

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 437**

51 Int. Cl.:
A61K 38/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04735870 .0**
96 Fecha de presentación: **03.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1633390**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de péptido GLP-1 estabilizadas**

30 Prioridad:
03.06.2003 DK 200300819
05.06.2003 US 476279 P
19.01.2004 DK 200400075
22.01.2004 US 538525 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.05.2012

73 Titular/es:
NOVO NORDISK A/S
Novo Allé
2880 Bagsvård, DK

72 Inventor/es:
JUUL-MORTENSEN, Claus y
ENGELUND, Dorte, Kot

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

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 2 380 437 T3

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas de péptido GLP-1 estabilizadas

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de las composiciones farmacéuticas. Más específicamente, la invención pertenece a métodos para preparar composiciones farmacéuticas estables que se obtienen a partir de un producto peptídico a granel que ha sido sometido a tratamiento a pH por encima de pH neutro.

10

Antecedentes de la invención

[0002] Péptidos terapéuticos se usan mucho en la práctica médica. Composiciones farmacéuticas de tales péptidos terapéuticos se requieren por tener un tiempo de conservación de varios años para ser adecuadas para uso común. No obstante, composiciones peptídicas son intrínsecamente inestables debido a sensibilidad hacia degradación física y química. Degradación química implica cambio de enlaces covalentes, tal como oxidación, hidrólisis, racemización o reticulación. Degradación física implica cambios conformacionales en relación a la estructura nativa del péptido, es decir, estructura terciaria y secundaria, tal como agregación, precipitación o adsorción a superficies.

[0003] Glucagón se ha usado durante décadas en la práctica médica dentro de diabetes y diferentes péptidos de tipo glucagón se desarrollan para varias indicaciones terapéuticas. El gen de preproglucagón codifica glucagón al igual que péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1) y péptido de tipo glucagón 2 (GLP-2). Análogos de GLP-1 y derivados al igual que el péptido de lagarto homólogo, exendina-4, se desarrollan para el tratamiento de hiperglicemia dentro de diabetes tipo 2. GLP-2 son potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. No obstante, todos estos péptidos que abarcan 29-39 aminoácidos tienen un alto grado de homología y comparten varias propiedades, sobre todo su tendencia para agregación y formación de fibrillas insolubles. Esta propiedad parece abarcar una transición de una conformación de hélice alfa predominante a láminas beta (Blundell T.L. (1983) *The conformation of glucagon*. En: Lefévre P.J. (Ed) *Glucagon I*. Springer Verlag, pp 37-55, Senderoff R.I. et al., *J. Pharm. Sci.* 87 (1998)183-189, WO 01/55213). Agregación de los péptidos de tipo glucagón se observa principalmente cuando las soluciones de los péptidos se agitan o se revuelven, en la interfaz entre solución y fase gaseosa (aire), y al contacto con superficies hidrofóbicas como Teflón®.

[0004] Así, varios excipientes deben añadirse frecuentemente a composiciones farmacéuticas de los péptidos de tipo glucagón para mejorar su estabilidad. El tiempo de conservación de formulaciones parenterales líquidas de estos péptidos debe ser al menos un año, preferiblemente más tiempo. El periodo en uso donde el producto se puede transportar y agitar diariamente a temperatura ambiente preferiblemente debería ser varias semanas. Así, hay una necesidad de composiciones farmacéuticas de péptidos de tipo glucagón que tienen estabilidad mejorada.

[0005] Se ha encontrado inesperadamente que productos de péptido a granel que han sido tratados a un pH por encima de 8,0 aumentaron la estabilidad de las composiciones farmacéuticas obtenidas a partir de estos productos de péptido a granel.

