(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 759 987**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2013** **PCT/KR2013/006670**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014** **WO14017845**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2013** **E 13823275 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019** **EP 2877158**

(54) Título: **Una formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada**

(30) Prioridad:

25.07.2012 KR 20120081476

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2020

(73) Titular/es:

HANMI PHARM. CO., LTD. (100.0%)
214 Muha-ro, Paltan-myeon
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-958, KR

(72) Inventor/es:

KIM, HYUN UK;
LIM, HYUNG KYU;
HONG, SUNG HEE;
KIM, DAE JIN;
BAE, SUNG MIN y
KWON, SE CHANG

(74) Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 759 987 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

Una formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada

Campo técnico

La presente invención se refiere a una formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada, que comprende una cantidad con eficacia farmacéutica del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en la que un péptido activo fisiológicamente, que es un péptido insulinotrópico, se une a una región Fc de inmunoglobulina; y un estabilizador libre de albúmina, en la que el estabilizador comprende un tampón, un alcohol de azúcar, y un tensioactivo no iónico; y en la que el péptido insulinotrópico es exendina–3, exendina–4, o imidazo–acetil exendina–4; y en la que el tampón es un tampón citrato, el alcohol de azúcar es manitol o sacarosa, y el tensioactivo no iónico es polisorbato.

Técnica antecedente

La diabetes es una enfermedad derivada de múltiples factores patogénicos y, generalmente, hay dos tipos de diabetes. Los pacientes con diabetes tipo I o diabetes mellitus insulinodependiente (IDDM) apenas producen o no pueden producir insulina, que es una hormona que regula el uso de los carbohidratos. Y los pacientes con diabetes tipo II o diabetes mellitus no insulinodependiente (NIDDM) muestran el mismo nivel de insulina en plasma, o un aumento, en comparación con los pacientes que no padecen diabetes. Sin embargo, los pacientes con diabetes tipo II desarrollan una resistencia al metabolismo de glucosa y lípidos estimulados por insulina, en los principales tejidos sensibles a la insulina, es decir, músculo, hígado, y tejido adiposo. Aunque el nivel de insulina en plasma puede aumentarse, no es suficiente para superar la significativa resistencia a la insulina, lo que provoca hiperglucemia. La hiperglucemia continuada o no regulada se asocia con un aumento de la tasa de morbilidad y de la tasa de mortalidad tempranas. Muchas veces, el aumento anormal en el nivel de azúcar se relaciona, directa e indirectamente, con los cambios metabólicos y hemodinámicos en las enfermedades asociadas con los metabolismos de lípidos, lipoproteínas, apolipoproteínas, y otros. Por ejemplo, los pacientes con diabetes mellitus tipo II, específicamente, tienen un alto riesgo de desarrollar una enfermedad cardiaca coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, hipertensión, nefropatía, y neuropatía, así como también hemangioma gigante y complicaciones microvasculares.

Las terapias usadas actualmente para tratar la diabetes tipo II incluyen la administración de insulina exógena, la administración oral de fármacos, la terapia dietética, y la terapia con ejercicios. En 2005, la exenatida (Exendina–4: Byetta®) fue aprobada por la FDA como una terapia complementaria para pacientes con diabetes tipo II que no consiguieron la regulación adecuada de la glucosa incluso con la ingestión de metformina y/o sulfonilurea.

La exenatida (exendina–4) es un fuerte agonista del receptor GLP–1 y se produce en la glándula salival del lagarto. La exendina–4 muestra afinidad con la insulina, suprime la ingesta de alimentos y el vaciamiento gástrico, y muestra afinidad con las células β en roedores Parks y otros, Metabolism. 50: 583–589, 2001; Aziz and Anderson, J. Nutr. 132: 990–995, 2002; and Egan y otros, J. Clin. Endocrinol. Metab. 87: 1282–1290, 2002). Además, como la glicina está presente en la posición 2 del extremo N terminal de la exidina–4, no es un sustrato para la DPP IV, a diferencia de GLP–1. La desventaja de usar exenatida es una vida media corta (t1/2) que es solo de 2 a 4 horas, y por lo tanto esta debe inyectarse dos veces al día (Kolterman y otros, J. Clin. Endocrinol. Metab. 88: 3082–3089, 2003 y Fineman y otros, Diabetes Care. 26: 2370–2377, 2003).

Los péptidos similares a la exenatida descrita anteriormente son fácilmente desnaturalizados o degradados por las proteasas en el cuerpo debido a la baja estabilidad, y pierden la actividad. Además, el tamaño de las exenatidas es relativamente pequeño y, por lo tanto, se eliminan fácilmente por el riñón. Por lo tanto, los fármacos que contienen péptidos como ingredientes activos farmacéuticamente tienen que administrarse con frecuencia a los pacientes para mantener el nivel sérico objetivo y el título de estos. En su mayoría, los fármacos peptídicos se administran a los pacientes en forma de inyección y con alta frecuencia para mantener el nivel sérico del péptido activo fisiológicamente, pero esto causa mucho dolor en los pacientes.

Ha habido muchos intentos para solucionar estos problemas, y uno de ellos fue el suministro de un fármaco peptídico al cuerpo a través de la inhalación oral o nasal mediante el aumento de la permeabilidad de la biomembrana al fármaco peptídico. Sin embargo, este método tiene una eficiencia significativamente baja para el suministro del péptido al cuerpo en comparación con las inyecciones. Por lo tanto, aún existen muchas limitaciones para mantener la actividad del fármaco peptídico *in vivo* en el nivel requerido.

Mientras tanto, ha habido continuos intentos de maximizar los efectos terapéuticos del fármaco mediante una mejora de la estabilidad del fármaco peptídico en la sangre y mediante el mantenimiento de un alto nivel del fármaco en la sangre durante un período de tiempo prolongado. Estas formulaciones de fármacos peptídicos de acción prolongada deberían promover una mayor estabilidad del fármaco peptídico y, además, mantener un título suficientemente alto del propio fármaco sin inducir respuestas inmunes en los pacientes.

