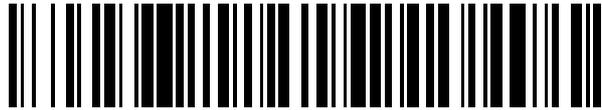


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 223**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2005 E 05775826 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 1789434**

54 Título: **Uso de tris(hidroximetil) aminometano para la estabilización de péptidos, polipéptidos y proteínas**

30 Prioridad:

**31.08.2004 DK 200401310**

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

**10.02.2014**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)  
Novo Allé  
2880 Bagsvaerd , DK**

72 Inventor/es:

**CHRISTIANSEN, INGUN y  
STABY, ARNE**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 442 223 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de tris(hidroximetil) aminometano para la estabilización de péptidos, polipéptidos y proteínas

5 [0001] Esta invención se refiere generalmente a un método para la reducción de la aparición o incidencia de gelificación/fibrilación/agregación durante el "upstream y downstream processing" (procesado previo y procesado de separación y purificación) y purificación de péptidos, polipéptidos y proteínas.

10 [0002] Un gran número de polipéptidos han sido aprobados para uso en la práctica médica. Estos polipéptidos se pueden producir en células huéspedes adecuadas por tecnología del ADN recombinante o se pueden producir sintéticamente por tecnología de síntesis de péptidos bien establecida. No obstante, polipéptidos nativos al igual que análogos y derivados de los mismos tienden a mostrar niveles elevados de aclaramiento que son inaceptables para muchas indicaciones clínicas donde una elevada concentración de plasma del péptido se requiere durante un periodo temporal prolongado. Ejemplos de péptidos que en su forma nativa con un índice de aclaramiento elevado son: ACTH, factor liberador de corticotropina, angiotensina, calcitonina, exendina, exendina-3, exendina-4, insulina, glucagón, péptido 1 de tipo glucagón, péptido 2 de tipo glucagón, factor 1 de crecimiento de tipo insulina, factor 2 de crecimiento de tipo insulina, péptido inhibitorio gástrico, factor liberador de la hormona del crecimiento, péptido activador de adenilato-ciclasa de la pituitaria, secretina, enterogastrina, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiroidea, trombopoyetina, eritropoyetina, factores de liberación hipotalámica, prolactina, hormonas estimuladoras de la tiroides, endorfinas, enkefalinas, vasopresina, oxitocina, opioides y sus análogos, superóxido-dismutasa, interferón, asparaginasa, arginasa, arginina desaminasa, adenosina-desaminasa y ribonucleasa.

25 [0003] Mientras que varias formulaciones acuosas que estabilizan composiciones de péptidos, polipéptidos y de proteínas han sido identificadas en la técnica, la desestabilización de péptidos, polipéptidos y proteínas tanto en soluciones de formulación como en solución durante el proceso continúa generándose difícilmente, especialmente en el "upstream y downstream processing" de estos péptidos. Consecuentemente, hay una necesidad de nuevos métodos que superan las insuficiencias del estado de la técnica. (Senderhoff et al., J. Pharm. Sc. Vol. 87, No. 2, págs. 183-189, febrero 1998).

30 [0004] EP 1 396 499 describe un proceso para estabilizar compuestos de péptido de tipo glucagón (GLP-1).

[0005] EP 0 747 390 describe métodos de reducción de la gelificación de una proteína acilada de ácido graso usando un tampón de citrato.

35 [0006] S.E.Bondos y A.Bicknell Analytical Biochemistry 316(2003)223-231. Tris(hidroximetil)aminometano no se menciona como un agente que puede promover solubilidad de proteína en este artículo.

[0007] EP 0 722 492 se refiere a estabilización de enzimas, anticuerpos, antígenos etc.

40 [0008] EP 1 344 533 se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden MBL (lectina de unión a la manosa) y/o variantes de MBL.

[0009] WO 01/52937 divulga composiciones farmacéuticas para polipéptidos que comprenden un tampón de combinación.

## RESUMEN DE LA INVENCION

45 [0010] La presente invención se refiere a métodos para la reducción de la aparición o incidencia de gelificación/fibrilación/agregación durante el "upstream y downstream processing" y purificación de péptidos, polipéptidos y proteínas incluyendo péptidos de tipo glucagón (GLPs), exendina y sus análogos y/o derivados.

50 [0011] La presente invención proporciona un método para tratar una solución acuosa de péptidos, polipéptidos y proteínas con o sin un modificador orgánico a concentraciones más altas, con menos regulación de la temperatura y del pH que los métodos habitualmente utilizados.

