

5 **FORMULACIÓN FARMACÉUTICA LÍQUIDA ESTABLE DE ETANERCEPT, UN
BUFFER DE HISTIDINA O SUCCINATO, POLISORBATO 80 Y MANITOL**

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con el área Farmacéutica,
de manera particular con formulaciones farmacéuticas que
10 contienen proteínas recombinantes.

Esta invención se refiere a formulaciones líquidas estables
de Etanercept (TNFR:Fc), una proteína de fusión recombinante
compuesta del receptor del factor de necrosis tumoral humano
tipo 2 (TNFR) unido a la fracción cristalizable (Fc) de una
15 inmunoglobulina G humana subclase 1 (IgG1).

Las formulaciones descritas en esta solicitud contienen
ventajas fisicoquímicas en relación con las formulaciones
divulgadas en el estado de la técnica, más concretamente en
las formulaciones de referencia que contienen etanercept.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las propiedades físicas y químicas intrínsecas de una
proteína terapéutica son susceptibles de sufrir alteraciones
durante su biosíntesis, extracción, purificación, transporte
25 y vida de anaquel (Staub et al., 2011), o durante cualquier
etapa de su ciclo de vida si ésta es expuesta a condiciones
de estrés deliberado o no deliberado, como: cambios de

5 temperatura, procesos de congelamiento y descongelamiento, agitación, cambio de pH, entre otras (Chang y Hershenson, 2002). Debido a esto, una práctica para incrementar la tolerancia de una proteína que es utilizada como ingrediente farmacéutico activo (IFA) en un medicamento, consiste en
10 adicionar excipientes a la solución farmacéutica. Específicamente, estos excipientes tendrán como función mantener la solubilidad, estabilidad y actividad biológica de la proteína.

15 Los excipientes o agentes más importantes por considerar durante el desarrollo de una formulación farmacéutica líquida de acuerdo a Chang y Hershenson, (2002), son:

- una solución amortiguadora de pH, cuya función es mantener el pH de la formulación farmacéutica durante
20 la vigencia del producto;
- agentes modificadores o estabilizadores, cuya función es mantener la integridad estructural de la proteína terapéutica incluyendo la prevención y control de su agregación;
- 25 • agentes surfactantes, cuya función es prevenir la formación de partículas y adsorción de proteína en la superficie de su contenedor;

- 5 • agentes tonificantes, cuya función es otorgar la isotonicidad a la formulación de manera que sea apropiada para su administración en humanos.

Los excipientes antes mencionados deben ser compatibles con
10 las propiedades físicas y químicas de la proteína, de manera tal que pueda preservar su actividad biológica de acuerdo con su indicación terapéutica. Adicionalmente, dichos excipientes no deben ser tóxicos (Frokjaer y Otzen, 2005). Lo anterior constituye el sistema vehículo-proteína o
15 formulación líquida.

A este respecto, el uso de formulaciones líquidas tiene ventajas evidentes sobre formulaciones liofilizadas ya que la formulación líquida no requiere de rehidratación
20 (reconstitución del liofilizado con su diluyente) y está lista para utilizarse (Bye et al., 2014), de manera que se incrementa la exactitud de dosificación y se mejora el uso clínico en pacientes (Harris et al., 2004). Dichas preparaciones terapéuticas son adecuadas para administración
25 parenteral, ya sea por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, siempre que su estabilidad física y química, así como su actividad biológica pueda ser

5 demostrada. Ello incluye la inhibición de mecanismos de
agregación y degradación, disminución de la energía libre de
desnaturalización, modificación química y, particularmente
en preparaciones terapéuticas que contengan alta
concentración de proteína, como Etanercept, alteraciones en
10 la neutralización de su blanco terapéutico, el factor de
necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$).

Etanercept es una proteína de fusión (TNFR:Fc) compuesta del
receptor del factor de necrosis tumoral humano tipo 2 (TNFR)
unido a la fracción cristalizable (Fc) de una inmunoglobulina
15 G humana subclase 1 (IgG1); generada por tecnología del ADN
recombinante que cuenta con una masa molecular aproximada de
150 kDa.

Etanercept actúa como un inhibidor biológico del $\text{TNF}\alpha$ y es
utilizado como agente bioterapéutico para tratar
20 enfermedades autoinmunes en las cuales se presenta una
elevación patológica del $\text{TNF}\alpha$, como por ejemplo: artritis
reumatoide, artritis idiopática juvenil poliarticular,
artritis psoriásica, espondilitis anquilosante,
espondiloartritis axial, espondiloartritis anquilosante,
25 espondiloartritis axial no radiográfica, psoriasis en placas
y psoriasis pediátrica en placas (Scott, 2014), entre otras.

5 Existen varias formulaciones farmacéuticas líquidas que contienen Etanercept. Sin embargo, las formulaciones pueden tener una vida de anaquel y una estabilidad fisicoquímica reducidas debido a que dichas formulaciones contienen excipientes que no les permiten prolongar la estabilidad de
10 las mismas ni permiten aumentar el tiempo en el que las moléculas terapéuticas mantienen sus propiedades funcionales óptimas.

Existe entonces la necesidad de formulaciones líquidas nuevas que contengan Etanercept como principio activo en alta
15 concentración que reduzca la propensión a la formación impurezas y con estabilidad incrementada, mientras que se mantenga su identidad fisicoquímica y potencia biológica útil para administración parenteral.

20 Para cumplir este objetivo es necesario un profundo conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de la proteína en estudio y excipientes, así como de los potenciales efectos de su interacción. Además, se requiere de la disponibilidad y pericia en el uso de infraestructura analítica
25 especializada para la ejecución de los estudios.