Como un método para estabilizar los péptidos y evitar la degradación de los péptidos por proteasas, ha habido muchos intentos de modificar una secuencia de aminoácidos específica sensible a proteasas. Por ejemplo, el GLP–1 (7–37 o 7–36 amida) que es eficaz en el tratamiento de la diabetes tipo II mediante la disminución del nivel de glucosa en sangre tiene una vida media tan corta como inferior a 4 minutos (Kreymann y otros, 1987). La vida media corta se debe a la pérdida del título de GLP–1 a través de la escisión del péptido entre el aminoácido núm. 8 (Ala) y el núm. 9 (Asp) de GLP–1 por la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV). Por lo tanto, se han realizado muchos estudios sobre el desarrollo de derivados de GLP–1 que tienen resistencia a la DPP IV, y en estos estudios, la Ala^8 se sustituyó por Gly (Deacon *y otros,* 1998; Burcelin *y otros,* 1999), o por Leu o D–Ala (Xiao *y otros,* 2001) para aumentar la resistencia a la DPP IV al mismo tiempo que se mantiene la actividad peptídica. Además, el aminoácido N–terminal de GLP–1, His^7, es un aminoácido importante para la actividad de GLP–1 y, además, una diana de la DPP IV, y por lo tanto en el documento US 5,545,618, el extremo N terminal se sustituyó por un grupo alquilo o un grupo acilo. Igualmente, en Gallwitz y otros, la His^7 estaba N–metilada o alfa–metilada, o la His completa se sustituyó por imidazol para aumentar la resistencia del péptido a la DPP IV mientras se mantenía la actividad biológica (Baptist Gallwitz, y otros, Regulatory Peptides 86, 103–111, 2000).

Además de estas variantes, la exenatida (exendina–4, documento US 5,424,686) que es un derivado de GLP–1 purificado de una glándula salival de monstruo de gila tiene una resistencia a la DPP IV y una actividad biológica mayor que GLP–1, por lo que tiene una vida media en el cuerpo de 2 a 4 horas, que es mucho más larga que la de GLP–1. Sin embargo, una duración suficiente de la actividad biológica *in vivo* no puede derivarse únicamente mediante el aumento de la resistencia del péptido a la DPP IV. Por ejemplo, la exendina–4 (exenatida) disponible actualmente tiene que administrarse a los pacientes dos veces al día, mediante inyecciones, lo que supone una carga excesiva para los pacientes.

Una limitación de estos péptidos insulinotrópicos es que el tamaño del péptido es demasiado pequeño para recolectarse en el riñón y, por lo tanto, se pierde fácilmente fuera del cuerpo. Por lo tanto, para evitar la pérdida del péptido a través del riñón, a la superficie del péptido se unió una macromolécula altamente soluble, tal como el polietilenglicol (PEG).

El PEG se une a un sitio específico, o a varios sitios de un péptido diana, de forma inespecífica y aumenta el peso molecular del péptido, lo que entonces evita la pérdida del péptido a través del riñón y la hidrólisis del péptido, sin causar efectos secundarios. Por ejemplo, el documento WO2006/076471 divulga que mediante la unión del PEG a un péptido natriurético de tipo B (BNP), que activa la producción de cGMP mediante la unión a NPR–A y disminuye la presión intraarterial, por lo que es efectivo como agente terapéutico para la insuficiencia cardíaca congestiva, puede mantenerse la actividad biológica del BNP. Igualmente, el documento US 6,924,264 describe un método para aumentar la durabilidad *in vivo* de la exidina–4 mediante la unión del PEG al residuo de lisina de una exidina–4. Sin embargo, si bien estos métodos pueden extender la durabilidad *in vivo* de un fármaco peptídico mediante el aumento del peso molecular del PEG, el título del fármaco peptídico disminuye notablemente a medida que aumenta el peso molecular del PEG y, además, la reactividad del PEG con el péptido disminuye, por lo que disminuye el rendimiento.

Como otro método para aumentar la estabilidad *in vivo* del péptido activo fisiológicamente, se desarrolló un método para producir una proteína de fusión, donde los genes para el péptido y la proteína activa fisiológicamente se unen mediante recombinación genética y se cultivan las células transformadas con el gen recombinante. Por ejemplo, se informó previamente una proteína de fusión que produce exendina–4 que se fusiona a transferrina (Tf) a través del enlazador polipéptido (solicitud de patente coreana núm. 10–2009–7003679). Además, como un método para usar la inmunoglobulina, se divulgó anteriormente, además, una proteína de fusión del derivado de GLP–1 la que el derivado de GLP–1 se fusiona a la IgG4 Fc, (solicitud de patente coreana núm. 10–2007–7014068).

El documento WO 2009/069983A2 divulga un método de preparación, en el que una región Fc de inmunoglobulina, un enlazador no peptidílico, y un péptido insulinotrópico, en particular la exendina–4 o la imidazo–acetil–exendina–4, se unen covalentemente entre sí como un conjugado para maximizar los efectos de aumentar la vida media en sangre del péptido insulinotrópico y de mantener la actividad in vivo.

Recientemente, como una formulación de fármaco peptídico y proteínas de acción prolongada que puede promover una disminución mínima en la actividad y una mayor estabilidad, se divulga un conjugado generado mediante la combinación de la región Fc de inmunoglobulina, el polímero no peptidílico, y el polipéptido activo fisiológicamente en el Registro de Patente Coreano núm. 10–0567902 (Conjugado de polipéptido activo fisiológicamente que tiene durabilidad *in vivo* mejorada) y en el Registro de Patente Coreano 10–0725315 (Complejo de proteínas mediante el uso de un fragmento de inmunoglobulina y método para la preparación de este).

Mediante el método anterior, el péptido insulinotrópico puede aplicarse como un polipéptido activo fisiológicamente para preparar un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada (Registro de Patente Coreana núm. 10–2008–0001479). Para fabricar el fármaco que comprende un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada, es esencial evitar cambios fisicoquímicos tales como la desnaturalización inducida por calor, agregación, adsorción, o hidrólisis causada por la luz, el calor, o las impurezas en los aditivos durante los procesos de almacenamiento y suministro, mientras que se mantiene la eficacia *in vivo*. En particular, un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada tiene un mayor volumen y peso molecular en comparación con el propio péptido insulinotrópico, y por lo tanto, es difícil de estabilizar.

Generalmente, las proteínas y los péptidos tienen una vida media corta y pueden sufrir desnaturalización, tal como la agregación de monómeros, la precipitación por agregación, y la adsorción a la superficie del recipiente, cuando se exponen a temperaturas inadecuadas, interfaz agua–aire, alta presión, estrés mecánico o físico, solventes orgánicos, y contaminación microbiana. Las proteínas y péptidos desnaturalizados pierden sus propiedades fisicoquímicas inherentes y su actividad fisiológica. Dado que la desnaturalización de proteínas es irreversible en la mayoría de los casos, las proteínas y péptidos desnaturalizados no pueden recuperar sus propiedades inherentes. Además, es probable que las proteínas sean inestables y fácilmente afectadas por factores externos tales como la temperatura, la humedad, el oxígeno, los rayos ultravioleta y, por lo tanto, sufren cambios físicos o químicos que incluyen agregación, polimerización, u oxidación, por lo que pierden actividad.