55 [0012] Más particularmente, la presente invención se refiere a un método de procesamiento y purificación de péptidos, polipéptidos y proteínas incluyendo compuestos de péptido de tipo glucagón (GLP) en presencia de tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS) y un modificador orgánico que es seleccionado de: metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, butanol, hexilenglicol, acetonitrilo y N-metil-2-pirrolidona.

60 [0013] La presente invención también proporciona soluciones acuosas de péptidos, polipéptidos y proteínas con una tendencia reducida a gelificación/fibrilación/agregación.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

[0014] **Figura 1:** una representación gráfica de un estudio de estabilidad para una solución acuosa de Arg<sup>34</sup>-GLP-1[7-37] que contiene aproximadamente 2% en peso de etanol y 10 mM de tris-(hidroximetil)aminometano, a pH 9,2, temperatura ambiente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0015] La presente invención detalla el descubrimiento sorprendente de que el procesamiento de péptidos o proteínas en presencia de un tampón de TRIS o aditivo de TRIS, tal como en el flujo de proceso, particularmente un flujo de proceso con un solvente orgánico polar tal como etanol, la tendencia de péptidos, polipéptidos y proteínas para formar un gel, fibrilar o agregar es inmensamente reducida.

[0016] En métodos de la presente invención, tris-(hidroximetil)aminometano, y sustancias tampón biológico similares han mostrado ser superiores en péptidos estabilizantes, polipéptidos y proteínas, incluyendo péptidos de tipo glucagón (GLPs, análogos y derivados del mismo) en solución, durante el "upstream y downstream processing" y en que previenen la degradación física del producto de fármaco final. TRIS generalmente se refiere a 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol, y a cualquier sal derivada farmacéuticamente aceptable. La base libre y la forma de hidrocloreuro son dos formas comunes de TRIS. TRIS es también conocido en la técnica como aminometano de trimetilol, tampón de tris amina, THAM, y trometamina. TRIS tiene un pKA de aproximadamente 8.05. TRIS usado como un "aditivo" se refiere al uso de TRIS fuera de su variedad de tampón típico, por ejemplo por debajo de un pH de aproximadamente 7.0, o por encima de un pH de aproximadamente 9.1.

[0017] "Upstream o downstream processing" y purificación de péptidos, polipéptidos y proteínas incluye, pero no se limita a fermentación, evaporación giratoria, cultivo, filtración, centrifugado, métodos de cromatografía, síntesis enzimática, síntesis orgánica, conversión enzimática, precipitación, cristalización, liofilización, liofilización u otros medios conocidos por el artesano experto.

[0018] El término "modificadores orgánicos" se refiere a un solvente orgánico o compuesto orgánico soluble en agua o mezclas derivadas, este modificador induce una selectividad favorable y cambiada entre la impureza o impurezas relacionada(s) indeseada(s) y el péptido y el intercambiador iónico. Si un modificador seleccionado induce o no dicha selectividad normalmente dependerá de la impureza o impurezas relacionada(s), y se puede evaluar por prueba-y-error. El modificador orgánico incluye pero no se limita a alcano C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>1-6</sub> o alquino C<sub>1-6</sub>, acetonitrilo, N-metil pirrolidona, urea, guanidina-HCl, o ácido alcanoico C<sub>1-6</sub>, tal como ácido acético, glicol C<sub>2-6</sub>, polialcohol C<sub>3-7</sub> incluyendo azúcares o mezclas derivadas.

[0019] El término, " alcano C<sub>1-6</sub> ", " alquino C<sub>1-6</sub> " o " alqueno C<sub>1-6</sub> ", como se utiliza en este caso solo o en la combinación se destina a incluir aquellos grupos alcano C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>1-6</sub> o alquino C<sub>1-6</sub> de la longitud designada en bien una configuración cíclica o ramificada o lineal a la cual se enlaza un hidróxilo (-OH) (véase Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4<sup>a</sup> ed.). Ejemplos de alcoholes lineales son metanol, etanol, n-propanol, alcohol alílico, n-butanol, n-pentanol y n-hexanol. Ejemplos de alcoholes ramificados son 2-propanol y alcohol tert-butílico. Ejemplos de alcoholes cíclicos son alcohol de ciclopropilo y 2-ciclohexen-1-ol.

[0020] El término "ácido alcanoico C<sub>1-6</sub>", como se utiliza en este caso, se destina a incluir un grupo de la fórmula R'COOH donde R' es H o alquilo C<sub>1-5</sub>, tal como ácido acético, propiónico, butírico, α-metilbutírico, o valérico (véase Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4<sup>a</sup> ed.).

