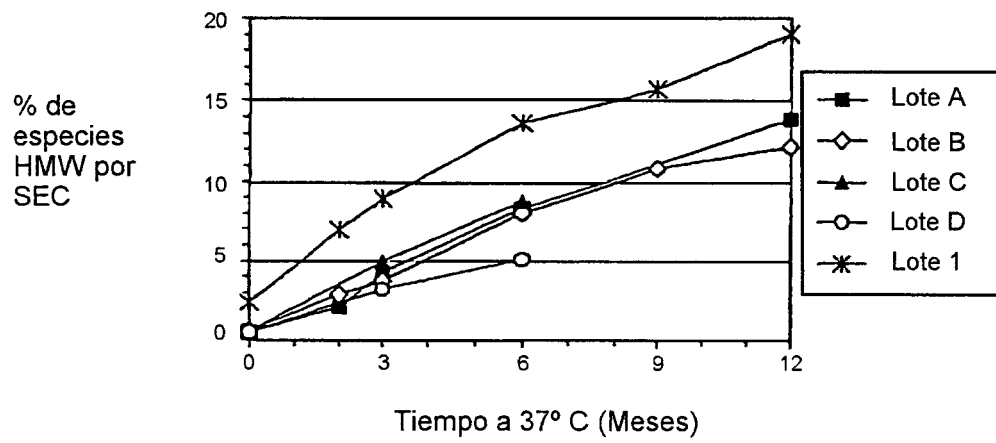


Figura 2

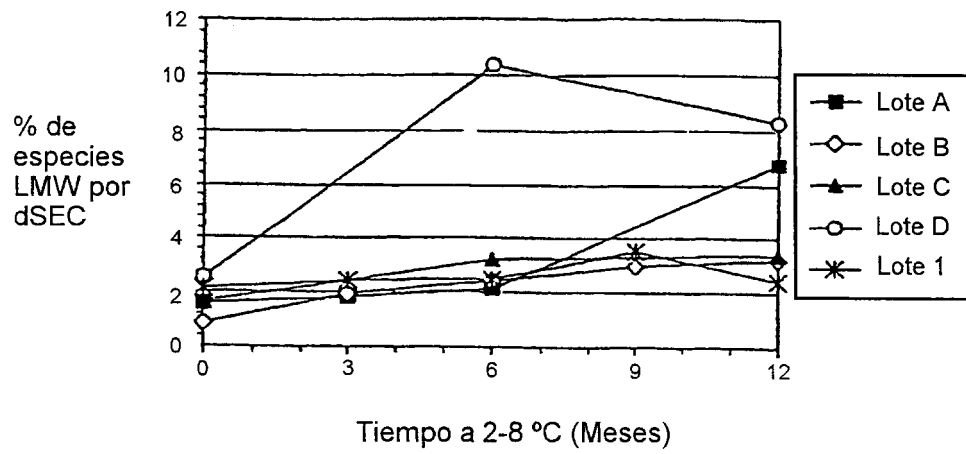


Figura 3

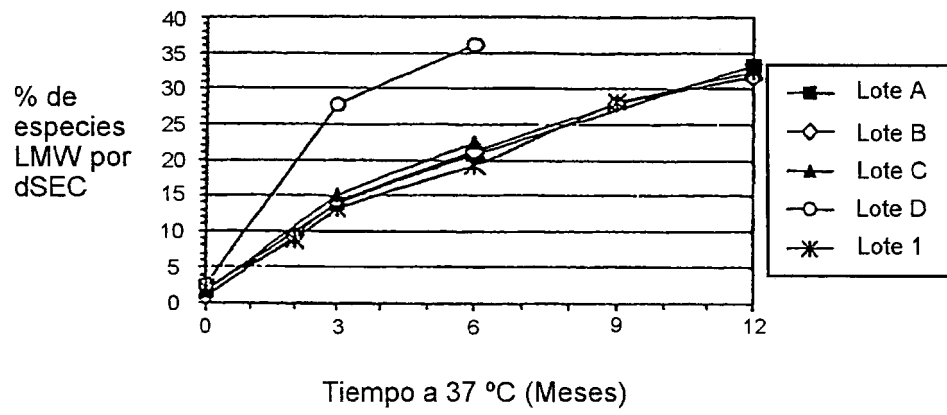


Figura 4

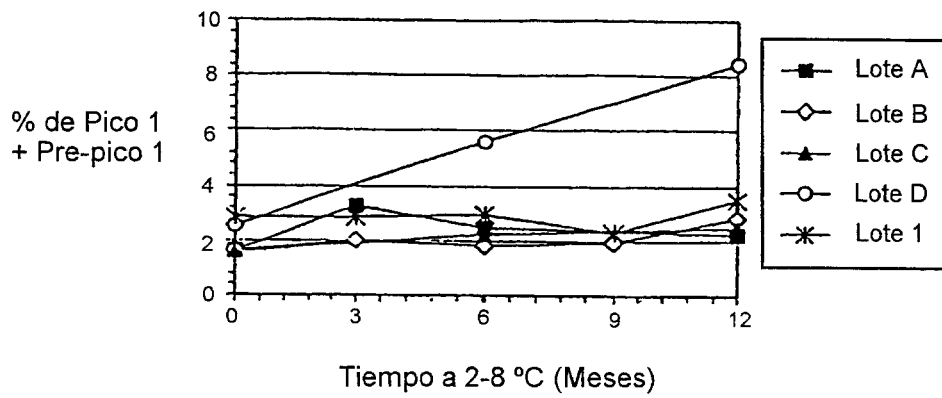