Además, las proteínas y péptidos adsorbidos son aptos para agregarse a medida que se desnaturalizan, y cuando las proteínas y péptidos agregados se introducen en el cuerpo, pueden causar la formación de anticuerpos. Por lo tanto, deben administrarse proteínas y péptidos suficientemente estables. A este respecto, se han desarrollado diversos métodos para evitar la desnaturalización de proteínas y péptidos en solución (John Geigert, J. Parenteral Sci. Tech., 43, No5, 220–224, 1989, David Wong, Pharm. Tech. Octubre, 34–48, 1997, Wei Wang., Int. J. Pharm., 185, 129–188, 1999, Willem Norde, Adv. Colloid Interface Sci., 25, 267–340, 1986, Michelle y otros, Int. J. Pharm. 120, 179–188, 1995).

Para producir algunos de los fármacos proteicos y peptídicos, se ha usado un proceso de liofilización para solucionar el problema de la estabilidad. Sin embargo, este proceso es inconveniente porque los productos liofilizados, antes de usar, deben disolverse nuevamente en solventes para inyección, y esto requiere una inversión a gran escala, tal como el uso de una gran cantidad de liofilizadores, ya que el proceso de liofilización está involucrado en el proceso de fabricación. Alternativamente, se ha usado, además, el método de pulverización mediante el uso de un secador por pulverización. Sin embargo, este método tiene un valor económico bajo debido al bajo rendimiento del producto y puede tener un efecto negativo sobre la estabilidad del producto debido a que las proteínas se exponen a altas temperaturas.

Como un enfoque alternativo para solucionar estas limitaciones, otros estudios intentaron añadir estabilizadores a la proteína y al péptido en solución para evitar los cambios fisicoquímicos del fármaco proteico mientras que se mantenía la eficacia *in vivo* de estos durante el almacenamiento de larga duración. Se ha usado ampliamente un tipo de proteína, la albúmina sérica humana, como un estabilizador para diversos fármacos proteicos, y se ha aprobado la eficacia de estos (Edward Tarelli y otros, Bio–logicals(1998) 26, 331–346).

La purificación de la albúmina sérica humana implica la inactivación de contaminantes biológicos tales como micoplasma, priones, bacterias, y virus, o la detección o inspección de uno o más contaminantes biológicos o patógenos, pero incluso con estos procesos, esos contaminantes pueden no eliminarse o inactivarse completamente. Por lo tanto, los pacientes pueden exponerse a esos contaminantes biológicos o patógenos cuando se administran con albúmina sérica humana. Por ejemplo, aunque el proceso de detección implica la inspección de determinados virus en la muestra de sangre del donante, el proceso de inspección no siempre es confiable y no puede detectar determinados virus que están presentes en pequeña cantidad.

Debido a sus diferencias químicas, diversas proteínas pueden inactivarse gradualmente a diferentes velocidades en diferentes condiciones durante el almacenamiento. Es decir, la extensión del plazo de almacenamiento por un estabilizador no es la misma para diversas proteínas. Por esta razón, la relación adecuada, la concentración, y el tipo de estabilizadores que se usan para mejorar la estabilidad de almacenamiento de las proteínas varían dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de una proteína diana. Además, cuando se usan diferentes estabilizadores juntos, pueden inducir efectos adversos diferentes de los deseados, debido a la interacción competitiva y a los efectos secundarios. Además, durante el almacenamiento, la propiedad de la proteína almacenada o la concentración de esta pueden cambiar, por lo que causa diferentes efectos.

Por lo tanto, se requieren muchos esfuerzos y precauciones para estabilizar las proteínas en solución. En particular, un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada que tiene durabilidad y estabilidad *in vivo* mejoradas, tiene una forma de péptido insulinotrópico, combinado con la región Fc de inmunoglobulina, y por lo tanto tiene un peso molecular y un volumen significativamente diferentes en comparación con el péptido insulinotrópico general. Por lo tanto, se requiere una composición especial para estabilizar la proteína. Además, un péptido insulinotrópico y una región Fc de inmunoglobulina son péptidos o proteínas fisicoquímicamente diferentes y, por lo tanto, deben estabilizarse al mismo tiempo. Sin embargo, como se describió anteriormente, diferentes péptidos o proteínas pueden inactivarse gradualmente a diferentes velocidades en diferentes condiciones durante el almacenamiento debido a la diferencia fisicoquímica de estos. Además, cuando los estabilizadores que son adecuados para cada péptido o proteína se usan juntos, pueden inducir efectos adversos diferentes de los efectos deseados, debido a la interacción competitiva y a los efectos secundarios. Por lo tanto, en cuanto a un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada, es muy difícil encontrar una composición estabilizadora que pueda estabilizar tanto a un péptido insulinotrópico como a una región Fc de inmunoglobulina al mismo tiempo.

Recientemente, se desarrolló una formulación de proteína y péptido que puede usarse repetidamente para la conveniencia del paciente. Sin embargo, la formulación de uso múltiple debe contener un conservante para evitar la contaminación microbiana después de administraciones repetidas y antes de su eliminación. La formulación de uso múltiple que contiene conservante tiene unas pocas ventajas en comparación con una formulación de uso único. Por

ejemplo, en cuanto a una formulación de uso único, se desperdicia una gran cantidad de fármaco dependiendo de la diferencia en la dosificación. Pero, mediante el uso de una formulación de uso múltiple, puede disminuirse la cantidad del producto desperdiciado. Además, la formulación de uso múltiple puede usarse varias veces sin preocuparse por el crecimiento microbiano dentro de un período determinado, y debido a que puede suministrarse en un solo contenedor, puede minimizarse el embalaje, lo que genera beneficios económicos.

Sin embargo, el uso de conservantes puede afectar la estabilidad de la proteína. El problema más conocido en el uso de conservantes es la cuestión de la precipitación. La precipitación de proteínas puede disminuir los efectos terapéuticos del fármaco y cuando se administra al cuerpo puede inducir una respuesta inmune inesperada. Por lo tanto, es crítico seleccionar un tipo y una concentración adecuada de conservante que mantenga la capacidad de evitar la contaminación microbiana sin afectar la estabilidad de la proteína.

Divulgación de la invención

Problema técnico

En un esfuerzo para proporcionar una formulación líquida estable del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada que pueda almacenar el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada durante un largo período de tiempo sin el riesgo de contaminación viral, la presente invención encontró que una formulación que mejora la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada podría proporcionarse mediante el uso de un estabilizador que comprende un tampón, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico, y un agente isotónico, o adicionalmente metionina, y que la formulación puede usarse múltiples veces cuando se usa un conservante que se incluye adicionalmente en la formulación, por lo que, de esta manera, se constituye una formulación líquida rentable y estable.

