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 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 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.

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 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

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 adicionar excipientes a la solución farmacéutica. Específicamente, estos excipientes tendrán como función mantener la solubilidad, estabilidad y actividad biológica de la proteína.

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 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;
- agentes surfactantes, cuya función es prevenir la formación de partículas y adsorción de proteína en la superficie de su contenedor;

- 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 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 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 (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 parenteral, ya sea por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, siempre que su estabilidad física y química, así como su actividad biológica pueda ser

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 la neutralización de su blanco terapéutico, el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα).

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 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 TNFα y es utilizado como agente bioterapéutico para tratar enfermedades autoinmunes en las cuales se presenta una elevación patológica del TNFα, como por ejemplo: artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil poliarticular, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, espondiloartritis axial, espondiloartritis anquilosante, espondiloartritis axial no radiográfica, psoriasis en placas y psoriasis pediátrica en placas (Scott, 2014), entre otras.

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 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 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.

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 especializada para la ejecución de los estudios.

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 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 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.
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®.
4. Mantener la identidad fisicoquímica de Etanercept.
5. Mantener la potencia biológica de Etanercept.

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 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 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.

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

La solicitud de patente WO2014043103 comprende una formulación farmacéutica para Etanercept. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de fosfato; arginina, sacarosa y cloruro de sodio.

La solicitud de patente WO2014011672 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 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.

La solicitud de patente PCT/KR2012/004369 (WO2012165917) 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 cloruro de sodio utilizado como agente tonificante.

La solicitud de patente PCT/EP2012/057119 (WO2012143418) describe una composición farmacéutica para Etanercept. Esta formulación tiene como componentes una solución 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.

La solicitud de patente PCT/US2012/044988 (WO2013006454) 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 mantienen un pH en el intervalo de 6.0 a 7.0.

La solicitud de patente PCT/US2013/070248 (WO2014078627) divulga una formulación farmacéutica líquida para Etanercept. Esta formulación tiene como componentes una 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 (WO2015080513) 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 agentes tonificantes, y que conjunto mantienen un pH de 6.3.

La solicitud de patente PCT/US2007/061544 (WO2007092772) 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.

La solicitud de patente PCT/US2009/000759 (WO2009099641) 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 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 (WO2014064637) 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 se selecciona del grupo de glicina, urea o 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

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 (WO2014177548) describe una composición acuosa para Etanercept. Esta 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 (WO2011141926) 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 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 (WO2009015345) se 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

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.

La solicitud de patente PCT/KR2013/009474 (WO2014084508) divulga una composición para una proteína de fusión. Esta formulación tiene como componentes una solución amortiguadora de pH de succinato, sal de amonio utilizado 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 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 como único método indicativo de estabilidad.

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 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 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 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 (WO2015056613) se refiere a una preparación acuosa para Etanercept. Esta formulación tiene como componentes creatinina y macrogol utilizados como agentes estabilizadores.

La solicitud de patente PCT/JP2014/054036 (WO2014178216) 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 (WO2017026881) 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.

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

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 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 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 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.

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

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 concentración (20 a 100 mg/mL), una proteína de fusión recombinante TNFR:Fc dirigida contra el TNFα, 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, 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 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. Adicionalmente, las formulaciones divulgadas en la presente no utilizan iones metálicos, aminoácidos o sus combinaciones

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 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 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 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. Por último, esta formulación es útil para contener Etanercept en su uso comercial como agente bioterapéutico de administración parenteral para tratar enfermedades

autoinmunes en las cuales se presenta una elevación patológica del TNFα.

Breve descripción de la invención

La presente invención describe nuevas formulaciones líquidas para Etanercept, una proteína de fusión anti-TNFα. Específicamente, esta invención comprende formulaciones líquida para Etanercept, una proteína de fusión recombinante TNFR:Fc dirigida contra el TNFα en alta concentración (20 a 100 mg/mL), en presencia de una solución amortiguadora de pH 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 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 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

comercial como agente bioterapéutico de administración parenteral para tratar enfermedades autoinmunes en las cuales se presenta una elevación patológica del TNFα.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

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 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, 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,

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 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 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 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 administración parenteral.

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.

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 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 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.

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

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

El IFA “retiene su identidad fisicoquímica” en una 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 de su actividad biológica determinada por bioensayo de inhibición de la actividad apoptótica del TNFα en células de mamífero.

Un agente “surfactante” se refiere a un compuesto que es 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 compuestos, como azúcares o aminoácidos, que son capaces de prevenir o controlar la agregación del IFA.

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 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 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 14 días de un estudio de estrés térmico a 40 ºC. Como control se utilizó la formulación líquida de Enbrel®.

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

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

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 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.

La figura 4 muestra curvas dosis-respuesta obtenidas por bioensayo de inhibición de la actividad apoptótica del TNFα 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 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

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

EJEMPLOS

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.

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.

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

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, 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 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 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 ºC con toma de muestras a 0, 7 y 14 días. Como control (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

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, fueron evaluados por varias metodologías analíticas, incluyendo: SEC, DSF y cIEF. Estas técnicas permitieron evaluar el porcentaje de pureza, la Tm y heterogeneidad de carga, respectivamente. SEC fue llevado a cabo en un instrumento UHPLC (modelo Acquity clase H) equipado con un 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 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.).

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%	NaCl 100 mM

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 ºC en la Tm 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

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 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. 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 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 Tm de Etanercept. La Tm de una proteína es una medida de su estabilidad estructural en solución, otorgando información de los cambios en la conformación de la proteína inducidos por calor. A mayor Tm una mayor temperatura será

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 candidato basadas en sistemas de histidina y succinato, con y sin sacarosa o trehalosa adicionadas con polisorbato presentaron una mayor Tm que aquellas formulaciones con y sin sacarosa, trehalosa o arginina adicionadas con poloxámero, y de la formulación de Enbrel® al término de 14 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 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 de carga son efecto de modificaciones como deamidación, oxidación, isomerización, glicosilación, entre otras. Los perfiles electroforéticos no presentaron diferencia entre

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).

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 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 líquida de Etanercept.

Clave	Tiempo (d)	Agregados (%)	Tm (ºC)	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

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 ºC 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

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, fueron evaluados por varias metodologías analíticas, incluyendo: SEC, DSF y potencia biológica determinada por bioensayo de inhibición de la actividad apoptótica del TNFα en células de mamífero. El bioensayo se basa en la capacidad de Etanercept para evitar la interacción de TNFα con los receptores TNF presentes en la superficie de una línea celular de monocitos humanos (U937). Estas técnicas permitieron evaluar el porcentaje de pureza, la Tm y potencia biológica, respectivamente.

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 – 6.8	0.05 – 0.15	Manitol cbp 1 a 7% ó 250 – 350 mOsm/Kg
S1 – S13	Succinato				

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 ºC en la Tm respecto al 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.

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 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 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

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 Tm similar entre ellas a 21 días y, en ambos casos, los valores máximos fueron superiores a la Tm 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))	Tm (ºC)
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

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

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 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

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 estrés mecánico, el estrés por ciclos congelación-descongelación tuvo menor impacto en la generación de agregados. Como tendencia general se 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. Los valores fueron comparables entre las fórmulas candidato y la formulación líquida de Enbrel®.

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 apoptótica de TNFα 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 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.

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

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 formulaciones descritas en el estado de la técnica y en una combinación nunca antes utilizada.

REFERENCIAS

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

Staub A., Guillarme 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.

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

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.

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.

Chang, B. S., Hershenson, S. (2002). Practical approaches to protein formultaion 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.