5 Las nuevas formulaciones líquidas de Etanercept descritas en
la presente invención tiene ventajas evidentes frente a las
formulaciones descritas en el estado de la técnica y a
aquella que contiene etanercept, amortiguadores de pH
(fosfato), arginina, sacarosa y cloruro de sodio. Ésta última
10 formulación se encuentra en el mercado bajo el nombre de
Enbrel® (Patente Estadounidense US 8,828,947 y Patente
Mexicana MX 263192).

Entre las ventajas de las formulaciones descritas en la
15 presente solicitud se encuentran:

1. Uso de un menor número de excipientes que las
formulaciones descritas en el estado de la técnica con
resultados inesperados y ventajosos que nunca habían
sido diseñados ni utilizados.
- 20 2. Proporcionar un nivel de agregación y degradación
disminuido o comparable a la formulación líquida de
Enbrel®.
3. Proporcionar una termoestabilidad incrementada o
comparable a la formulación líquida de Enbrel®.
- 25 4. Mantener la identidad fisicoquímica de Etanercept.
5. Mantener la potencia biológica de Etanercept.

5 Las anteriores ventajas serán evidentes a la luz de las pruebas experimentales y los resultados mostrados a lo largo de la presente solicitud.

En relación con el estado de la técnica que divulga
10 formulaciones líquidas acuosas que contienen proteínas relacionadas a Etanercept tenemos que:

Como se citó anteriormente, la patente Estadounidense US 8,828,947 se refiere a una composición farmacéutica líquida
15 para una proteína TNFR:Fc. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de fosfato, arginina utilizado como agente inhibidor de la agregación, sacarosa y al cloruro de sodio como agente tonificante, y que en conjunto mantienen un pH de 6.2.

20

Existen solicitudes de patente sobre formulaciones líquidas de Etanercept o proteínas relacionadas como:

La solicitud de patente W02014043103 comprende una
25 formulación farmacéutica para Etanercept. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de fosfato; arginina, sacarosa y cloruro de sodio.

5

La solicitud de patente W02014011672 se refiere a una composición farmacéutica acuosa para Etanercept. Esta composición tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de fosfato, un agente estabilizador que
10 se selecciona del grupo de aminoácidos, iones metálicos, azúcares o polioles, polisorbato o poloxámero como agentes para reducir partículas subvisibles, y que en conjunto mantienen un pH en el intervalo de 6.3 a 6.5.

15 La solicitud de patente PCT/KR2012/004369 (W02012165917) divulga una formulación líquida para Etanercept. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de fosfato, un agente estabilizador que se selecciona del grupo de histidina, lisina o metionina y
20 cloruro de sodio utilizado como agente tonificante.

La solicitud de patente PCT/EP2012/057119 (W02012143418) describe una composición farmacéutica para Etanercept. Esta formulación tiene como componentes una solución
25 amortiguadora de pH de citrato; lisina o prolina, cloruro de sodio y sacarosa utilizados como agentes tonificantes, y que en conjunto mantienen un pH de 6.3.

5

La solicitud de patente PCT/US2012/044988 (W02013006454) se refiere a una composición para Etanercept. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de fosfato; sacarosa, cloruro de sodio, y que en conjunto
10 mantienen un pH en el intervalo de 6.0 a 7.0.

La solicitud de patente PCT/US2013/070248 (W02014078627) divulga una formulación farmacéutica líquida para Etanercept. Esta formulación tiene como componentes una
15 solución amortiguadora de pH de citrato o citrato-fosfato, histidina o ácido aspártico, sacarosa o trehalosa, cloruro de sodio, y que en conjunto mantienen un pH de 6.3.

La solicitud de patente PCT/KR2014/011540 (W02015080513)
20 describe una formulación líquida para proteínas de fusión TNFR:Fc. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de fosfato o citrato-fosfato, aminoácidos que se seleccionan del grupo de prolina, histidina o ácido glutámico, cloruro de sodio y sacarosa utilizados como
25 agentes tonificantes, y que conjunto mantienen un pH de 6.3.

5 La solicitud de patente PCT/US2007/061544 (W02007092772) revela una formulación líquida para proteínas. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de citrato; polisorbato, trehalosa, y que en conjunto mantienen un pH en el intervalo de 6.0 a 6.5.

10

La solicitud de patente PCT/US2009/000759 (W02009099641) se refiere a una composición estabilizada en una jeringa prellenada de copolímero de olefina cíclica para una proteína anti-TNF. La formulación contenida en la jeringa prellenada
15 tiene como componentes una solución amortiguadora de pH, polisorbato o poloxámero como agentes estabilizadores, y que conjunto mantienen un pH de 5.2.

La solicitud de patente PCT/IB2013/059612 (W02014064637)
20 divulga una composición farmacéutica para Etanercept. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de fosfato-citrato; sacarosa utilizado como agente estabilizador, cloruro de sodio utilizado como agente tonificante, un agente inhibidor de la agregación que
25 se selecciona del grupo de glicina, urea o 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

5 utilizado como agente quelante, y que en conjunto mantienen un pH en el intervalo de 5.0 a 7.0.

La solicitud de patente PCT/EP2014/058695 (W02014177548) describe una composición acuosa para Etanercept. Esta
10 formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de succinato o fosfato, cloruro de sodio, sacarosa, y que en conjunto mantienen un pH de 6.3.