Solución al problema

Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada, que comprende una cantidad con eficacia farmacéutica del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en la que un péptido activo fisiológicamente, es decir, el péptido insulinotrópico se une a una región Fc de inmunoglobulina; y un estabilizador libre de albúmina, en la que el estabilizador comprende un tampón, un alcohol de azúcar, y un tensioactivo no iónico; y en la que el péptido insulinotrópico es exendina–3, exendina–4, o imidazo–acetil exendina–4; y en la que el tampón es un tampón citrato, el alcohol de azúcar es manitol o sacarosa, y el tensioactivo no iónico es polisorbato.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada para administraciones múltiples, que comprende, además, un conservante además del conjugado de péptido insulinotrópico y el estabilizador libre de albúmina.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar la formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada.

Efectos ventajosos de la invención

Como la formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de la presente invención comprende un tampón, un agente isotónico, un alcohol de azúcar, y un tensioactivo no iónico, o adicionalmente metionina, pero está libre de albúmina sérica humana y de otros factores potencialmente peligrosos para el cuerpo, por lo tanto, no hay riesgo de contaminación viral. Además, puede proporcionar una excelente estabilidad de almacenamiento para un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada que comprende un péptido insulinotrópico y una región Fc de inmunoglobulina, por lo que tiene un peso molecular más elevado y una duración de la actividad fisiológica *in vivo* mejorada en comparación con la proteína de tipo silvestre. Tal formulación líquida de la presente invención puede proporcionar una excelente estabilidad de almacenamiento con una formulación simple y proporcionar el fármaco peptídico de manera más rentable en comparación con otros estabilizadores y liofilizados. Si se adiciona un conservante a la formulación, la formulación puede usarse múltiples veces. Además, la presente formulación puede retener la actividad de la proteína en el cuerpo durante un período más largo en comparación con una formulación convencional de péptido insulinotrópico, y por lo tanto puede usarse como una formulación de fármaco eficaz.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra el análisis por RP–HPLC de la estabilidad del péptido en la formulación líquida seleccionada finalmente a un pH de 5,2 (Formulación Líquida #1), la formulación líquida preparada mediante la aplicación de un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a una composición estabilizadora de formulación líquida del fármaco peptídico insulinotrópico disponible comercialmente, exenatida, es decir, exendina–4 (Byetta) (Formulación Líquida #2), la formulación líquida preparada mediante la aplicación de un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a una composición estabilizadora de la formulación líquida del fármaco

de la proteína de fusión de inmunoglobulina, etanercept (proteína de fusión TNFR–Fc, ENBREL) (Formulación Líquida #3) y un grupo de control (Formulación Líquida #4), todas se almacenaron a 25±2 °C durante 8 semanas.
La Figura 2 es un gráfico que muestra el análisis por RP–HPLC de la proporción de conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada oxidado en la formulación líquida seleccionada finalmente a un pH de 5,2 sin metionina (Formulación Líquida #1) y en la formulación líquida a un pH 5,2 que comprende metionina (Formulación Líquida #2) mientras se almacena a 25±2 °C y a 40±2 °C durante 4 semanas.
La Figura 3 muestra los resultados de monitorear la ocurrencia de precipitación en las composiciones del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la Tabla 18, a simple vista, a 40 °C durante 48 horas. La duración de la ausencia de precipitación indica el tiempo durante el cual no se produce la precipitación de proteínas después de almacenar el péptido.
La Figura 4 muestra los resultados de monitorear la ocurrencia de precipitación en las composiciones del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la Tabla 19, a simple vista, a 40 °C durante 7 días. La duración de la ausencia de precipitación indica el tiempo durante el cual no se produce la precipitación de proteínas después de almacenar el péptido.

Mejor modo de realizar la invención

Como un aspecto, la presente invención proporciona una formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada, que comprende una cantidad con eficacia farmacéutica del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en la que un péptido insulinotrópico se une a una región Fc de inmunoglobulina; y un estabilizador libre de albúmina, en la que el estabilizador comprende un tampón, un alcohol de azúcar, y un tensioactivo no iónico; y en la que el péptido insulinotrópico es exendina–3, exendina–4, o imidazo–acetil exendina–4; y en la que el tampón es un tampón citrato, el alcohol de azúcar es manitol o sacarosa, y el tensioactivo no iónico es polisorbato.

Además, la presente invención proporciona una formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada para administraciones múltiples que, además, comprende un conservante además del conjugado de péptido insulinotrópico y el estabilizador libre de albúmina.

Como se usa en la presente descripción, "conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada" se refiere a un conjugado en donde un péptido insulinotrópico activo fisiológicamente que comprende un derivado, variante, precursor, y fragmento y una región Fc de inmunoglobulina están unidos, y puede referirse, además, a un conjugado que tiene una duración de la actividad fisiológica *in vivo* aumentada, en comparación con un péptido insulinotrópico de tipo silvestre.

Como se usa en la presente descripción, el término "acción prolongada" se refiere a un aumento de la duración de la actividad fisiológica en comparación con la de tipo silvestre. El término "conjugado" se refiere a la forma en donde se combinan un péptido insulinotrópico y la región Fc de inmunoglobulina.

El péptido insulinotrópico que se usa en la presente invención tiene una función de secretar insulina y estimula la síntesis y expresión de insulina en las células β pancreáticas. El tipo de péptido insulinotrópico incluye exendina–3, exendina–4, e imidazoacetil (CA) exendina–4, y con mayor preferencia, imidazoacetil (CA) exendina–4. Puede usarse cualquier péptido insulinotrópico, ya sea natural o recombinante, y preferentemente, es un péptido insulinotrópico recombinante generado mediante el uso de *E. coli* como una célula huésped.

La secuencia del péptido insulinotrópico puede obtenerse de una base de datos conocida tal como GenBank del NCBI, y puede tener 70 % o más, preferentemente 80 % o más, con mayor preferencia 90 % o más, e incluso con mayor preferencia 95 % o más, y con la máxima preferencia 98 % o más, de homología de secuencia con una proteína de tipo silvestre, siempre que se demuestre la actividad de un péptido insulinotrópico.