[0021] El término " alquilo C<sub>1-5</sub> ", como se utiliza en este caso, se destina a incluir un grupo ramificado o recto de alquilo teniendo de uno a cinco átomos de carbono. Típicos grupos de alquilo C<sub>1-5</sub> incluyen, pero de forma no limitativa metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, pentilo, isopentilo, y similares (véase Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4<sup>a</sup> Ed.).

[0022] El término "glicol C<sub>2-6</sub>", como se utiliza en este caso, se destina a incluir un alcano C<sub>2-6</sub> que contiene dos grupos hidroxilo en átomos de carbono diferentes que pueden ser adyacentes o no. Un glicol C<sub>2-6</sub> típico incluye, pero no se limita a 1,2-etanodiol, 1,2-propanodiol, o 2-metil-2,4-pentanodiol (véase Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4<sup>a</sup> Ed.).

[0023] El término "alcano C<sub>2-6</sub>", como se utiliza en este caso, se destina a incluir un grupo alcano ramificado o recto teniendo de dos a seis átomos de carbono. Típicos grupos alcano C<sub>2-6</sub> incluyen, pero de forma no limitativa etano, propano, isopropano, butano, isobutano, pentano, hexano y similares (véase Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4<sup>a</sup> Ed.).

[0024] El término "polialcohol C<sub>3-7</sub> incluyendo azúcares", como se utiliza en este caso, se destina a incluir un grupo de la

fórmula  $\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$  donde n es un número entero de 1-5, y monosacáridos tales como manosa y glucosa (véase Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4ª Ed.).

5 [0025] El término "péptidos" o "péptido", como se utiliza en este caso, se destina a incluir tales polipéptidos, oligopéptidos, proteínas, al igual que, homólogos, análogos y derivados de los mismos, que son capaces de ser producidos por técnicas de ADN recombinante convencionales al igual que métodos sintéticos convencionales. Tales péptidos incluyen pero de forma no limitativa glucagón, hGH, insulina, aprotinina, factor VII, TPA, factor VIIa (NovoSeven<sup>®</sup>, disponible por Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), Factor VIIIa, FFR-Factor VIIa, heparinasa, ACTH, factor liberador de corticotropina, angiotensina, calcitonina, insulina, péptido 1 de tipo glucagón, péptido 2 de tipo glucagón, factor 1 de crecimiento de tipo insulina, factor 2 de crecimiento de tipo insulina, péptido inhibitorio gástrico, factor liberador de la hormona del crecimiento, péptidos de activación de adenilato-ciclasa de la pituitaria, secretina, enterogastrina, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiroidea, trombotopoyetina, eritropoyetina, factores de liberación hipotalámica, prolactina, hormonas estimuladoras de la tiroides, endorfinas, encefalinas, vasopresina, oxitocina, opiodes, GIP, exendinas, amida del péptido histidina-metionina, helospectinas, helodermina, péptido relacionado con el péptido activador de la adenilato-ciclasa de la pituitaria, polipéptido intestinal vasoactivo y sus análogos y derivados.

20 [0026] El término "péptido GLP-1", como se utiliza en este caso, se destina a designar GLP-1 (7-37), GLP-1 (7-36) amida al igual que sus análogos y derivados, que son capaces de ser producidos por técnicas de ADN recombinante convencionales al igual que métodos sintéticos convencionales. Tales péptidos de GLP-1 incluyen pero de forma no limitativa péptido-1 de tipo glucagón nativo, por ejemplo tales fragmentos peptídicos que comprenden GLP-1 (7-37) y sus derivados funcionales como se describe en WO 87/06941; tales fragmentos peptídicos que comprenden GLP-1 (7-36) y sus derivados funcionales como se describe en WO 90/11296; tales análogos de los péptidos 7-34, 7-35, 7-36 y 7-37 de GLP-1 activo como se describe en WO 91/11457; tales derivados de GLP-1 en los que un sustituyente lipofílico se une a al menos un residuo de aminoácido como se describe en WO 98/08871; tales fragmentos N-terminales truncados de GLP-1 como se describe en EP 0699686-A2; y tales análogos de GLP-1 y derivados que incluyen un grupo de imidazol N-terminal como se describe en EP 0708179-A2.