Definiciones

[0006] Lo siguiente es una definición detallada de los términos usados en la especificación. El término "cantidad efectiva" como se utiliza en este caso significa una dosificación que es suficiente para ser eficaz para el tratamiento del paciente comparado sin tratamiento. El término "reconstituido" como se utiliza en este caso en referencia a una composición farmacéutica significa una composición acuosa que ha sido formada por la adición de agua o una solución apropiada acuosa a un material sólido comprendiendo el ingrediente farmacéutico activo. Composiciones farmacéuticas para reconstitución se aplican donde no se puede producir una composición líquida con tiempo de conservación aceptable. Un ejemplo de una composición farmacéutica reconstituida es la solución que resulta cuando adición de agua o de una solución acuosa apropiada a una composición liofilizada. La solución es frecuentemente para administración parenteral y así agua para inyección o cualquier otro solvente apropiado se usa para reconstruir el material sólido. El término "tratamiento de una enfermedad" como se utiliza en este caso significa la gestión y cuidado de un paciente que ha desarrollado la enfermedad, condición o trastorno. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, condición o trastorno. Tratamiento incluye la administración de los compuestos activos para eliminar o controlar la enfermedad, condición o trastorno, al igual que para aliviar los síntomas o complicaciones asociados a la enfermedad, condición o trastorno. El término "péptido tipo glucagón" como se utiliza en este caso se refiere a los péptidos homólogos derivados del gen de preproglucagón, exendinas y análogos y derivados de estos. Los péptidos derivados del gen de preproglucagón son glucagón, péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1), péptido de tipo glucagón 2 (GLP-2) y oxintomodulina (OXM). Las exendinas que se encuentran en el monstruo de Gila son homólogos a GLP-1s y también ejercen un efecto insulínico. Ejemplos de exendinas son exendina-4 y exendina-3.

[0007] Los péptidos de tipo glucagón tienen las siguientes secuencias:

	1	5	10	15	20	25	30	35
Glucagón	HSQGT	FTSDY	SKYLD	SRRAQ	DFVQW	LMNT-NH2		
GLP-1	HAEGT	FTSDV	SSYLE	GQAAK	EFIAW	LVKGR	G	
GLP-2	HADGS	FSDEM	NTILD	NLAAR	DFINW	LIQTK	ITD	
Exendina-4	HGEGT	FTSDL	SKQME	EEAVR	LFIEW	LKNNG	PSSGA	PPPS-NH2
Exendina-3	HSDGT	FTSDL	SKQME	EEAVR	LFIEW	LKNNG	PSSGA	PPPS-NH2
OXM	HSQGT	FTSDY	SKYLD	SRRAQ	DFVQW	LMDTK	RNKN	IA

[0008] El término "análogo" como se utiliza en este caso en referencia a un péptido significa un péptido modificado donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido han sido sustituidos por otros residuos de aminoácidos y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido eliminados del péptido y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido eliminados del péptido y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido añadidos al péptido. Tal adición o eliminación de residuos de aminoácidos puede tener lugar en el N-terminal del péptido y/o en el C-terminal del péptido. Dos sistemas simples y diferentes se usan frecuentemente para describir análogos: por ejemplo, Arg³⁴-GLP-1(7-37) o K34R-GLP-1 (7-37) designa un análogo de GLP-1 donde residuos de aminoácidos en la posición 1-6 han sido eliminados, y la lisina de origen natural en la posición 34 ha sido sustituida con arginina (abreviatura estándar de una sola letra para aminoácidos usados según nomenclatura IUPAC-IUB).

El término "derivado" como se utiliza en este caso en relación a un péptido progenitor significa una proteína progenitora químicamente modificada o un derivado análogo, donde al menos un sustituyente no está presente en la proteína progenitora o un derivado análogo, es decir, una proteína progenitora que ha sido modificada de manera covalente. Modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres, pegilaciones y similares. Unos ejemplos de un derivado de GLP-1(7-37) es Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε-(γ-Glu(N^αhexadecanoil))) - GLP-1 (7-37). El término "péptido GLP-1" como se utiliza en este caso significa GLP-1 (7-37), un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1.

[0009] El término "producto peptídico a granel" o "producto a granel" como se utiliza en este caso significa el producto peptídico purificado que va a usarse para la producción de una composición farmacéutica. Así, el producto a granel se obtiene normalmente como el producto del paso final de purificación, secado o preparación. El producto a granel puede ser de cristales, precipitado, solución o suspensión. El producto a granel es también conocido en la técnica como la sustancia medicinal.

El término "punto isoelectrico" como se utiliza en este caso significa el valor de pH donde la carga de red total de una macromolécula, tal como un péptido, es cero. En péptidos puede haber muchos grupos cargados y en el punto isoelectrico la suma de todos estas cargas es cero, es decir, el número de cargas negativas equilibra el número de cargas positivas. A un pH por encima del punto isoelectrico, la carga de red total del péptido será negativa, mientras que a valores de pH por debajo del punto isoelectrico, la carga de red total del péptido será positiva. El punto isoelectrico de un péptido se puede determinar por isoelectroenfoque o se puede estimar de la secuencia del péptido por algoritmos computacionales conocidos en la técnica.

Descripción de la invención

[0010] En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para aumentar el tiempo de conservación de una composición farmacéutica que comprende un péptido de tipo glucagón, según la reivindicación 1.