La solicitud de patente PCT/IN2011/000313 (W02011141926)
15 revela una formulación farmacéutica para Etanercept. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de fosfato; ácido aspártico y lisina utilizados como agentes estabilizadores, sacarosa; cloruro de sodio utilizado como agente tonificante, EDTA utilizado
20 como agente quelante, polisorbato utilizado como agente surfactante, y que en conjunto mantienen un pH en el intervalo de 6.0 a 7.0.

La solicitud de patente PCT/US2008/071209 (W02009015345) se
25 refiere a una formulación farmacéutica para proteínas de fusión Fc dirigida a TNF. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH que se

5 selecciona del grupo de acetato, fosfato o histidina, un agente tonificante que se selecciona del grupo de arginina, cloruro de sodio, sorbitol, manitol, sacarosa, trehalosa o glicerol, polisorbato utilizado como agente surfactante, y que en conjunto mantienen un pH en el intervalo de 4.6 a 5.6.

10

La solicitud de patente PCT/KR2013/009474 (W02014084508) divulga una composición para una proteína de fusión. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de succinato, sal de amonio utilizado
15 como agente inhibidor de la agregación, sacarosa, lisina, y que en conjunto mantienen un pH en el intervalo de 5.5 a 6.5. Esta formulación está soportada a partir de la evidencia experimental proporcionada de diversos estudios de estabilidad física donde se evaluó específicamente la
20 generación de agregados después de la exposición de la formulación a diferentes condiciones de estrés. Dicha evaluación fue llevada a cabo por cromatografía de exclusión molecular en un instrumento de cromatografía de líquidos de alto desempeño (SE-HPLC, por sus siglas en inglés) utilizado
25 como único método indicativo de estabilidad.

5 La solicitud de patente CN104740609 describe una composición
farmacéutica para Etanercept. Esta formulación tiene como
componentes una solución amortiguadora de pH de fosfato,
sacarosa y arginina utilizados como agentes estabilizadores,
cloruro de sodio utilizado como agente tonificante, EDTA
10 utilizado como agente quelante y poloxámero utilizado como
agente surfactante, y que en conjunto mantienen un pH en el
intervalo de 6.0 a 7.0.

La solicitud de patente CN104740612 describe una formulación
15 farmacéutica para Etanercept. Esta formulación tiene como
componentes una solución amortiguadora de pH de fosfato,
ácido aspártico utilizado como agente inhibidor de la
agregación, sacarosa y arginina utilizados como agentes
estabilizadores, cloruro de sodio utilizado como agente
20 tonificante, EDTA utilizado como agente quelante, poloxámero
utilizado como agente surfactante, y que en conjunto
mantienen un pH en el intervalo de 6.0 a 7.0.

La solicitud de patente PCT/JP2014/076898 (W02015056613) se
25 refiere a una preparación acuosa para Etanercept. Esta
formulación tiene como componentes creatinina y macrogol
utilizados como agentes estabilizadores.

5

La solicitud de patente PCT/JP2014/054036 (W02014178216) divulga una formulación acuosa para Etanercept. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de ácido orgánico, histidina utilizada como agente estabilizador, cloruro de sodio utilizado como agente tonificante, sacarosa o glicina, y que en conjunto mantienen un pH en el intervalo de 5.6 a 6.4.

La solicitud de patente PCT/MX2016/000082 (W02017026881) describe una formulación acuosa para Etanercept. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de fosfato, arginina utilizado como agente inhibidor de la agregación, sacarosa, cloruro de sodio y manitol utilizados como agentes tonificantes.

20

Por otra parte, existen patentes sobre formulaciones líquidas para proteínas diferentes a Etanercept como:

La patente US 8,937,045 se refiere a la invención de una formulación farmacéutica líquida para Onercept (una proteína recombinante del receptor monomérico tipo 1 del TNF). Esta formulación tiene como componentes una solución

25

5 amortiguadora de pH de fosfato, cloruro de sodio utilizado
como agente tonificante, y que en conjunto mantienen un pH
de 6.5.

La patente US 8,465,739 se refiere a la invención de una
10 formulación farmacéutica acuosa para Daclizumab, un
anticuerpo monoclonal humanizado anti-interleucina-2 de una
masa molecular aproximada de 140 kDa utilizado para el
tratamiento de esclerosis múltiple. Esta formulación tiene
como componentes una solución amortiguadora de pH de
15 succinato; polisorbato, cloruro de sodio utilizado como
agente tonificante, y que en conjunto mantienen un pH de 6.0.

Como se puede observar, las publicaciones citadas
anteriormente divulgan diversas formulaciones líquidas
20 acuosas que contienen Etanercept o proteínas del mismo tipo,
sin embargo, las mismas no cuentan con las ventajas que
ofrecen las formulaciones descritas en la presente y que se
describen a continuación.

25 La invención de la presente solicitud considera una nueva
formulación líquida para Etanercept, una proteína de fusión
anti-TNF α altamente glicosilada de una masa molecular

5 aproximada de 150 kDa utilizado para el tratamiento de enfermedades como artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil poliarticular, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante y psoriasis en placa, entre otras. Específicamente, esta fórmula comprende a Etanercept en alta
10 concentración (20 a 100 mg/mL), una proteína de fusión recombinante TNFR:Fc dirigida contra el $\text{TNF}\alpha$, en presencia de una solución amortiguadora de pH de histidina o succinato en concentraciones de 10 a 50 mM, que mantienen un pH en el intervalo de 5.8 a 6.8, esta formulación contiene también,
15 0.05 a 0.50 % de polisorbato, 0 a 2 % de sacarosa o trehalosa, y manitol utilizado como agente tonificante (1 a 7% ó cbp 250 a 350 mOsm/kg). La formulación de la presente solicitud contiene diferencias en relación con formulaciones descritas en el estado de la técnica, las principales son: tiene una
20 menor cantidad de excipientes, el agente amortiguador es succinato o histidina, no se utiliza cloruro de sodio como tonificante y en su lugar se utiliza manitol, además, no se utilizan aminoácidos como agente inhibidor de la agregación (arginina) y se utiliza polisorbato como agente surfactante.
25 Adicionalmente, las formulaciones divulgadas en la presente no utilizan iones metálicos, aminoácidos o sus combinaciones

5 como agentes estabilizadores; y agentes quelantes u otros aditivos reportados por el estado de la técnica.