30 [0027] El término "péptido GLP-2", como se utiliza en este caso, se destina a designar GLP-2 (1-35), GLP-2 (1-34), GLP-2 (1-33) al igual que sus análogos y derivados, que son capaces de ser producidos por técnicas de ADN recombinante convencionales al igual que métodos sintéticos convencionales. Tales péptidos GLP-2 incluyen pero de forma no limitativa péptido-2 de tipo glucagón nativo, derivados de GLP-2 en el que un sustituyente lipofílico se fija al menos a un residuo de aminoácido como se describe en WO 98/08872, péptido-2 de tipo glucagón humano (hGLP-2), GLP-2(1-30); GLP-2(1-31); GLP-2(1-32); GLP 2(1-33); GLP-2(1-34), GLP-2(1-35), Lys<sup>20</sup>GLP-2(1-33), Lys<sup>20</sup>Arg<sup>30</sup>GLP-2(1-33), Arg<sup>30</sup>Lys<sup>34</sup>GLP-2(1-34), Arg<sup>30</sup>Lys<sup>35</sup>GLP-2(1-35), Arg<sup>30,35</sup>Lys<sup>20</sup>GLP-2(1-35), Arg<sup>35</sup>GLP-2(1-35), Lys<sup>20</sup>(N<sup>ε</sup>-tetradecanoil)GLP-2(1-33); Lys<sup>20,30</sup>-bis(N<sup>ε</sup>-tetradecanoil) GLP-2(1-33); Lys<sup>20</sup>(N<sup>ε</sup>-tetradecanoil)Arg<sup>30</sup>GLP-2(1-33); Arg<sup>30</sup>Lys<sup>35</sup>(N<sup>ε</sup>-tetradecanoil)GLP-2(1-35); Arg<sup>30,35</sup>Lys<sup>20</sup>(N<sup>ε</sup>-tetradecanoil)GLP-2(1-35); Arg<sup>35</sup>Lys<sup>30</sup>(N<sup>ε</sup>-tetradecanoil)GLP-2(1-35); Arg<sup>30</sup>Lys<sup>34</sup>(N<sup>ε</sup>-tetradecanoil)GLP-2(1-34); Lys<sup>20</sup>(N<sup>ε</sup>-(ω-carboxinadecanoil))GLP-2(1-33); Lys<sup>20,30</sup>-bis(N<sup>ε</sup>-(ω-carboxinadecanoil))GLP-2(1-33); Lys<sup>20</sup>(N<sup>ε</sup>-(ω-carboxinadecanoil))Arg<sup>30</sup>GLP-2(1-33); Arg<sup>30</sup>Lys<sup>35</sup>(N<sup>ε</sup>-(ω-carboxinadecanoil))GLP-2(1-35); Lys<sup>30</sup>(N<sup>ε</sup>-(γ-glutamil(N<sup>α</sup>-tetradecanoil)))hGLP-2, Lys<sup>30</sup>(N<sup>ε</sup>-(γ-glutamil(N<sup>α</sup>-hexadecanoil)))hGLP-2, Arg<sup>30,35</sup>Lys<sup>20</sup>(N<sup>ε</sup>-(carboxinadecanoil))GLP-2(1-35); Arg<sup>35</sup>Lys<sup>30</sup>(N<sup>ε</sup>-(ω-carboxinadecanoil))GLP-2(1-35); y Arg<sup>30</sup>Lys<sup>34</sup>(N<sup>ε</sup>-(ω-carboxinadecanoil))GLP-2(1-34).

45 [0028] El término "exendina" como se utiliza en este caso, se destina a designar exendina al igual que análogos, derivados, y fragmentos de la misma, por ejemplo exendina-3 y -4. Exendina al igual que análogos, derivados, y fragmentos de la misma se describen en, por ejemplo WO 99/43708, el contenido se incorpora aquí por referencia en su integridad.

50 [0029] El término "análogo" como se utiliza en este caso designa un péptido, polipéptido o proteína donde uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia madre han sido sustituidos por otro residuo de aminoácido y/o donde uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia madre han sido eliminados y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido añadidos a la secuencia madre. El término análogo también se destina a incluir secuencias que contienen ambos componentes peptídicos y no peptídicos, tales como residuos miméticos pseudopeptídicos o peptídicos u otros componentes de ácido sin amino, al igual que aminoácidos que no se producen de forma natural. Sustituciones, adiciones o deleciones pueden tener lugar bien en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la secuencia madre o ambos, al igual que en cualquier lugar en la secuencia madre.

55 [0030] El término "derivado" como se utiliza en este caso designa un péptido, polipéptido o proteína en el que uno o varios de los residuos de aminoácidos de la secuencia madre han sido químicamente modificados, por ejemplo por alquilación, acilación, PEGilación, síntesis peptídica, formación de éster o formación de amida, o similar.