[0011] La presente invención se refiere a un método para aumentar el tiempo de conservación de una composición farmacéutica que comprende un péptido de tipo glucagón, un tampón farmacéuticamente aceptable y un conservante farmacéuticamente aceptable, caracterizado por el hecho de que dicha composición farmacéutica se obtiene a partir de un producto polipeptídico a granel que ha sido sometido a tratamiento a un pH en el intervalo de 8,1 a 11,5.

En una forma de realización, el producto polipeptídico a granel ha sido sometido a un pH en el intervalo de 8,1 a 10,0.

En otra forma de realización, el producto polipeptídico a granel ha sido sometido a un pH en el intervalo de 8,5 a 11,5.

En otra forma de realización el producto polipeptídico a granel ha sido sometido a un pH en el intervalo de 8,5 a 10,0.

En otra forma de realización de la invención, el producto polipeptídico a granel ha sido sometido a tratamiento a un pH en el intervalo definido para un periodo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 12 horas, y a una temperatura más alta que la temperatura de nucleación (bien como nucleación homogénea o heterogénea) del péptido a granel a aproximadamente 25°C.

En otra forma de realización de la invención, el producto polipeptídico a granel ha sido sometido a tratamiento a un pH en el intervalo definido para un periodo de 1 minuto a 30 minutos, y a una temperatura de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 25°C.

Debe entenderse que la invención se puede realizar a través de varias combinaciones de valores de pH, temperatura y tiempo. Estas tres variables se pueden combinar en los intervalos mencionados anteriormente. No obstante, mientras que una o dos de la variables puede elegirse adecuadamente en el extremo más alto de los intervalos, una o dos de las variables restantes son típicamente inferiores. Por ejemplo, si un valor alto de pH, tal como pH 10, se usa, se combina

- preferiblemente con una temperatura inferior como aproximadamente 5-10 °C y/o un periodo de tiempo corto tal como menos de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 6 horas. Combinaciones útiles de variables son: pH 1,0 a 5°C para aproximadamente 3 horas, pH 10,0 a 15°C para aproximadamente 1 hora, o pH 11,0 a 5 °C para aproximadamente 1 hora.
- 5 El crecimiento de cristales de hielo, bien como un único cristal o como un policristal, es el proceso de nucleación inicial, solo hielo se produce con la refrigeración de agua o una solución acuosa a presiones bajas, ambos en refrigeración rápida y lenta. La nucleación de soluciones puede ocurrir de dos maneras, dependiendo de la concentración del soluto y la temperatura. Si una solución saturada se enfría, luego esta puede no solo convertirse en superenfriado con respecto a la fase de hielo, sino también sobresaturado con respecto al soluto. En ausencia de núcleos de refrigeración
- 10 apropiados, la solución puede superenfriarse. Así la temperatura usada durante el tratamiento del péptido a pH más alto debe mantenerse sobre la temperatura de nucleación del péptido en las condiciones predominantes. La temperatura de nucleación se conoce por el experto en la técnica y esta puede determinarse rutinariamente para el péptido pertinente por experimentos a temperaturas diferentes.
- 15 [0012] En una forma de realización, la composición farmacéutica es una solución.
En otra forma de realización, la composición farmacéutica es una suspensión.
En otra forma de realización, la composición farmacéutica es un sólido, por ejemplo, una formulación liofilizada a la cual el médico o el paciente añade el solvente antes de uso.
El solvente usado para reconstitución puede ser agua para inyección u otro solvente adecuado.
- 20 En otra forma de realización, el producto polipeptídico a granel se prepara por liofilización de una solución o suspensión de dicho péptido tipo glucagón a dicho pH.
En otra forma de realización, el producto polipeptídico a granel se trata a dicho pH durante la producción de dicha composición farmacéutica.
En otra forma de realización, el producto polipeptídico a granel se trata a dicho pH después del paso final de purificación
- 25 en el proceso de fabricación.
En otra forma de realización, el producto polipeptídico a granel se trata a dicho pH antes, mezclándose con dicho tampón farmacéuticamente aceptable.
En otra forma de realización, el pH de la composición farmacéutica es inferior al pH en el que la solución o suspensión del péptido a granel se trata.
- 30 En otra forma de realización, el pH de la composición farmacéutica es al menos 0,8 unidades de pH inferior al pH en el que la solución o suspensión del péptido a granel se trata.
En otra forma de realización, el pH de dicha composición farmacéutica es al menos 1,5 unidades de pH inferior al pH en el que la solución o suspensión del péptido a granel se trata.
- 35 [0013] Composiciones farmacéuticas comprendiendo un péptido de tipo glucagón según la presente invención se pueden administrar parenteralmente a pacientes en necesidad de tal tratamiento. Administración parenteral se puede realizar por inyección subcutánea, inyección intramuscular, o inyección intravenosa mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Administración alternativa se puede realizar por infusión, por ejemplo, usando una bomba de infusión.
- 40 [0014] En una forma de realización, el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 7,0 a pH 8,0, preferiblemente de pH 7,2 a pH 7,8. En otra forma de realización, el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 7,2 a pH 7,6. En otra forma de realización, el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha
- 45 composición farmacéutica es de pH 7,4 a pH 7,8.
En otra forma de realización, el punto isoeléctrico de dicho péptido de tipo glucagón es de 3,0 a 7,0, preferiblemente de 4,0 a 6,0.
En una forma de realización, dicho péptido de tipo glucagón es glucagón, un análogo de glucagón o un derivado.
En otra forma de realización, dicho péptido de tipo glucagón es oxintomodulina.
- 50 [0015] En una forma de realización dicho péptido de tipo glucagón es GLP-1, un GLP-1 análogo, un derivado de GLP-1 o un derivado de un GLP-1 análogo.
En otra forma de realización, dicho análogo de GLP-1 es seleccionado del grupo que consiste en Gly⁸-GLP-1(7-36)-amida, Gly⁸-GLP-1(7-37), Val⁸-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸-GLP-1 (7-37), Val⁸Asp²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Asp²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²-GLP-1 (7-36)-amida Val⁸Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Lys²²-GLP-1 (7-36)-amida, Val⁸Lys²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Arg²²-GLP-1 (7-36)-amida, Val⁸Arg²²-GLP-1 (7-37), Val⁸His²²-GLP-1 (7-36)-amida, Val⁸His²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁹Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵-GLP-1 (7-37), Val⁸Tyr¹⁶Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Leu¹⁶Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Tyr¹⁸Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Ile³³-GLP-1 (7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵-GLP-1(7-37) y sus análogos.
- 60 En otra forma de realización, dicho derivado de un análogo de GLP-1 es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(n^α-hexadecanoil))) -GLP-1 (7-37).
Métodos para la preparación de GLP-1, sus análogos al igual que derivados de GLP-1 se pueden encontrar en, por ejemplo, WO 99/43706, WO 00/55119, WO 00/34331 y WO 03/18516.
- 65