Las presentes formulaciones se encuentran soportadas en la evidencia experimental proporcionada a partir de diversos estudios de estabilidad física, identidad química y actividad
10 biológica donde se evaluaron propiedades como generación de agregados y degradación, estabilidad térmica, alteraciones de carga y potencia biológica después de la exposición de la formulación a diferentes condiciones de estrés.

Las ventajas de las formulaciones de la presente solicitud
15 consisten en el uso de un menor número de excipientes que las formulaciones descritas en el estado de la técnica y en una combinación nunca antes utilizada, de manera que se reduce la complejidad y costo de su fabricación, y se evita el uso de excipientes con poco o nulo historial de uso para
20 formulaciones de proteínas terapéuticas como creatinina, macrogol, entre otros. Además, presenta un porcentaje de impurezas disminuido y una termoestabilidad incrementada a la formulación líquida de Enbrel® mientras se mantiene la identidad fisicoquímica y potencia biológica de Etanercept.
25 Por último, esta formulación es útil para contener Etanercept en su uso comercial como agente bioterapéutico de administración parenteral para tratar enfermedades

5 autoinmunes en las cuales se presenta una elevación patológica del $\text{TNF}\alpha$.

Breve descripción de la invención

La presente invención describe nuevas formulaciones líquidas
10 para Etanercept, una proteína de fusión anti- $\text{TNF}\alpha$. Específicamente, esta invención comprende formulaciones líquida para Etanercept, una proteína de fusión recombinante TNFR:Fc dirigida contra el $\text{TNF}\alpha$ en alta concentración (20 a 100 mg/mL), en presencia de una solución amortiguadora de pH
15 de histidina o succinato de 10 a 50 mM, que mantienen un pH en el intervalo de 5.8 a 6.8, adicionadas con 0.05 a 0.50 % de polisorbato, 0 a 2 % de sacarosa o trehalosa, y manitol utilizado como agente tonificante (1 a 7% ó cbp 250 a 350 mOsm/kg). Esta formulación hace uso de un menor número de
20 excipientes que las formulaciones descritas en el estado de la técnica y en una combinación nunca antes utilizada. Además, presenta un porcentaje de impurezas disminuido y una termoestabilidad incrementada en relación con formulaciones del estado de la técnica como por ejemplo la formulación
25 líquida de Enbrel® mientras se mantiene la identidad fisicoquímica y potencia biológica de Etanercept. Por último, esta formulación es útil para contener Etanercept en su uso

5 comercial como agente bioterapéutico de administración parenteral para tratar enfermedades autoinmunes en las cuales se presenta una elevación patológica del $\text{TNF}\alpha$.

Esta formulación es estable por al menos 12 meses a una
10 temperatura de 5 ± 3 °C y en condiciones de estabilidad acelerada la formulación es estable por al menos 3 meses a una temperatura de 25 ± 2 °C.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

15 A fin de que se pueda entender más fácilmente la presente invención, se definen algunos términos.

“Etanercept” se refiere a una proteína de fusión recombinante compuesta de la región extracelular soluble de unión a
20 antígeno del receptor TNF humano unido a la región Fc de una IgG1. El componente Fc contiene los dominios CH2 y CH3, así como la región bisagra, pero no el dominio CH1 de IgG1. Esta proteína de fusión se obtiene de un sistema de expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero,
25 específicamente, a través de un cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en ingles). Etanercept tiene un número de registro CAS (Chemical Abstracts Service,

5 por sus siglas en inglés) 185243-69-0. Etanercept se comercializó por primera vez como medicamento bajo el nombre de Enbrel®.

Una “formulación líquida” se refiere a una solución acuosa
10 que contiene un agente terapéutico que permite que la actividad biológica de un IFA, como Etanercept, sea efectiva.

La “formulación líquida de Enbrel®” se refiere a la formulación líquida de referencia para Etanercept que
15 contiene: fosfato de sodio 25 mM, sacarosa 1%, L-arginina clorhidrato 25 mM y cloruro de sodio 100 mM, a pH 6.3 y cbp de agua grado inyectable.

Los “excipientes” se refieren a compuestos inertes y no
20 tóxicos que pueden ser administrados al sujeto para proporcionar una dosis efectiva del IFA. Estos compuestos son adicionados a la preparación acuosa para mantener la estabilidad física, química y actividad biológica del IFA, así como para otorgar la isotonicidad adecuada para
25 administración parenteral.

- 5 Una "solución amortiguadora de pH" se refiere a una solución que es capaz de tolerar los cambios de pH manteniéndole en un intervalo aceptable a través de la acción de sus componentes ácido-base.
- 10 Una formulación "estable" es aquella que al contener un IFA tiene la capacidad de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en términos de estabilidad física, identidad química y potencia biológica, durante su período de caducidad o durante su exposición a
- 15 condiciones de estrés como, por ejemplo: estrés térmico, estrés mecánico, estrés por ciclos de congelación-descongelación, entre otros. Dicha estabilidad puede ser demostrada por métodos analíticos indicativos de estabilidad como, por ejemplo: cromatografía de exclusión molecular en
- 20 un instrumento de cromatografía de líquidos de ultra alto desempeño (SE-UHPLC o SEC, por sus siglas en inglés), fluorometría diferencial de barrido (DSF, por sus siglas en inglés), isoelectroenfoque capilar (cIEF, por sus siglas en inglés), bioensayo de inhibición de apoptosis, entre otros.