Figura 5

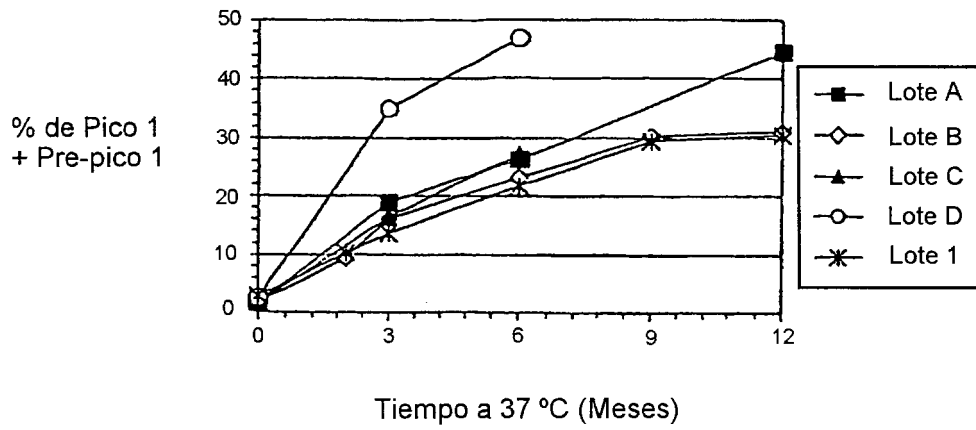


Figura 6

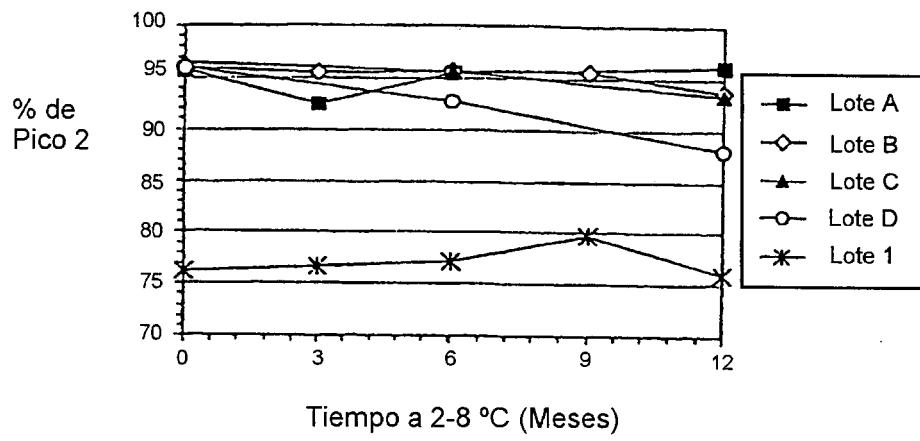


Figura 7

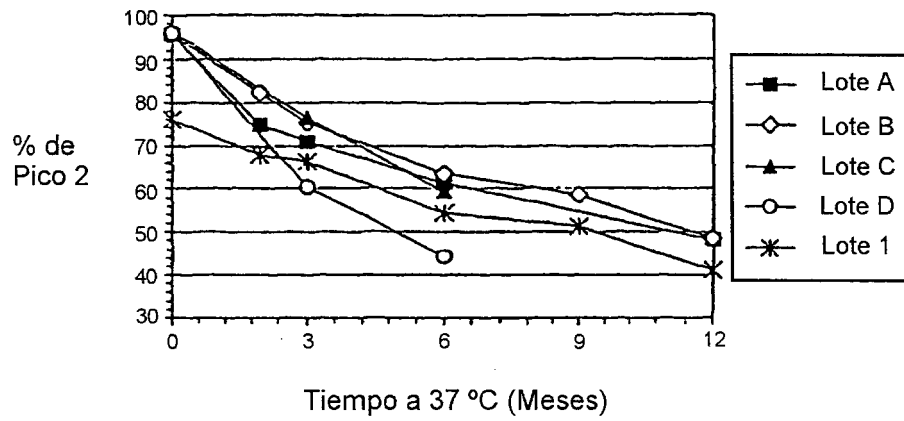


Figura 8