[0016] En otra forma de realización, dicha solución o suspensión del producto polipeptídico a granel están sujetas a tratamiento a un pH de 9,5, y el pH de dicha composición farmacéutica es 7,4.

En otra forma de realización, el péptido de tipo glucagón es un péptido GLP-1 y la composición farmacéutica o una composición reconstituida de este tiene una concentración de péptido tipo glucagón de 0,1 mg/mL a 50mg/mL, de 0,1 mg/mL a 25mg/mL, de 1 mg/mL a 25mg/mL, de 1 mg/mL a 10mg/mL, o de 3mg/ml a 8mg/ml.

[0017] Tampones adecuados para uso en composiciones farmacéuticas se conocen por los expertos en la técnica e incluyen, pero de forma no limitativa, ortofosfato, TRIS, glicina, N-glicilglicina, citrato acetato sódico, carbonato de sodio, glicil-glicina, histidina, lisina, arginina, fosfato sódico y citrato sódico o mezclas derivadas. En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende un tampón que es Tris. En otra forma de realización, la composición farmacéutica comprende un tampón que es bicina.

Conservantes para uso en composiciones farmacéuticas se conocen por los expertos en la técnica e incluyen, pero de forma no limitativa, fenol, m-cresol, metil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato, 2-fenoxietanol, butil p-hidroxibenzoato, 2-fenietanol, alcohol benzílico, clorobutanol, y thiomersal, o mezclas derivadas.

En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende un agente de isotonicidad.

[0018] En otra forma de realización, la composición farmacéutica comprende un agente de isotonicidad que es cloruro sódico, xilitol, manitol, sorbitol, glicerol, glucosa, maltosa, sacarosa, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina, dimetil sulfona, polietilenoglicol, propilenoglicol o mezclas derivadas.

En otra forma de realización de la presente invención, la composición farmacéutica comprende además un estabilizador. En otra forma de realización de la invención, la formulación comprende además un estabilizador seleccionado del grupo polímeros de alto peso molecular o compuestos de pesos moleculares bajos.