25

El IFA "retiene su estabilidad física" en una formulación líquida si no muestra sustancialmente signos de precipitación

5 determinados por inspección visual, o de agregación o degradación determinados por SEC, o cambios en la temperatura de transición (T_m) determinados por DSF.

El IFA “retiene su identidad fisicoquímica” en una
10 formulación líquida si no muestra sustancialmente signos de alteración de carga determinados por CIEF.

El IFA “retiene su potencia biológica” en una formulación líquida si no muestra sustancialmente signos de alteración
15 de su actividad biológica determinada por bioensayo de inhibición de la actividad apoptótica del $TNF\alpha$ en células de mamífero.

Un agente “surfactante” se refiere a un compuesto que es
20 capaz de disminuir la tensión superficial de una formulación líquida de manera que previene la formación de partículas y la adsorción de IFA en la superficie de su contenedor.

Un agente “estabilizador” o “modificador” se refiere a
25 compuestos, como azúcares o aminoácidos, que son capaces de prevenir o controlar la agregación del IFA.

5 Un "agente de tonicidad" es un compuesto inerte que hace isotónica a la formulación y una formulación líquida es isotónica si tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas por lo general tienen una presión osmótica aproximada de 250 a 350
10 mOsm.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra un acercamiento a los cromatogramas tipo obtenidos por SEC para la determinación de la estabilidad
15 física de Etanercept en las formulaciones líquidas candidato. En esta figura se pueden distinguir las poblaciones correspondientes a agregados, formas truncas e isoforma principal de Etanercept en las formulaciones candidato basadas en sistema Tris, histidina y succinato al termino de
20 14 días de un estudio de estrés térmico a 40 °C. Como control se utilizó la formulación líquida de Enbrel®.

La figura 2 muestra una representación gráfica de las T_m obtenidas por DSF para la determinación de la estabilidad
25 física de Etanercept en las formulaciones líquidas candidato. En esta figura se pueden distinguir las diferentes T_m de las formulaciones candidato basadas en sistema histidina (H1 -

5 H6) y succinato (S1 - S8) adicionadas con polisorbato o poloxámero al termino de 14 días de un estudio de estrés térmico a 40 °C. La amplitud de los círculos corresponde al error estándar. Como control se utilizó la formulación líquida de Enbrel®.

10

La figura 3 muestra los electroferogramas obtenidos por CIEF para la determinación de la estabilidad química de Etanercept en las formulaciones líquidas candidato. En esta figura se muestra la heterogeneidad de carga característica de
15 Etanercept, así como de las formulaciones candidato basadas en sistema histidina y succinato. Los picos a los extremos corresponden a los marcadores de punto isoeléctrico de 4.1 y 7.0.

20 La figura 4 muestra curvas dosis-respuesta obtenidas por bioensayo de inhibición de la actividad apoptótica del $\text{TNF}\alpha$ en células de mamífero para la determinación de la potencia biológica relativa de Etanercept en la fórmula líquida seleccionada. En esta figura se puede distinguir el ajuste
25 de las curvas dosis-respuesta al modelo de cuatro parámetros (asíntota inferior, pendiente, punto de inflexión y asíntota superior) del cual se deriva la concentración efectiva media

5 y potencia biológica. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Como control se utilizó la formula liquida de Enbrel®.

EJEMPLOS

10 Ejemplos prácticos de las incorporaciones de la presente invención se ilustran a continuación, en el entendimiento de que cualquier persona hábil en el campo de formulaciones farmacéuticas puede hacer modificaciones o adiciones a lo que se ilustra dentro del alcance de la presente invención.

15

De manera independiente, los excipientes utilizados han demostrado ser adecuados para formulaciones líquidas de proteínas recombinantes, en especial anticuerpos monoclonales o proteínas de fusión y, en particular, útiles para estabilizar proteínas terapéuticas de aplicación parenteral.

20

Con el fin de identificar las propiedades de estabilidad de una proteína en una determinada formulación y en un periodo de tiempo corto, ésta es expuesta a condiciones de estrés acelerado. Dichas condiciones son más agresivas de las que se podría exponer a la proteína en condiciones normales de

25

5 almacenamiento (Chang y Hershenson, 2002). También, permite anticipar los efectos de condiciones no esperadas durante el manejo, distribución y almacenaje. Las condiciones de estrés acelerado incluyen, pero no se limitan a la exposición de la proteína a: temperaturas fuera del intervalo recomendado,
10 múltiples ciclos de congelación-descongelación y agitación. Tomando en cuenta lo antes mencionado y con el objetivo de identificar aquellas nuevas formulaciones que proporcionan estabilidad física incrementada mientras que mantienen la identidad fisicoquímica de Etanercept se llevó a cabo un
15 estudio exploratorio de las formulaciones candidato detalladas en la tabla 1:

- Formulaciones T1 - T6: formulaciones 1 a 6 basadas en sistema de amortiguamiento de Tris.
- Formulaciones H1 - H6: formulaciones 1 a 6 basadas en
20 sistema de amortiguamiento de histidina.
- Formulaciones S1 - S9: formulaciones 1 a 9 basadas en sistema de amortiguamiento de succinato.