Además, la Fc de inmunoglobulina útil de la presente invención puede ser una Fc de inmunoglobulina humana o su análogo estrechamente relacionado o la Fc de inmunoglobulina derivada de animales tales como vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas, y cobayas. Además, la región Fc de inmunoglobulina puede derivarse de IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, o una combinación o híbrido de estas. Preferentemente, la Fc de inmunoglobulina se deriva de IgG o IgM que son más abundantes en la sangre humana, y con la máxima preferencia, se deriva de IgG la cual se conoce por mejorar la vida media de la proteína de unión a ligando. Además, la región Fc de inmunoglobulina puede ser un dímero o multímero de inmunoglobulinas monocatenarias que tienen dominios del mismo origen. La Fc de la inmunoglobulina puede generarse mediante el tratamiento a una IgG natural con una determinada proteasa, o a través de células transformadas mediante el uso de una técnica de recombinación genética. Preferentemente, la Fc de la inmunoglobulina es una Fc de inmunoglobulina humana recombinante que se produce en *E. coli.*

Mientras tanto, la IgG puede dividirse en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y en la presente invención puede usarse una combinación o híbrido de estas. Se prefieren las subclases IgG2 e IgG4, y con la máxima preferencia la región Fc de IgG4 que rara vez tiene la función efectora, tal como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Es decir, la región Fc de inmunoglobulina más preferida como un portador farmacológico de la presente invención es una región Fc aglicosilada derivada de IgG4 humana. La región Fc derivada de humano es más preferida que una región Fc no derivada de humano, que puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y causar respuestas inmunes indeseables, tal como la producción de un nuevo anticuerpo.

El conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada que se usa en la presente invención se prepara mediante la combinación del péptido insulinotrópico sintetizado y una región Fc de inmunoglobulina. El método para combinar los dos puede ser la formación de uniones cruzadas entre un péptido insulinotrópico y una región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptidílico o la producción de una proteína de fusión en la que el péptido insulinotrópico y una región Fc de inmunoglobulina se unen mediante recombinación genética.

El polímero no peptidílico que se usa para la formación de uniones cruzadas puede seleccionarse del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, alcohol de polivinilo, polisacáridos, dextrano, polivinil etil éter, polímeros biodegradables tales como PLA (poli (ácido láctico) y PLGA (poli (ácido láctico–glicólico), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico o una combinación de estos. Preferentemente, puede usarse polietilenglicol pero no se limita a este. Sus derivados bien conocidos en la técnica y los derivados que pueden prepararse fácilmente mediante el uso de un método conocido en la técnica están, además, dentro del ámbito de la presente invención.

Para preparar un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada que se usa en la presente invención, uno puede referirse al Registro de Patente Coreana núm. 10–0725315, Publicación de Patente Coreana núm. 10–2009–0008151, y el Registro de Patente Coreana núm. 10–1058290. Los expertos en la técnica pueden producir el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de la presente invención al referirse a esas referencias.

La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de la presente invención comprende un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en una cantidad con eficacia terapéutica. Generalmente, la cantidad con eficacia terapéutica de péptido insulinotrópico, específicamente exendina–4 (Byetta), se refiere a 250 µg en un inyector de pluma. La concentración del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada que se usa en la presente invención varía de 0,1 mg/ml a 200 mg/ml y, preferentemente, de 0,5 mg/ml a 150 mg/ml. El péptido insulinotrópico puede ser, preferentemente, un conjugado de CA exendina–4 de acción prolongada. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de la presente invención puede almacenar establemente el conjugado sin precipitación, no solo cuando el conjugado de péptido insulinotrópico está presente a baja concentración, sino además, cuando está presente a alta concentración. Por lo tanto, la presente formulación puede proporcionar de forma estable el péptido insulinotrópico a alta concentración dentro del cuerpo.

Como se usa en la presente descripción, el término "estabilizador" se refiere a una sustancia que permite el almacenamiento estable del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada. El término "estabilización" se refiere al estado en donde la pérdida de un ingrediente activo es inferior a una determinada cantidad, típicamente, inferior al 10 % durante un determinado período y en condiciones específicas de almacenamiento. Una formulación se considera como una formulación estable cuando la pureza residual del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en ella es del 90 % o más, y con mayor preferencia del 92 al 95 % después de almacenarse a 5±3 °C durante 2 años, a 25±2 °C durante 6 meses, o a 40±2 °C durante 1 a 2 semanas. Al igual que para las proteínas similares a los conjugados de péptido insulinotrópico de acción prolongada, la estabilidad de almacenamiento de estas es importante para proporcionar una dosificación precisa, así como también para suprimir la formación potencial de sustancias antigénicas contra el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada. Durante el almacenamiento, es aceptable una pérdida del 10 % del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada para una administración sustancial a menos que cause la formación de agregados o fragmentos en la composición, que conducen a la formación de compuestos antigénicos.

El estabilizador de la presente invención comprende, preferentemente, un tampón, un alcohol de azúcar, un agente isotónico tal como cloruro de sodio, y un tensioactivo no iónico, y con mayor preferencia comprende, además, metionina para estabilizar el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada.

El tampón funciona para mantener el pH de la solución para evitar un cambio brusco de pH en la formulación líquida para estabilizar el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada. El tampón puede incluir una sal alcalina (fosfato de sodio o potasio o las sales de hidrógeno o dihidrógeno de estos), citrato de sodio/ácido cítrico, acetato de sodio/ácido acético, histidina/clorhidrato de histidina, cualquier otro tampón de pH aceptable farmacéuticamente conocido en la técnica, y una combinación de estos. El ejemplo preferido de tal tampón incluye un tampón citrato, un tampón acetato, y un tampón histidina. La concentración de tampón es, preferentemente, de 5 mM a 100 mM, con mayor preferencia de 10 mM a 50 mM. El pH del tampón es, preferentemente, de 4,0 a 7,0, con mayor preferencia de 5,0 a 7,0, incluso con mayor preferencia de 5,2 a 7,0, e incluso con la máxima preferencia de 5,2 a 6,0.

El alcohol de azúcar actúa para aumentar la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada. La concentración del alcohol de azúcar que se usa en la presente invención es, preferentemente, del 1 a 20 % (p/v) basado en un volumen total de solución, con mayor preferencia de 3 a 10 % (p/v) basado en un volumen total de solución. Un alcohol de azúcar puede ser uno o más seleccionado del grupo que consiste en manitol y sacarosa.

Un agente isotónico actúa para mantener una presión osmótica adecuada cuando el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en solución se administra en el cuerpo y, además, actúa para estabilizar el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en solución. La presión osmótica de la formulación se ajusta para que sea isotónica con respecto a la sangre. Estas formulaciones líquidas isotónicas generalmente tienen una

presión osmótica de aproximadamente 300 mOsm/kg. Un ejemplo representativo de agente isotónico incluye un alcohol de azúcar, una sal inorgánica soluble en agua, y un aminoácido, y el ejemplo preferido es una sal inorgánica soluble en agua, es decir, cloruro de sodio. La concentración de cloruro de sodio como agente isotónico es, preferentemente, de 0 a 150 mM, y puede ajustarse dependiendo del tipo y la cantidad de componentes que se incluyen en la formulación de manera que la formulación líquida que incluye toda la mezcla se vuelva isotónica.