En otra forma de realización de la invención, el estabilizador se selecciona de polietileno glicol (p. ej. PEG 3350), polivinilalcohol (PVA), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, sales diferentes (p. ej. cloruro sódico), L-glicina, L-histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y sus mezclas derivadas.

Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

En una forma de realización preferida de la invención, el estabilizador es seleccionado del grupo que consiste en L-histidina, imidazol y arginina.

En otra forma de realización de la presente invención, el estabilizador es seleccionado del grupo que consiste en PEG 3350, polivinilalcohol, polivinilpirrolidona, carboxi-metilcelulosa, cloruro sódico, L-glicina, L-histidina, imidazol, L-arginina, L-lisina, L-isoleucina, ácido L-aspártico, L-triptófano, L-treonina y sus mezclas derivadas.

En otra forma de realización de la invención, la formulación comprende además un agente quelante.

En otra forma de realización de la invención, el agente quelante se selecciona de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y sus mezclas derivadas. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

En otra forma de realización de la presente invención, la composición farmacéutica comprende además un tensioactivo.

En otra forma de realización de la invención, el tensioactivo se selecciona de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso de sorbitán, poloxámeros, tal como 188 y 407, ésteres de ácido graso de sorbitán de polioxietileno, derivados de polioxietileno tal como derivados alcoxilados y alquilados (tweens, por ejemplo Tween-20, o de Tween-80), monoglicéridos o derivados etoxilados de estos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de estos, glicerol, ácido cólico o derivados de este, lecitinas, alcoholes y fosfolípidos, glicerofosfolípidos (lecitinas, cefalinas, serina de fosfatidilo), gliceroglicolípidos (galactopiransoide), esfingofosfolípidos (esfingomielina), y esfingoglicolípidos (ceramidas; gangliósidos), DSS (docusato de sodio, Registro de CAS nº [577-11-7]), docusato de calcio, Registro de CAS nº [128- 49-4]), docusato de potasio, Registro de CAS nº

[7491-09-0]), SDS (sulfato dodecil de sodio o lauril sulfato de sodio), ácido dipalmitoil fosfatídico, caprilato de sodio, ácidos biliares y sales derivadas y glicina o conjugados de taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, deoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, N-Hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, aniónico (alquil-arilsulfonatos) tensioactivos monovalentes, palmitoil lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (p. ej. 1-aiyl-sn-glicero-3-fosfato ésteres de etanolamina, colina, serina o treonina), alquilo, alcoxilo (éster alquílico), alcoxi (alquilo ether)-derivados de lisofosfatidilo y fosfatidilcolinas, por ejemplo, lauroilo y derivados de miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, que es colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y los positivamente cargados, DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, tensioactivos zwitteriónicos (p. ej. N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1- propanosulfonato, dodecilfosfocolina, lisofosfatidilcolina de miristoilo, lisolecitina de huevo de gallina), tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternarias) (p. ej. cetil-trimetilamonio bromuro, cetilpiridinio, tensioactivos cloruro) no iónico, copolímeros de bloque de óxido de polietileno/óxido de polipropileno (Pluronic/Tetronics, Tritón X-100, dodecilo ?-D- glucopiranósido) o tensioactivos poliméricos (Tween-40; Tween-80, Brij-35), derivados de ácido fusídico (p. ej. sodio tauro- dihidrofusidato etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de estos C6-C12 (por ejemplo. ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, N? à-acilado derivados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, N? à-acilado derivados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un ácido neutro o ácido de amino, N? à-acilado derivado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, o el tensioactivo puede ser seleccionado del grupo de derivados de imidazolina, o mezclas derivadas. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

[0019] El uso de excipientes tales como conservantes, agentes isotónicos y tensioactivos en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto en la materia. Para conveniencia se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995*.

5 [0020] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un péptido de tipo glucagón, un tampón farmacéuticamente aceptable y un conservante farmacéuticamente aceptable, caracterizado por el hecho de que dicha composición farmacéutica se prepara por un método según la presente invención.

10 [0021] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica con un pH entre aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,8, dicha composición comprendiendo un péptido de tipo glucagón y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde dicha composición es estable en almacenaje como medida por menos de un aumento de dos pliegues de fluorescencia en una prueba tioflavina T del péptido de tipo glucagón contenido en dicha composición después almacenamiento de la composición durante un mes a 37°C.

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un péptido, un tampón farmacéuticamente aceptable y un conservante farmacéuticamente aceptable, caracterizado por el hecho de que dicha composición farmacéutica se prepara por un método según la presente invención.

[0022] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratamiento de hiperglicemia comprendiendo administración parenteral de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica según la presente invención.