60 [0031] Separación cromatográfica o purificación de péptidos, polipéptidos, proteínas y análogos o derivados de los mismos se pueden realizar por cualquier método disponible para los expertos en la técnica. Ejemplos de estas técnicas incluyen,

pero de forma no limitativa cromatografía en fase líquida de alta eficacia de fase inversa (RP-HPLC), cromatografía en fase líquida de fase inversa (RP-LC), cromatografía de fase recta, cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de hidroxiapatita, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad, cromatografía de quelato metálico, precipitación, adsorción, filtración en gel, cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) electroforesis y similares, ejecutadas individualmente, de forma secuencial o como modos mezclados.

[0032] Un aspecto de la invención se refiere a una solución resistente a la gelificación/fibrilación/agregación donde la concentración de TRIS varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1000 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 75 mM, de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 50 mM, y de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM.

[0033] Otro aspecto se refiere a métodos de la invención donde el pH de la solución es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, y de aproximadamente 3 a aproximadamente 9,5.

[0034] Otro aspecto se refiere a métodos de la invención donde el modificador orgánico está presente en una concentración de 1% p/p a 70% p/p y de 1% p/p a 50% p/p.

[0035] Gelificación/fibrilación/agregación se puede estimar por la prueba de la Tioflavina T (ref. ?) dando como resultado una respuesta coloreada del grado de gelificación. Otro resultado sería viscosidad aumentada de la solución gelatinizada dando como resultado contrapresión en aumento en columnas cromatográficas durante múltiples ejecuciones - esta es normalmente la primera indicación de que la gelificación se está produciendo, que usted obtendrá.

[0036] Otras características de la invención se volverán aparentes en el curso de las siguientes descripciones de formas de realización ilustrativas que se dan como ilustración de la invención y no se destinan a ser limitadoras de la misma.

**EJEMPLOS**

Ejemplo 1

[0037] Una solución acuosa de Arg34-GLP-1[7-37] que contiene aproximadamente 2% en peso de etanol y 10 mM de tris(hidroximetil)aminometano, a pH 9,2 fue hecha a temperatura ambiente, el pH fue ajustado a 3,2. La estabilidad de temperatura ambiente de la solución fue controlada por RP-HPLC.

[0038] La solución fue cargada en una columna de intercambio de iones, Source 305, Amersham Bioscience, a pH 3,23 y después del lavado de la columna con un tampón ácido que contiene etanol y ácido cítrico, el producto fue eluido con una solución acuosa conteniendo 10 mM Tris a pH 9.2. La estabilidad de temperatura ambiente del eluato de la columna fue controlada por RP-HPLC (tabla 1)/( Fig. 1).

Tabla 1:

Día	Arg34-GLP-1 [7-37] concentración en la solución de carga	Arg34-GLP-1[7-37] Concentración de eluato
0	1.7 Mg/ml	1.4 Mg/ml
1	1.7 Mg/ml	1.4 Mg/ml
2	1.7 Mg/ml	1.4 Mg/ml
3	No analizado	1.3 Mg/ml
4	No analizado	No analizado
5	1.7 Mg/ml	No analizado

[0039] Gelificación/fibrilación/agregación no fue observada en ninguna de las muestras evaluadas.

Ejemplo comparativo 1

[0040] Una prueba comparativa con 20-200 mM de glicina en vez de tris(hidroximetil)aminometano fue realizada. Una solución acuosa de Arg34-GLP-1[7-37] conteniendo aproximadamente 2% de etanol en peso y 20 mM de glicina, a pH 9.0 fue hecha a temperatura ambiente, el pH fue ajustado a aproximadamente 3.3.

La solución fue cargada en una columna de intercambio de iones, Source 30S, Amersham Bioscience, a pH 3.3 y después del lavado de la columna con un tampón ácido conteniendo etanol y ácido cítrico, el producto fue eluido con una solución acuosa conteniendo 200 mM de glicina a pH 9.5. La estabilidad del eluato de la columna fue controlada por RP-HPLC a temperatura ambiente durante 5 días.

Tanto la solución de carga como el eluato presentaron estabilidad de menos de un día a temperatura ambiente como

## ES 2 442 223 T3

resultado de fibrilación.