El tensioactivo no iónico disminuye la tensión superficial de la solución de proteína para evitar la absorción o la agregación de proteínas en una superficie hidrófoba. Los tensioactivos no iónicos útiles en la presente invención son los polisorbatos. Entre los tensioactivos no iónicos de polisorbatos se encuentran el polisorbato 20, el polisorbato 40, el polisorbato 60, y el polisorbato 80. El tensioactivo no iónico más preferido es el polisorbato 20.

Es inapropiado usar un tensioactivo no iónico a alta concentración en la formulación líquida, y esto se debe al hecho de que el tensioactivo no iónico a alta concentración induce efectos de interferencia cuando se mide la concentración de proteína y se determina la estabilidad de la proteína a través de métodos analíticos tales como la espectroscopía por UV o el isoelectroenfoque, lo que causa dificultades para examinar la estabilidad de la proteína con precisión. Por lo tanto, la formulación líquida de la presente invención comprende el tensioactivo no iónico, preferentemente, a una concentración baja, no más de 0,2 % (p/v), con mayor preferencia de 0,001 % a 0,05 % (p/v).

De acuerdo con un ejemplo de la presente invención, se demostró que cuando se añadió cloruro de sodio como agente isotónico en presencia de tampón, alcohol de azúcar, y tensioactivo no iónico, la estabilidad del almacenamiento del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a baja concentración aumentó significativamente. Esto indica que el uso de cloruro de sodio como agente isotónico simultáneamente con tampón, alcohol de azúcar, y tensioactivo no iónico induce efectos sinérgicos, lo que permite que el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada tenga una alta estabilidad. Sin embargo, en cuanto a un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración, cuando se excluyó el cloruro de sodio, se evitó la ocurrencia de precipitación y se mejoró la solubilidad de la proteína. Estos resultados sugieren que cuando se usa cloruro de sodio como un agente isotónico, el contenido de este puede ajustarse de acuerdo con la concentración del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada.

Además, se confirmó que un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a baja concentración es más estable en un tampón a un pH de 5,2, mientras que un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración es más estable en un tampón a un pH de 5,4 o 5,6. Por lo tanto, se determinó que el pH del tampón puede ajustarse adecuadamente dependiendo de la concentración de conjugado.

La metionina comprendida en el estabilizador de la presente invención suprime la formación de impurezas que pueden ocurrir por oxidación de la proteína en solución, lo que estabiliza aún más a una proteína diana. La concentración de metionina es de 0,005 a 0,1 % (p/v) en base a un volumen total de solución, preferentemente, de 0,01 a 0,1 % (p/v).

El estabilizador de la presente invención no contiene albúmina. Dado que la albúmina sérica humana disponible como un estabilizador de proteína se produce a partir del suero humano, siempre existe la posibilidad de que pueda contaminarse con virus patógenos de origen humano. La gelatina o la albúmina sérica bovina pueden causar enfermedades o pueden ser capaces de inducir una respuesta alérgica en algunos pacientes. El estabilizador de la presente invención, libre de proteínas heterólogas tales como albúminas séricas de origen humano o animal o gelatina purificada, no tiene posibilidad de causar contaminación viral.

Además, el estabilizador de la presente invención puede comprender adicionalmente azúcares, polialcohol, o aminoácidos. Los ejemplos preferidos de azúcares, que pueden añadirse adicionalmente para aumentar la estabilidad de almacenamiento del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada, incluyen monosacáridos tales como manosa, glucosa, fucosa y xilosa, y polisacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa y dextrano. Los ejemplos preferidos de polialcohol incluyen propilenglicol, polietilenglicol de bajo peso molecular, glicerol, polipropilenglicol de bajo peso molecular, y una combinación de estos.

La formulación líquida de la presente invención puede comprender, adicionalmente, un conservante además del conjugado, tampón, agente isotónico, alcohol de azúcar, y tensioactivo no iónico, descritos anteriormente, o adicionalmente metionina, con el propósito de evitar la contaminación microbiana en una formulación de usos múltiples.

Como se usa en la presente descripción, "conservante" se refiere a un compuesto que se añade a una formulación farmacéutica para actuar como un antimicrobiano. Los ejemplos de conservantes incluyen bencetonio, clorohexidina, fenol, m–cresol, alcohol bencílico, metilparabeno, propilparabeno, clorobutanol, o–cresol, p–cresol, clorocresol, cloruro de benzalconio, nitrato fenilmercúrico, timerosal, y ácido benzoico, pero no se limitan a estos. Puede usarse un solo tipo de conservante individualmente, o puede usarse una combinación aleatoria de dos o más tipos de conservante. Preferentemente, la formulación líquida de la presente invención puede comprender uno o más de m–cresol, fenol, y alcohol bencílico como un conservante.

La formulación líquida de la presente invención puede comprender de 0,001 % a 1 % (p/v) de conservante y, preferentemente, de 0,001 % a 0,5 % (p/v) de conservante, y con mayor preferencia de 0,001 a 0,25 % (p/v) de conservante.

En un ejemplo de la presente invención, se añadió m–cresol 0,22 % (p/v) como un conservante en la formulación líquida de la presente invención, y se evaluó el efecto del cresol sobre la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico. Como resultado, se confirmó que el conjugado permaneció estable en la formulación a la que se adicionó conservante, sin precipitación. Por lo tanto, la formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de la presente invención, que comprende conservante además del estabilizador, puede usarse para administraciones múltiples.

La formulación líquida de la presente invención puede comprender, además, otras sustancias y materiales conocidos en la técnica de forma selectiva además del tampón, el agente isotónico, el alcohol de azúcar, y el tensioactivo no iónico descritos anteriormente, o adicionalmente metionina y conservante, siempre que no se afecte el efecto de la presente invención.

La formulación líquida libre de albúmina del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la presente invención, que proporciona estabilidad al conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada no tiene un riesgo de contaminación viral, mientras que proporciona una excelente estabilidad de almacenamiento con una formulación simple y, por lo tanto, la presente formulación puede proporcionarse de manera más rentable en comparación con otra formulación estabilizadora o liofilizada.