20 [0023] El péptido progenitor de tipo glucagón se puede producir por síntesis peptídica, por ejemplo, síntesis péptida de fase sólida usando química de t-Boc o F-Moc u otras técnicas bien establecidas.

25 El péptido progenitor de tipo glucagón puede también producirse por un método que comprende cultivo de una célula huésped con una secuencia de ADN que codifica el polipéptido y capaz de expresión del polipéptido en un medio nutritivo adecuado bajo condiciones que permiten la expresión del péptido, después de lo cual el péptido resultante se recupera del cultivo.

El medio usado para cultivo de las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huésped, tal como medios mínimos o complejos con suplementos apropiados.

30 Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (p. ej. en catálogos de la American Type Culture Collection).

El péptido producido por las células puede luego recuperarse del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo separación de las células huésped del medio por centrifugado o filtración, precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado mediante una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similar, dependiendo del tipo de péptido en cuestión.

35 La secuencia de ADN que codifica el péptido progenitor puede adecuadamente ser de origen genómico o ADNc, por ejemplo, obtenida preparando un genómico o genoteca de ADNc y seleccionando para codificación de secuencias de ADN para todo o parte del péptido por hibridación usando sondas sintéticas oligonucleótidas de acuerdo con técnicas estándar (ver, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989*). La secuencia de ADN que codifica el péptido puede también prepararse sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Matthes et al., *EMBO Journal* 3 (1984), 801 - 805. La secuencia de ADN puede también prepararse por reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en US 4,683,202 o Saiki et al., *Science* 239 (1988), 487 - 491.

La secuencia de ADN se puede insertar en cualquier vector que puede convenientemente someterse a procedimientos de ADN recombinante, y la elección de vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que se va a introducir. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido.

50 Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el cromosoma(s) en el que ha sido integrado.

El vector es preferiblemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica el péptido se une operativamente a segmentos adicionales requeridos para transcripción del ADN, tal como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se puede derivar de proteínas de genes que se codifican bien heterólogos u homólogos a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el péptido de la invención en una variedad de células huésped se conocen bien en la técnica, cf. por ejemplo Sambrook et al., *supra*.

La secuencia de ADN que codifica el péptido puede también, si es necesario, conectarse operativamente a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras transcripcionales y secuencias potenciadoras traduccionales. El vector recombinante de la invención puede comprender además una secuencia de ADN permitiendo al vector replicarse en la célula huésped en cuestión. El vector puede también comprender un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen del producto que complementa un defecto en la célula huésped o uno que confiere resistencia a un medicamento, por ejemplo, ampicilina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

65 Para dirigir un péptido progenitor de la presente invención en la vía secretora de las células huésped, una secuencia de señal secretora (también conocida como una secuencia líder, prepro secuencia o pre secuencia) se puede proporcionar

en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el péptido en el marco de lectura correcto. Secuencias señal secretoras se sitúan comúnmente 5' a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser que normalmente se asocie al péptido o puede ser de un gen que codifica otra proteína segregada.

[0024] Los procedimientos usados para enlazar las secuencias de ADN que codifican el presente polipéptido, el promotor y opcionalmente el terminador y/o secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlas en vectores adecuados con la información necesaria para replicación, se conocen por personas expertas en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*). La célula huésped en que la secuencia de ADN o el vector recombinante que es introducida puede ser cualquier célula que es capaz de producir el presente péptido e incluye bacterias, levadura, hongos y células eucariotas superiores. Ejemplos de células huésped adecuadas bien conocidas y usadas en la técnica son, sin limitación, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, o líneas celulares de mamífero BHK o CHO.

[0025] La presente invención se ilustra posteriormente por los siguientes ejemplos que, no obstante, no son para ser interpretados como limitación del alcance de protección.

Las características descritas en la descripción precedente y en los siguientes ejemplos puede, ambos separadamente y en cualquier combinación de estos, ser material para la realización de la invención en formas diversas de esta.

Ejemplos

[0026] En el siguiente "Compuesto 1" se pretende que signifique: Arg³⁴, Lys²⁶(N ϵ (γ -Glu(N α -hexadecanoil))) -GLP-1 (7-37).

[0027] Antes de liofilización de la solución o suspensión del péptido se ha ajustado al pH objetivo. Después formulaciones farmacéuticas de liofilización se prepararon según procedimiento general 1 y 2.

Procedimiento general 1

[0028] Conservante, agente isotónico y tampón se disolvieron en agua y el pH se ajustó a 7,4. En lo sucesivo, el péptido liofilizado se disolvió durante agitación lenta. El pH se ajustó a 7,4 usando hidróxido sódico y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m.