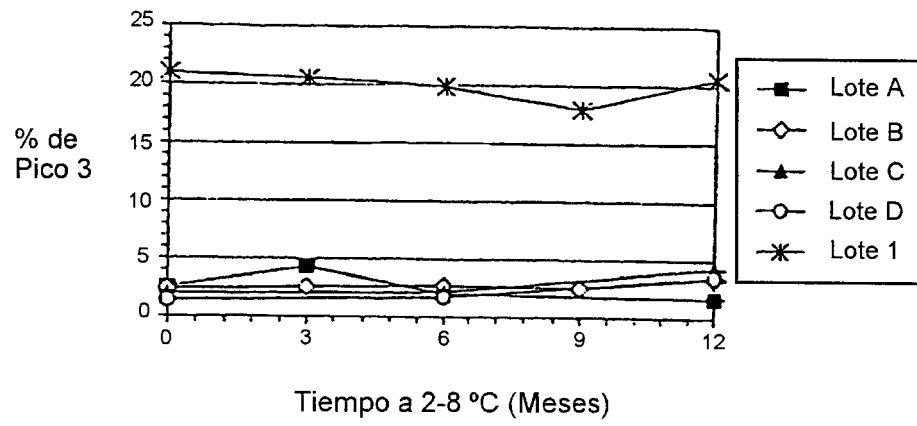


Figura 9

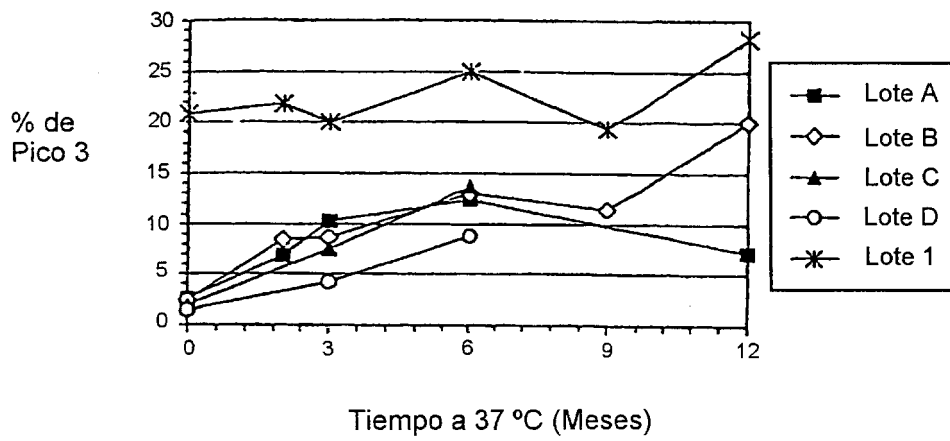


Figura 10

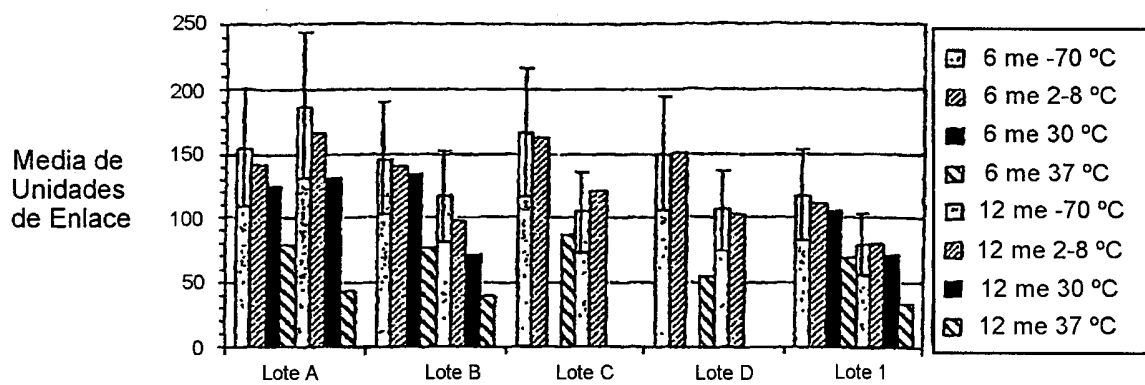


Figura 11

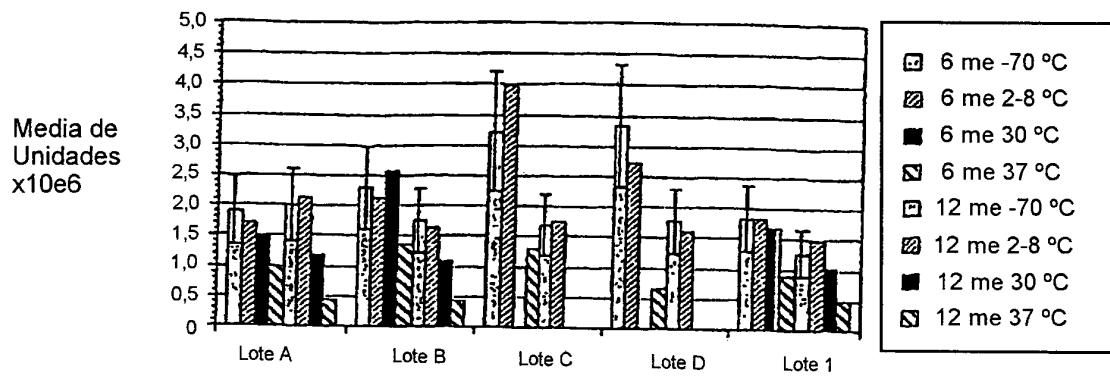


Figura 12