Además, dado que la formulación líquida de la presente invención comprende el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada que tiene una duración mejorada de la actividad fisiológica en comparación con el de tipo silvestre, esta puede usarse como una formulación de fármaco eficaz porque retiene la actividad proteica en el cuerpo durante un período más largo en comparación con la formulación convencional de péptido insulinotrópico. Además, la presente formulación líquida proporciona una excelente estabilidad para almacenar un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración, así como también a baja concentración.

Como otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar la formulación líquida de la presente invención.

Puede prepararse una formulación líquida estable del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada mediante la generación del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada y mediante la mezcla del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada generado con un estabilizador que comprende tampón, alcohol de azúcar, y tensioactivo no iónico, opcionalmente, en donde el estabilizador comprende cloruro de sodio y/o metionina. Además, para usos múltiples, puede generarse una formulación líquida estable del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada mediante la mezcla adicional con un conservante además de los estabilizadores.

Modo de la invención

En lo adelante, la presente invención se describirá en más detalles con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos son sólo con fines ilustrativos, y la invención no pretende estar limitada por estos Ejemplos.

Ejemplo 1: Evaluación de la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en presencia o ausencia de agente isotónico tal como una sal

La estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada (15,41 μg/ml de CA exendina–4, Conc. Nominal) se evaluó en presencia o ausencia de cloruro de sodio como un agente isotónico en la formulación que comprende un tampón, un alcohol de azúcar, y un tensioactivo no iónico como un estabilizador; y en la formulación que comprende un tampón, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico, y metionina como un estabilizador. Para este propósito, el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada se almacenó a 25 °C y 40 °C durante 0 a 4 semanas en las siguientes composiciones de la Tabla 1, y después se analizó la estabilidad del conjugado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP–HPLC) y cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE–HPLC). El tampón citrato se usó como un tampón, el manitol se usó como un alcohol de azúcar, y el polisorbato 20 se usó como un tensioactivo no iónico. En las Tablas 2 y 3, los RP–HPLC (%) y SE–HPLC (%) representan el valor de "área %/área de inicio %" que muestra la pureza residual del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en comparación con la pureza inicial. La Tabla 2 muestra la pureza residual del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada después de almacenarse a 25 °C, y la Tabla 3 muestra la pureza residual del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada después de almacenarse a 40 °C.

[tabla 1]

No.	Concentración	Tampón	Sal	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
1	0.2 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	NaCl 150 mM	Manitol 5 %	Polisorbato 20 0.005 %
2	0.2 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2) Citrate ¡pH 5.2)	-	Manitol 5 %	Polisorbato 20 0.005 %
3	0.2 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	-	Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
4	0.2 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	NaCl 150 mM	Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %

[tabla 2]

No	RP-HPLC (%)				SE-HPLC (%)			
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4
1	100	99.3	99.2	97.1	100	99.8	100.1	100.2
2	100	99.1	99.1	96.9	100	99.8	100.1	100.1
3	100	99.8	99.5	97.9	100	99.8	100.0	100.1
4	100	99.5	99.8	98.4	100	99.9	100.2	100.2

[tabla 3]

No	RP-HPT (%)				SE-HPLC (%)			
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4
1	100	96.6	93.7	88.0	100	100	98. 8	97.2
2	100	Precipitación	Precipitación	Precipitación	100	Precipitación	Precipitación	Precipitación
3	100	98.1	Precipitación	Precipitación	100	99.9	Precipitación	Precipitación
4	100	96.9	95.2	90.6	100	100	99.0	97.2

Basado en la comparación entre los grupos de Prueba #1 y #2, y entre #3 y #4, en las Tablas 2 y 3, es evidente que cuando la formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada se almacenó a 25 °C y 40 °C, específicamente a 40 °C durante 4 semanas, y en presencia de NaCl como agente isotónico, particularmente NaCl 150 mM, la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada se mantuvo notablemente alta (Tablas 2 y 3).

<u>Ejemplo 2: Evaluación de la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a varios pH del tampón</u>

Si bien el intervalo general de pH del fármaco de proteína licuada está en el intervalo de 5 a 7, el pH de la formulación líquida de exendina–4 (Byetta), un fármaco peptídico insulinotrópico, es 4,5, que es más bajo que el intervalo general de pH. Por lo tanto, en este Ejemplo, se examinó el efecto del pH del tampón sobre la estabilidad del conjugado para un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada que comprende el péptido insulinotrópico y la Fc de la proteína inmunoglobulina, preferentemente, el conjugado de imidazoacetil (CA) exendina–4 de acción prolongada.

El tampón citrato se usó como un tampón, el manitol se usó como un alcohol de azúcar, el cloruro de sodio se usó como un agente isotónico, y el polisorbato 80 se usó como un tensioactivo no iónico. Las siguientes composiciones que se muestran en la Tabla 4 se usaron como un estabilizador para el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada. Después, las composiciones del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada se almacenaron a 25±2 °C durante 4 semanas y se analizó la estabilidad de estos mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SE–HPLC) y cromatografía de fase inversa (RP–HPLC). La RP–HPLC (%) y la SE–HPLC (%) en la Tabla 5 representan "área %/área de inicio %" que demuestran la pureza residual del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

[tabla 4]

No. Formulación	Concentración (µg/ml)	Tampón	Tensioactivo	Alcohol de azúcar	Agente Isotónico
1	197. 6	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	Polisorbato 80 0.005 %	Manitol 5 %	NaCl 150 mM
2	197. 6	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	Polisorbato 80 0.005 %	Manitol 5 %	NaCl 150 mM
3	197. 6	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	Polisorbato 80 0.005 %	Manitol 5 %	NaCl 150 mM

[tabla 5]

No. Formulación	pH	RP-HPLC (Área %/Área inicial %) %				SE-HPLC (Área %/Área inicial %) %			
		OW	1W	2W	4W	OW	1W	2W	4W
1	**5.2**	100.0	99.1	98. 6	**97.5**	100.0	100.0	100.5	**100.5**
2	**5.5**	100.0	99.8	97. 7	**95.0**	100.0	99.6	100.8	**100.7**
3	**6.0**	100.0	98.3	98.1	**94.8**	100.0	99.6	100.7	**100.7**

Como se muestra anteriormente, cuando el pH fue 5,2 en la formulación líquida anterior, el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada fue el más estable (Tabla 5).

Ejemplo 3: Evaluación de la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada dependiendo del tipo y la concentración del tensioactivo no iónico

La estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada se examinó mediante el uso de diferentes tipos y concentraciones de polisorbato, que es un tensioactivo no iónico, en el estabilizador de la presente invención.