### Ejemplo 2

5 [0041] Una solución acuosa de Arg34-GLP-1[7-37] conteniendo aproximadamente 2% en peso de etanol y 10 mM de tris(hidroximetil)aminometano, a pH 9,2 fue hecha a temperatura ambiente por disolución de un precipitado isoeléctrico Arg34-GLP-1[7-37] directamente en la solución. Posteriormente, el pH fue ajustado a 3.2.

10 [0042] Una alícuota preparatoria de la solución fue cargada en una columna de intercambio iónico a gran escala, 20 cm I.D. (diámetro interno), Source 30S, Amersham Bioscience, a pH 3,3 y después del lavado de la columna con un tampón ácido conteniendo etanol y ácido cítrico para eliminar impurezas, el producto fue eluido con una solución acuosa conteniendo 10 mM de Tris a pH 9,2. La columna fue regenerada con 1 M de NaOH, equilibrada con el tampón de lavado ácido, y la columna fue cargada nuevamente con solución de carga. El pH del eluato de la columna Source 30S fue automáticamente ajustado con 100 mM de tampón tris pH 7.4 a pH 8.0.

15 [0043] Después de 60 ejecuciones en la columna Source 30S ningún cambio en la presión fue observado, por tanto ninguna fibrilación ocurrió en la columna, y ninguna fibrilación fue observada en la solución de carga y eluato.

### Ejemplo 3

20 [0044] Una solución acuosa de N<sup>ε</sup>-hexadecanoil- $\omega$ -glutamyl-Lys26-Arg34-GLP-1[7-37] que contiene aproximadamente 2% en peso de etanol y 10 mM de tris(hidroximetil)aminometano, a pH 9,2 fue hecha a temperatura ambiente por disolución de un precipitado isoeléctrico N<sup>ε</sup>-hexadecanoil- $\gamma$ -glutamyl-Lys26-Arg34-GLP-1[7-37] directamente en la solución.

25 [0045] Una alícuota preparatoria de la solución fue cargada en una columna de intercambio iónico a gran escala, 45 cm I.D. (diámetro interno), Source 30Q, Amersham Bioscience, a pH 9,2 y después del lavado de la columna con un tampón conteniendo 20 mM de tris y 63% en peso de etanol (pH 7,5) para eliminar impurezas, el producto fue eluido por un gradiente de cloruro sódico a pH 7,5 en un tampón de tris 20mM conteniendo 63% en peso de etanol. La columna fue regenerada con 1 M de NaOH, equilibrada con el tampón de lavado de pH 7.5, y la columna fue cargada nuevamente con solución de carga. El eluato de la columna de Source 30Q fue automáticamente diluido con agua antes de ser cargado en otra columna de gran escala, columna RP-HPLC 100Å C-18, diámetro de partícula 15 $\mu$ m, columna I.D. 45 cm, y eluido con una solución tampón conteniendo 20 mM de tris, 125 mM de cloruro sódico y aprox. 45 % en peso de etanol a pH 6.9. La columna fue regenerada con un solución de etanol al 70% y posteriormente equilibrada con una solución de etanol al 25% conteniendo 20 mM de Tris.

35 [0046] Después de 60 ejecuciones en la columna Source 30Q al igual que en la columna RP-HPLC ningún cambio en la presión fue observado, por tanto ninguna fibrilación ocurrió en la columna, y ninguna fibrilación fue observada en las soluciones de carga y eluatos.

### Ejemplo 4:

40 [0047] Una solución acuosa de Arg34-GLP-1[7-37] conteniendo aproximadamente 2% en peso de etanol y 10 mM de tris(hidroximetil)aminometano, a pH 9,2 fue hecha a temperatura ambiente, el pH fue ajustado a 3,2.

45 [0048] Alícuota de la solución fue cargada en una columna de intercambio de iones, 45 cm i.d., Source 30S, Amersham Bioscience, a pH 3,3 y después del lavado de la columna con un tampón ácido conteniendo etanol y ácido cítrico, el producto fue eluido con una solución acuosa conteniendo 10 mM de Tris a pH 9,2. La columna fue regenerada y cargada nuevamente con solución de carga. Después de 283 ejecuciones en la columna Source 30S, sin cambio en la presión, el material de columna fue analizado para proteínas agregadas/fibriladas y no hubo ninguna observación de proteínas o proteínas agregadas/fibriladas en el material de la columna.