Dichas formulaciones fueron sometidas a estrés térmico a 40 °C con toma de muestras a 0, 7 y 14 días. Como control
25 (muestra con clave "C" en la tabla 1) se utilizó la formulación líquida de Enbrel® que contiene: fosfato de sodio 25 mM, sacarosa 1 %, L-arginina clorhidrato 25 mM y cloruro

5 de sodio 100 mM, a pH 6.3. Para este estudio se utilizó Etanercept en una concentración de 50 mg/mL, obtenido a través de un cultivo de células CHO.

Los productos formulados, luego de ser sometidos a estrés,
10 fueron evaluados por varias metodologías analíticas, incluyendo: SEC, DSF y cIEF. Estas técnicas permitieron evaluar el porcentaje de pureza, la T_m y heterogeneidad de carga, respectivamente. SEC fue llevado a cabo en un instrumento UHPLC (modelo Acquity clase H) equipado con un
15 detector UV y una columna BEH 200 A, 4.6 x 300 mm (Waters Corp.). DSF fue llevado a cabo en un instrumento termociclador (modelo 7500) siguiendo el procedimiento estándar recomendado por el fabricante (Applied Biosystems). cIEF fue llevado a cabo en un instrumento de electroforesis
20 capilar (modelo ProteomeLab PA800 plus) equipado con un detector UV y un capilar con recubrimiento hidrofílico, siguiendo el procedimiento estándar recomendado por el fabricante (Beckman Coulter Inc.).

25 **Tabla 1.** Concentración y características de excipientes utilizados en las formulaciones líquidas de Etanercept de la presente invención.

Clave	Solución amortiguadora de pH	Conc. (mM)	pH	Surfactante	Conc. (%)	Estabilizador	Conc.	Tonificante
T1 – T6	Tris	10	7.4	Polisorbato 80 o Poloxámero 188	0.10	Sacarosa o Trehalosa	0 – 2%	Manitol 1 a 7% ó cbp 250 – 350 mOsm/Kg
H1 – H6	Histidina	10	6.3	Polisorbato 80 o Poloxámero 188	0.10	Sacarosa o Trehalosa	0 – 2%	
S1 – S9	Succinato	20	6.3	Polisorbato 80 o Poloxámero 188	0.10	Sacarosa o Trehalosa Arginina	0 – 2% 25 mM	
C	Fosfatos	25	6.3	–	–	Arginina Sacarosa	25 mM 1%	

5 Conc.: concentración

Como criterios de aceptación, se consideró lo siguiente:

- Una diferencia no mayor a 5 % en el porcentaje de pureza respecto al tiempo inicial o a la formulación líquida de Enbrel®.
- Una diferencia no mayor a 2 °C en la T_m respecto al tiempo inicial o a la formulación líquida de Enbrel®.
- Perfil electroforético corresponde cualitativamente con el del tiempo inicial o a la formulación líquida de Enbrel®.
- Menor número de excipientes.

En la tabla 2 se muestran los resultados de un experimento que evalúa el efecto del estrés térmico a 0, 7 y 14 días

5 sobre el porcentaje de agregados de Etanercept. Debido a que la concentración de Etanercept es alta, existe posibilidad de agregación proteica. Éste fenómeno puede generar pérdida de actividad y reacciones inmunogénicas. Como tendencia general se observó un incremento en el porcentaje de
10 agregados conforme aumentaron los días de estrés, con la consecuente disminución porcentual de la forma principal de Etanercept. Específicamente, las formulaciones líquidas candidato basadas en sistema Tris presentaron un porcentaje de agregados de hasta 20 % al termino de 14 días de estrés.
15 Por otro lado, las formulaciones con base en sistemas de histidina y succinato presentaron un porcentaje de agregados menor a 7 % que es similar al de la formulación de Enbrel® basada en sistema de fosfato (figura 1). Los resultados de este experimento indicaron que un valor de pH de 6.3 es
20 apropiado para minimizar la agregación de Etanercept.

En la tabla 2 se muestran los resultados de un experimento que evalúa el efecto del estrés térmico a 0 y 14 días sobre la T_m de Etanercept. La T_m de una proteína es una medida de
25 su estabilidad estructural en solución, otorgando información de los cambios en la conformación de la proteína inducidos por calor. A mayor T_m una mayor temperatura será

5 requerida para desestabilizar la estructura nativa de la
proteína y viceversa. Para esta prueba no fueron consideradas
las formulaciones basadas en el sistema Tris debido al
resultado no satisfactorio obtenido por SEC (ver tabla 2 y
figura 1). Como se puede observar, las formulaciones líquidas
10 candidato basadas en sistemas de histidina y succinato, con
y sin sacarosa o trehalosa adicionadas con polisorbato
presentaron una mayor T_m que aquellas formulaciones con y
sin sacarosa, trehalosa o arginina adicionadas con
poloxámero, y de la formulación de Enbrel® al término de 14
15 días de estrés (figura 2). Los resultados de este experimento
indicaron que una mayor temperatura es requerida para
desestabilizar la estructura nativa de Etanercept en las
formulaciones que contienen polisorbato utilizado como
surfactante, independientemente de la solución amortiguadora
20 de pH utilizada (sistema de histidina o succinato).

En la tabla 2 y figura 3 se muestran los resultados de un
experimento que evalúa el efecto del estrés térmico a 14 días
sobre la heterogeneidad de carga de Etanercept. Las variantes
25 de carga son efecto de modificaciones como deamidación,
oxidación, isomerización, glicosilación, entre otras. Los
perfiles electroforéticos no presentaron diferencia entre

5 las formulaciones líquidas candidato basadas en sistema Tris, histidina y succinato respecto al de la formulación líquida de Enbrel®. En conclusión, la identidad fisicoquímica de Etanercept en todas las fórmulas evaluadas pudo ser conservada (figura 3).