Procedimiento general 2

[0029] Conservante, agente isotónico y tampón se disolvieron en agua y el pH se ajustó a 7,4. El péptido se disolvió en agua durante agitación lenta. Las dos soluciones se mezclaron y el pH se ajustó a 7,4 usando hidróxido sódico y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m.

[0030] Otra manera para hacer una fórmula farmacéutica estable es elevar el pH por encima de pH neutro (> 8) en la solución con la sustancia medicinal. La fórmula farmacéutica se prepara como se describe el procedimiento en general 3.

Procedimiento general 3

[0031] Conservante, agente isotónico y tampón se disolvieron en agua y el pH se ajustó a 7,4 o menos. El compuesto 1 se disolvió en agua durante agitación lenta y el pH se ajustó a 11,5 por adición de hidróxido sódico. Después de aprox. 5 min, las dos soluciones se mezclaron y el pH se ajustó a 7,4 usando hidróxido sódico y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m.

[0032] Estabilidad física de las formulaciones se evaluó mediante la prueba de tioflavina T. La estabilidad física de las formulaciones diferentes se caracteriza por el hecho de su tendencia para formar fibrillas. Un método para determinar la presencia de fibrillas es la prueba de tioflavina T. El tinte histológico tiazol Tioflavina T (TT) se usa como un indicador de formación de fibrilla amiloide. El método se basa en las características fluorescentes de ThT. En presencia de fibrillas de amiloide, la fluorescencia de ThT muestra un máximo de excitación a 450 nm y emisión mejorada a 482 nm. La intensidad de fluorescencia de ThT ha mostrado ser lineal con el aumento en la concentración de fibrilla amiloide. La estabilidad física de las formulaciones se evalúa por la prueba de ThT después de que almacenamiento de la formulación en cartuchos de vidrio llenados hasta arriba durante varios periodos de tiempo.

Resultados de fórmula farmacéutica fabricada con sustancia medicinal ajustada a un pH por encima de neutro pH (> 8) antes de liofilización

[0033] Los resultados de prueba de ThT al inicio (t = 0) y después de 1 mes de almacenamiento a 37°C puede verse en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de prueba de ThT (unidades de fluorescencia) después de 1 semana o 1 mes de prueba de estabilidad acelerada.

pH del compuesto 1 antes de liofilización	Concentración del compuesto 1 en formulación farmacéutica	pH de la formulación farmacéutica	Unidades de fluorescencia después de almacenamiento a 37°C		
			T = 0 semana	T = 1 semana	T = 1 mes
8,0	3 mg/ml	7,4	6	No determinado	28
9,5	3 mg/ml	7,4	6	No determinado	7
11,5	3 mg/ml	7,4	6	No determinado	7
8,0	6,25 mg/ml	7,4	13	20	37
9,5	6,25 mg/ml	7,4	14	13	13
11,5	6,25 mg/ml	7,4	14	13	14

5 [0034] Se puede observar que las formulaciones farmacéuticas fabricadas con compuesto 1 ajustado a pH 9,5 y 11,5 antes de liofilización son más estables físicamente después de 1 semana y 1 mes de almacenamiento a 37°C (mientras no se ve ningún aumento en ThT) en comparación con la fórmula farmacéutica fabricada con compuesto 1 ajustado a pH 8,0 antes de liofilización (donde un aumento en ThT se ve).

Resultados de fórmula farmacéutica fabricada por aumento de pH por encima de pH neutro (> 8) en la solución con la sustancia medicinal.

10 [0035]

Tabla 2. Resultados de prueba de ThT (unidades de fluorescencia) después de 1 mes de prueba de estabilidad acelerada.

pH de la solución con sustancia medicinal	Concentración del componente 1 en formulación farmacéutica	pH de la formulación farmacéutica	Unidades de fluorescencia después de almacenamiento a 37°C		
			T = 0 semana	T = 1 semana	T = 1 mes
8,0	6,25 mg/ml	7.4	14	20	41
11,5	6,25 mg/ml	7.4	13	12	13

15

[0036] Se puede observar que la fórmula farmacéutica fabricada por aumento de pH por encima de pH neutro (> 8) en la solución con la sustancia medicinal es físicamente estable después de 1 mes a 37°C (mientras ningún aumento en ThT se ve) en comparación con la fórmula farmacéutica fabricada sin el aumento de pH por encima de pH neutro (> 8).