### Ejemplo 5:

55 [0049] Una solución acuosa de N<sup>ε</sup>-hexadecanoil- $\gamma$ -glutamyl-Lys26-Arg34-GLP-1[7-37] conteniendo aproximadamente 2% en peso de etanol y 10 mM de tris(hidroximetil)aminometano, a pH 9,2 fue hecha a temperatura ambiente. Alícuota de la solución fue cargada a una columna de intercambio de iones, 45 cm i.d., Source 30Q, Amersham Bioscience, a pH 9.2 y después del lavado de la columna con un tampón neutro conteniendo 20 mM de tris y 63% en peso de etanol (pH 7.5), el producto fue eluido por un gradiente de cloruro sódico a pH 7.5 en un tampón 20mM de tris conteniendo 63% en peso de etanol. La columna fue regenerada y cargada nuevamente con solución de carga. Un eluato de la columna Source 30Q fue automáticamente diluido con agua antes de ser aplicado a otra columna, columna RP-HPLC 100Å C-18, diámetro de partícula i.d. 15 $\mu$ m, columna i.d. 45 cm, y eluido con un tampón que contiene 20 mM de tris, 125 mM de cloruro sódico y

## ES 2 442 223 T3

aprox. 45 % en peso de etanol a pH 6.9. Después de 77 ejecuciones en la columna Source 30Q, sin cambio en la presión, el material de la columna fue analizado para proteínas agregadas/fibriladas y no hubo ninguna observación de proteínas agregadas/fibriladas en el material de la columna. El material de la columna RP-HPLC fue analizado después de 49 ejecuciones para proteínas agregadas/fibriladas y nuevamente no hubo observaciones de proteínas agregadas/fibriladas en el material de la columna.

[0050] Los resultados de los experimentos muestran que el proceso y purificación se pueden estabilizar por el uso de TRIS, tanto como un aditivo y como una sustancia tampón.

[0051] Todas las referencias, incluyendo publicaciones, solicitudes de patente, y patentes, citadas aquí son incorporadas en la presente como referencia hasta la misma extensión que si cada referencia fuera individualmente y específicamente indicada para ser incorporada como referencia y están expuestas en su totalidad en la presente (hasta la extensión máxima permitida por la ley).

Cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de las mismas está comprendida por la invención a menos que se indique lo contrario aquí o por el contrario se contradiga claramente por el contexto.

El uso de los términos "un" y "el" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se deben interpretar para cubrir el singular y el plural, a menos que se indique lo contrario aquí o se contradiga claramente por el contexto.

Los términos "comprendiendo", "teniendo", "incluyendo" y "conteniendo" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, significando "incluyendo, pero no limitado a") a menos que se indique lo contrario y debe interpretarse como comprendiendo las frases "consistiendo", "sustancialmente compuesto de" y "que consiste esencialmente de" (p. ej., cuando se hace una descripción de una composición "comprendiendo" un ingrediente particular, se debe entender que la invención también proporciona por el contrario otra composición idéntica caracterizada por, en la parte pertinente, que consiste esencialmente del ingrediente y (independientemente) una composición que consiste solamente en el ingrediente).

Recitación de rangos de valores aquí son meramente destinados a servir como un método abreviado de referencia individualmente para cada valor separado comprendido en el rango, a menos que se indique lo contrario aquí, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si estuviese individualmente citado en la presente. A menos que se indique lo contrario, todos los valores exactos proporcionados en la presente son representativos de valores aproximados correspondientes (p. ej., todos los valores ejemplares exactos provistos con respecto a un factor o medición particular se pueden considerar para proporcionar también una medición aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente," cuando convenga).

Todos los métodos descritos aquí se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente o se indique lo contrario claramente por el contexto.

El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o la expresión ejemplar (p. ej., "tal como") proporcionada en la presente, se destina solamente a clarificar mejor la invención y no plantea una limitación en el ámbito de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión en la especificación debería ser interpretada como indicando un elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

[0052] La citación e incorporación de documentos de patente es aquí realizada sólo por conveniencia y no refleja una vista de la validez, patentabilidad, y/o ejecutabilidad de tales documentos de patente.