10

Los resultados experimentales mostraron que las formulaciones líquidas candidato basadas en sistemas de histidina y succinato permiten mantener, e incluso incrementar, la estabilidad física de Etanercept mientras se
15 mantiene su identidad fisicoquímica, cuando se utilizan en combinación con polisorbato, manitol y en presencia o ausencia de sacarosa o trehalosa, a un pH de 6.3.

Tabla 2. Resultados del estudio exploratorio para formulación
20 líquida de Etanercept.

Clave	Tiempo (d)	Agregados (%)	T _m (°C)	Perfil electroforético
T1 – T6	0	1.22 – 1.83	ND	ND
	7	4.56 – 5.90	ND	
	14	11.94 – 20.04	ND	
H1 – H6	0	0.80 – 1.11	63.71 – 67.02	Corresponde cualitativamente
	7	2.00 – 3.37	ND	
	14	4.81 – 6.63	63.53 – 66.20	
S1 – S9	0	0.98 – 1.24	64.41 – 67.02	
	7	2.43 – 2.96	ND	
	14	4.82 – 6.55	63.15 – 66.30	
C	0	ND	65.45	Característico
	7	2.43	ND	
	14	5.65	64.60	

ND: no determinado

5

Optimización de la formulación

Las formulaciones líquidas candidato con resultados satisfactorios del estudio exploratorio fueron sometidas a un estudio de optimización de intervalos de operación para su uso en un proceso de manufactura. Dichas formulaciones fueron las basadas en sistema histidina o succinato en combinación con polisorbato, manitol y en ausencia de sacarosa o trehalosa. Debido a que un criterio de aceptación es hacer uso de un menor número de excipientes y de acuerdo con los resultados del estudio exploratorio, para este estudio no fueron consideradas formulaciones adicionadas con sacarosa o trehalosa.

Las formulaciones utilizadas en el estudio de optimización se detallan en la tabla 3:

- Formulaciones H1 – H13: formulaciones 1 a 13 basadas en sistema de histidina.
- Formulaciones S1 – S13: formulaciones 1 a 13 basadas en sistema de succinato.

Dichas formulaciones fueron sometidas a estrés térmico a 40 °C con toma de muestras a 3, 7, 14 y 21 días; estrés mecánico por agitación a 600 rpm con toma de muestras a 7 y 21 días; y estrés por ciclos de congelación-descongelación con toma

5 de muestras al término de 5 y 10 ciclos. Como control (muestra con clave "C" en la tabla 1) se utilizó la formulación líquida de Enbrel®.

Los productos formulados, luego de ser sometidos a estrés,
 10 fueron evaluados por varias metodologías analíticas, incluyendo: SEC, DSF y potencia biológica determinada por bioensayo de inhibición de la actividad apoptótica del $\text{TNF}\alpha$ en células de mamífero. El bioensayo se basa en la capacidad de Etanercept para evitar la interacción de $\text{TNF}\alpha$ con los
 15 receptores TNF presentes en la superficie de una línea celular de monocitos humanos (U937). Estas técnicas permitieron evaluar el porcentaje de pureza, la T_m y potencia biológica, respectivamente.

20 **Tabla 3.** Concentración y características de excipientes utilizados en el estudio de optimización para formulación líquida de Etanercept.

Clave	Solución amortiguadora de pH	Conc. (mM)	pH	Polisorbato 80 (%)	Tonificante
H1 – H13	Histidina	10 – 30	5.8	0.05 – 0.15	Manitol cbp
S1 – S13	Succinato		– 6.8		1 a 7% ó 250 – 350 mOsm/Kg

Conc.: concentración

5 Como criterios de aceptación, se consideró lo siguiente:

- Una diferencia no mayor a 5 % en el porcentaje de pureza respecto al tiempo inicial o a la formulación líquida de Enbrel®.
- Una diferencia no mayor a 2 °C en la T_m respecto al
10 tiempo inicial o a la formulación líquida de Enbrel®.
- La potencia biológica de Etanercept se encuentra en un intervalo de 80 a 125 % respecto a la formulación líquida de Enbrel®.
- Menor número de excipientes.

15

En la tabla 4 se muestran los resultados de un experimento que evalúa el efecto del estrés térmico a 3, 7, 14 y 21 días sobre el porcentaje de agregados de Etanercept en las fórmulas líquidas seleccionadas. Como tendencia general se
20 observó un incremento en el porcentaje de agregados conforme aumentaron los días de estrés, con la consecuente disminución porcentual de la forma principal de Etanercept. Asimismo, fueron calculadas las cinéticas de agregación (% agregados/tiempo (días)) de Etanercept en las fórmulas
25 líquidas seleccionadas y la formulación líquida de Enbrel®. Como se puede observar, las fórmulas seleccionadas presentan una cinética de agregación retardada o similar respecto al

5 de la fórmula líquida de Enbrel®. Además, presentaron una
diferencia no mayor a 5 % en el porcentaje de pureza. Por
otro lado, las formulaciones basadas en sistemas de histidina
y succinato presentaron una T_m similar entre ellas a 21 días
y, en ambos casos, los valores máximos fueron superiores a
10 la T_m de la formulación líquida de Enbrel®.

Tabla 4. Resultados del estudio de optimización de intervalos
de operación de excipientes para formulación líquida de
Etanercept. Estrés térmico.