REIVINDICACIONES

1. Método para aumentar el tiempo de conservación de una composición farmacéutica que comprende

- 5 (a) un péptido GLP-1,
 (b) un tampón farmacéuticamente aceptable seleccionado de ortofosfato, TRIS, glicina, N-glicilglicina, citrato acetato sódico, carbonato de sodio, glicilglicina, histidina, lisina, arginina, fosfato sódico y citrato sódico o mezclas derivadas, y
 10 (c) un conservante farmacéuticamente aceptable seleccionado de fenol, m-cresol, metil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato, 2-fenoxietanol, butil p-hidroxibenzoato, 2-feniletanol, alcohol benzílico, clorobutanol y tiomerosal, o mezclas derivadas,

15 **caracterizado por el hecho de que** dicha composición farmacéutica se obtiene a partir de un producto polipeptídico a granel que ha sido sometido a tratamiento a un pH en el intervalo de 8.1 a 11.5, donde dicho producto polipeptídico a granel se prepara por liofilización de una solución o suspensión de dicho péptido GLP-1 a dicho pH, y donde el pH de dicha composición farmacéutica es inferior al pH en el que se trata la solución o suspensión del producto polipeptídico a granel.

20 2. Método según la reivindicación 1, donde dicho pH está en el intervalo de 8.5 a 9.6.

3. Método según la reivindicación 1, donde dicho pH está en el intervalo de 9.0 a 9.6

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicho producto polipeptídico a granel ha sido sometido a tratamiento con un pH en el intervalo definido por un periodo de 10 minutos a 12 horas y a una temperatura de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 25 °C.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicho producto polipeptídico a granel ha sido sometido a tratamiento con un pH en el intervalo definido por un periodo de 1 minuto a 30 minutos y a una temperatura de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 25 °C.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicha composición farmacéutica es una solución.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicha composición farmacéutica es una suspensión.

35 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicha composición farmacéutica es un sólido.

9. Método según la reivindicación 8, donde dicha composición farmacéutica debe ser reconstituida con agua para inyección u otro solvente adecuado.

40 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el pH de dicha composición farmacéutica es al menos 0.8 unidades de pH inferior al pH en el que se trata la solución o suspensión del péptido a granel.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el pH de dicha composición farmacéutica es al menos 1.5 unidades de pH inferior al pH en el que se trata la solución o suspensión del péptido a granel.

45 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición farmacéutica es adecuada para administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión.

50 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 7.0 a pH 8.0, preferiblemente de pH 7.2 a pH 7.8.

14. Método según todas las reivindicaciones precedentes, donde el punto isoelectrico de dicho péptido GLP-1 es de 3.0 a 7.0, preferiblemente de 4.0 a 6.0.

55 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde dicho péptido GLP-1 es seleccionado del grupo que consiste en Gly⁸-GLP-1 (7-36)-amida, Gly⁸-GLP-1 (7-37), Val⁸-GLP-1 (7-36)-amida, Val⁸-GLP-1 (7-37), Val⁸Asp²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Asp²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Glu²²-GLP-1 (7-36)-amida, Val⁸Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Lys²²-GLP-1(7-37), Val⁸Arg²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Arg²²-GLP-1(7-37), Val⁸His²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸His²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁹Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵-GLP-1 (7-37), Val⁸Tyr¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Leu¹⁶Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Tyr¹⁸Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸GIU²²His³⁷-GLP-1 (7-37), Val⁸Glu²²Ile³³-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Ile³³-GLP-1 (7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵-GLP-1 (7-37), y péptidos químicamente modificados de estos que han sido modificados de manera covalente con amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres o pegilaciones.

65

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde dicho péptido GLP-1 es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoyl)))⁻-GLP-1 (7-37).
- 5 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde dicha solución o suspensión del producto polipeptídico a granel se somete a tratamiento con un pH de 9.5, y el pH de dicha composición farmacéutica es 7.4.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde la concentración de dicho péptido GLP-1 en la composición farmacéutica es de 0.1 mg/mL a 50mg/mL, de 0.1 mg/mL a 25mg/mL, de 1 mg/mL a 25mg/mL, de 1 mg/mL a 10mg/mL, o de 3mg/ml a 8mg/ml.
- 10 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un agente de isotonicidad.
20. Método según la reivindicación 19, donde dicho agente de isotonicidad es cloruro sódico, xilitol, manitol, sorbitol, glicerol, glucosa, maltosa, sacarosa, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina, dimetil sulfona, polietilenoglicol, propilenoglicol o mezclas derivadas.
- 15 21. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un tensioactivo.