[0053] Formas de realización preferidas de esta invención son descritas aquí. Variaciones de aquellas formas de realización preferidas pueden resultar aparentes para los expertos en la materia tras la lectura de la descripción precedente. Los inventores esperan que los artesanos expertos empleen tales variaciones como convenga, y los inventores intentan que la invención sea puesta en práctica de otra manera que como se ha descrito aquí específicamente. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del objeto indicado en las reivindicaciones anexas aquí según está permitido por la ley aplicable.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método de estabilización de una solución acuosa de péptido, polipéptido o proteína, y análogos y/o derivados de los mismos, comprendiendo: la adición de una cantidad de tris(hidroximetil)aminometano a la solución acuosa suficiente para inducir estabilización, donde el tris(hidroximetil)-aminometano es un agente tampón o un aditivo donde la solución acuosa comprende además un modificador orgánico que es seleccionado de: metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, butanol, hexilenglicol, acetonitrilo y n-metil-2-pirrolidona, y donde el modificador orgánico está presente en una concentración de 1% p/p a 70% p/p.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde el modificador orgánico está presente en una concentración de 1% p/p a 50% p/p.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la solución acuosa tiene una concentración de tris(hidroximetil) aminometano de 1 mM a 1000 mM.
4. Método según la reivindicación 3, donde la solución acuosa tiene una concentración de tris(hidroximetil)aminometano de 1 mM a 200 mM.
- 20 5. Método según la reivindicación 3, donde la solución acuosa tiene una concentración de tris(hidroximetil)aminometano de 1 mM a 100 mM.
6. Método según la reivindicación 3, donde la solución acuosa tiene una concentración de tris(hidroximetil)aminometano de 2 mM a 75 mM.
- 25 7. Método según la reivindicación 3, donde la solución acuosa tiene una concentración de tris(hidroximetil)aminometano de 3 mM a 50 mM.
8. Método según la reivindicación 3, donde la solución acuosa tiene una concentración de tris(hidroximetil)aminometano de 5 mM a 25 mM.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 donde la solución acuosa tiene un pH de 1.0 a 10.0.
10. Método según la reivindicación 9 donde la solución acuosa tiene un pH de 3.0 a 9.5.
- 35 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el péptido, polipéptido o proteína es seleccionado de: péptidos de tipo glucagón (GLPs) y sus análogos y derivados.
- 40 12. Método según la reivindicación 11, donde el GLP es seleccionado del grupo: GLP-1 y análogos de GLP-1 y sus derivados, GLP-2 y análogos de GLP-2 y sus derivados, y exendina-4 y sus análogos y derivados.
- 45 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el péptido, polipéptido o proteína es seleccionado de: proinsulinas, insulinas, y sus análogos y derivados.

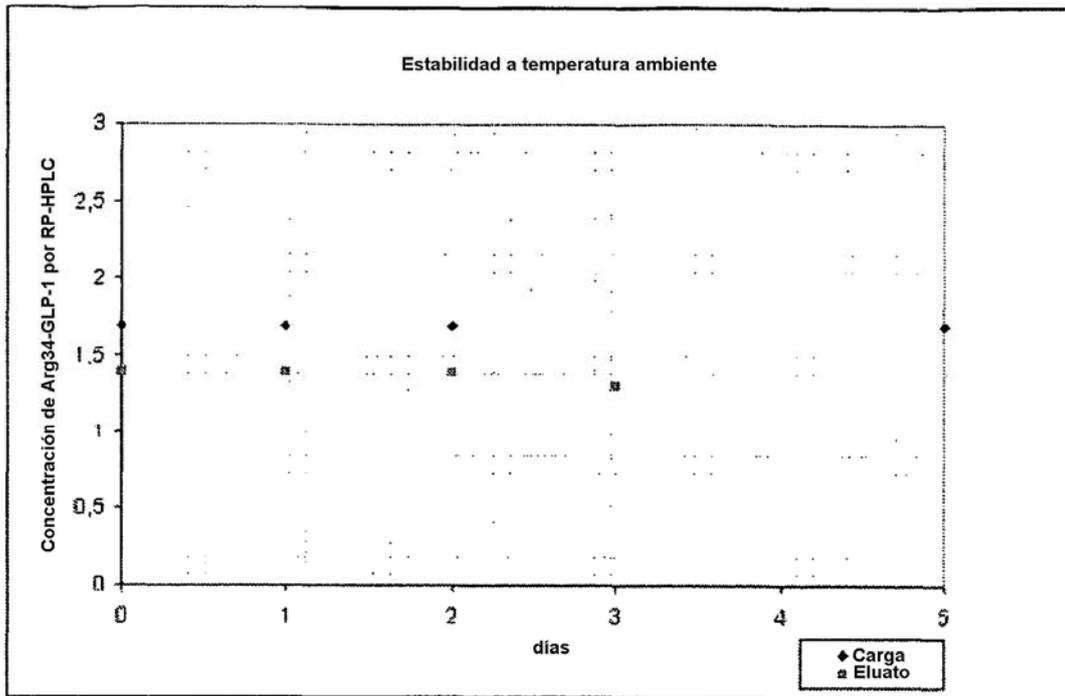


Fig. 1