Clave	Tiempo (d)	Agregados (%)	Velocidad de agregación (% agregados / tiempo (días))	T _m (°C)
H1 – H13	3	0.14 – 3.03	0.07 – 0.46	ND
	7	0.28 – 5.27		ND
	14	1.13 – 8.69		ND
	21	1.40 – 11.32		55.56 – 67.55
S1 –S13	3	2.02 – 3.45	0.00 – 0.44	ND
	7	2.56 – 4.59		ND
	14	3.82 – 9.47		ND
	21	0.10 – 15.23		56.96 – 67.30
C	3	2.46 – 2.50	0.25 – 0.30	ND
	7	3.00 – 3.14		ND
	14	5.80 – 6.07		ND
	21	6.46 – 7.66		67.06 – 67.28

15 ND: no determinado

En la tabla 5 se muestran los resultados de un experimento
que evalúa el efecto del estrés mecánico a 7 y 21 días sobre
el porcentaje de agregados de Etanercept en las fórmulas

5 líquidas seleccionadas. A diferencial del estrés térmico, el
 estrés mecánico tuvo menor impacto en la generación de
 agregados. Como tendencia general se observó un mantenimiento
 en el porcentaje de agregados conforme aumentaron los días
 de estrés con valores comparables entre las fórmulas
 10 candidato y la formulación líquida de Enbrel®.

Tabla 5. Resultados del estudio de optimización de intervalos
 de operación de excipientes para formulación líquida de
 Etanercept. Estrés mecánico.

Clave	Tiempo (d)	Agregados (%)
H1 – H13	7	0.04 – 2.92
	21	0.02 – 2.01
S1 – S13	7	0.49 – 2.58
	21	0.26 – 2.47
C	7	1.65 – 1.71
	21	1.67 – 1.71

15

En la tabla 6 se muestran los resultados de un experimento
 que evalúa el efecto del estrés por ciclos congelación-
 descongelación sobre el porcentaje de agregados de Etanercept
 en las fórmulas líquidas seleccionadas. De manera similar al
 20 estrés mecánico, el estrés por ciclos congelación-
 descongelación tuvo menor impacto en la generación de
 agregados. Como tendencia general se observó un incremento

5 en el porcentaje de agregados conforme aumentaron los días de estrés, con la consecuente disminución porcentual de la forma principal de Etanercept. Los valores fueron comparables entre las fórmulas candidato y la formulación líquida de Enbrel®.

10

En la figura 4 se muestran los resultados de un experimento que evalúa la potencia biológica de Etanercept en las fórmulas líquidas seleccionadas. La potencia de Etanercept determinada por bioensayo de inhibición de la actividad
15 apoptótica de $\text{TNF}\alpha$ cuando interacciona con los receptores TNFR presentes en la superficie de células de mamífero permite conocer la capacidad de Etanercept para ejercer su mecanismo principal de acción en el reconocimiento de su blanco terapéutico. Las formulaciones basadas en sistema de
20 histidina y succinato presentaron una potencia relativa de Etanercept en el intervalo de 80 - 125 % respecto a la formulación líquida de Enbrel®. En conclusión, se confirmó que Etanercept conserva su actividad e identidad biológicas en las fórmulas candidato.

25

- 5 **Tabla 6.** Resultados del estudio de optimización de intervalos de operación de excipientes para formulación líquida de Etanercept. Estrés por ciclos de congelación-descongelación.

Clave	Ciclos	Agregados (%)
H1 – H13	5	0.29 – 2.43
	10	0.36 – 2.45
S1 – S13	5	1.13 – 2.68
	10	1.36 – 3.07
C	5	1.61 – 1.67
	10	1.64 – 1.66

En conclusión, los resultados experimentales mostraron que las formulaciones líquidas basadas en el sistema de histidina y succinato cuando se utilizan en combinación con polisorbato en un intervalo de pH de 5.8 a 6.8, presentan un porcentaje de impurezas disminuido y una termoestabilidad incrementada en comparación a la formulación líquida de Enbrel®. Esto último se puede representar en la figura 2 en la que se puede observar que las formulaciones de los sistemas de histidina y succinato soportan temperaturas de desnaturalización mayores que la formulación líquida de Enbrel®, dando ventajas evidentes a las formulaciones de histidina y succinato. En comparación se puede ver que los sistemas que contienen

5 poloxámero soportan menores temperaturas de
desnaturalización.

Dichas formulaciones logran mantener la identidad
fisicoquímica y potencia biológica de Etanercept mientras se
hace uso de un menor número de excipientes que las
10 formulaciones descritas en el estado de la técnica y en una
combinación nunca antes utilizada.

5

REFERENCIAS

Scott L. J. (2014). Etanercept: a review of its use in autoimmune inflammatory diseases. *Drugs*. 74(12), 1379-1410.

10 Staub A., Guilleme D., Schappler J., Veuthey J., Rudaz S. (2011). Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 55(4), 810-822.

15 Frokjaer, S., Otzen, D.E. (2005). Protein drug stability: a formulation challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*. 4(4), 298-306.

20 Bye, J. W., Platts, L., Falconer, R. J. (2014). Biopharmaceutical liquid formulation: a review of the science of protein stability and solubility in aqueous environments. *Biotechnology letters*. 36(5), 869-875.

25 Harris, R. J., Shire, S. J., Winter, C. (2004). Commercial manufacturing scale formulation and analytical characterization of therapeutic recombinant antibodies. *Drug development research*. 61(3), 137-154.

30 Chang, B. S., Hershenson, S. (2002). Practical approaches to protein formulaion development. In J. F. Carpenter y M. C. Manning, (Eds.). *Rational design of stable protein formulations*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp. 1-23.