Los tensioactivos no iónicos, es decir, polisorbato 80 y polisorbato 20, se examinaron en ambas concentraciones de 0,005 % y 0,01 %. La composición del estabilizador comprende un tampón, un alcohol de azúcar, y un agente isotónico así como también un tensioactivo, como se usó en el ejemplo anterior para proporcionar estabilidad al conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada. El tampón citrato a un pH de 5,2, que mostró una alta estabilidad en el Ejemplo 2, se usó como un tampón, el manitol se usó como un alcohol de azúcar, y el cloruro de sodio se usó como un agente isotónico.

Las siguientes composiciones que se muestran en la Tabla 6 se usaron como un estabilizador para el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada, preferentemente, para el conjugado de CA exendina–4 de acción prolongada. Después, las composiciones se almacenaron a 25±2 °C durante 8 semanas y la estabilidad de estas se analizó mediante RP–HPLC y SE–HPLC. La RP–HPLC (%) y la SE–HPLC (%) en la Tabla 7 representan la pureza residual del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

[tabla 6]

No. Formulación	Concentración (µg/ml)	Tampón	Tensioactivo	Alcohol de azúcar	Agente Isotónico
1	197.6	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	Polisorbato 80 0.005 %	Manitol 5 %	NaCl 150 mM
2	197. 6	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	Polisorbato 80 0.01 %	Manitol 5 %	NaCl 150 mM
3	197.6	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	Polisorbato 20 0.005 %	Manitol 5 %	NaCl 150 mM
4	197. 6	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	Polisorbato 20 0.01 %	Manitol 5 %	NaCl 150 mM

[tabla 7]

No. Formulación	Tensioactivo	RP-HPLC (Área %/Área inicial %)				SE-HPLC (Área %/Área inicial %) %			
		0W	2W	4W	8W	0W	2W	4W	8W
1	**Polisorbato 80 0.005 %**	100.0	97.5	94.1	**90.9**	100.0	100.0	1.00.0	**99.9**
2	**Polisorbato 80 0.01 %**	100.0	98.3	95.2	**92.6**	100.0	99.9	99.9	**99.8**
3	**Polisorbato 20 0.005 %**	100.0	98.9.	97.5	**93.8**	100.0	100.0	99.9	**99.9**
4	**Polisorbato 20 0.01 %**	100.0	98.69	97.0	**92.2**	100.0	100.0	100.0	**99.1**

Como se mostró anteriormente, basado en los resultados del análisis de la SE–HPLC, la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada fue casi la misma incluso cuando se usaron diferentes tipos y concentraciones de polisorbatos. Sin embargo, basado en los resultados del análisis de la RP–HPLC, se observó que cuando se usó polisorbato 20, la estabilidad del conjugado peptídico fue similar o mayor que cuando se usó la misma concentración de polisorbato 80. Además, la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada fue mayor en la formulación líquida que comprende 0,005 % de polisorbato 20, en comparación con la que comprende 0,01 % de polisorbato 20 (Tabla 7).

Ejemplo 4: Comparación de la estabilidad entre la formulación líquida seleccionada finalmente del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada y la formulación líquida disponible comercialmente de un fármaco peptídico o proteico que comprende la misma

En el presente ejemplo, se evaluó la estabilidad de la formulación que se seleccionó mediante pruebas de estabilidad en los Ejemplos 1 a 3. La formulación seleccionada finalmente del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada comprende tampón citrato a un pH de 5,2, cloruro de sodio, manitol, y polisorbato 20. Para este propósito, se comparó la estabilidad de las formulaciones de fármacos entre las formulaciones líquidas que se generaron mediante la aplicación del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a una formulación líquida del fármaco peptídico insulinotrópico disponible comercialmente, exendina–4 (Byetta); y a una formulación líquida del fármaco de proteína de fusión de inmunoglobulina, Etanercept (proteína de fusión TNFR–Fc, ENBREL).

Mediante el uso de las siguientes composiciones que se muestran en la Tabla 8, se prepararon las siguientes formulaciones: una formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada, con mayor preferencia conjugado de CA exendina–4 de acción prolongada (Formulación líquida #1); una formulación líquida preparada mediante la aplicación del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a la composición estabilizadora de la formulación líquida del fármaco peptídico insulinotrópico, exendina–4 (Byetta) (Formulación líquida #2); y una formulación líquida preparada mediante la aplicación del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a la composición estabilizadora de la formulación líquida del fármaco de proteína de fusión de inmunoglobulina, Etanercept (proteína de fusión TNFR–Fc, ENBREL) (Formulación líquida #3). Como un grupo control, se preparó una formulación líquida mediante la aplicación del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a una composición estabilizadora que comprende solo PBS (Formulación líquida #4). Posteriormente, las formulaciones se almacenaron a 25±2 °C durante 8 semanas, y la estabilidad de estas se analizó mediante RP–HPLC y SE–HPLC. La RP–HPLC (%) y la SE–HPLC (%) en la Tabla 9 muestran la pureza residual del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

[tabla 8]

No. Formulación	Concentración (µg/ml)	Tampón	Tensioactivo	Alcohol de azúcar	Agente Isotónico
1	197.6	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	Polisorbato 20 0.005 %	Manitol 5 %	NaCl 150 mM
2	197. 6	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	-	Manitol 5 %	-
3	197.6	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	-	Manitol 5 %	NaCl 100 mM
4	197. 6	PPS	-	Manitol 5 %	-

[tabla 9

No. Formulación	RP-HPLC (Área %/Área inicial %) %				SE-HPLC (Área %/Área inicial %) %			
	0W	2W	4W	8W	0W	2W	4W	8W
1	100.0	98.9	97.5	**93.8**	100.0	100.0	100.5	**100.5**
2	100.0	98.4	96.6	**90.9**	100.0	99.6	100.8	**100.7**
3	100.0	98.4	89.1	**N/A**	100.0	99.6	100.7	**100.7**
4	100.0	92.7	84.1	**69.2**	100.0	100.0	99.9	**99.6**

Como resultado de la prueba de estabilidad, se observó que la formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de la presente invención mostró una mayor estabilidad con respecto a las formulaciones líquidas preparadas mediante la aplicación del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a las formulaciones líquidas de un producto disponible comercialmente del fármaco peptídico insulinotrópico, exendina–4 (Byetta), y un fármaco de proteína de fusión de inmunoglobulina, Etanercept (proteína de fusión TNFR–Fc, ENBREL), como se muestra en la Figura 1 y en la Tabla 9.

Ejemplo 5: Evaluación de la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada dependiendo de la adición de metionina

Para determinar el efecto de la metionina sobre la estabilidad del conjugado, la formulación líquida se preparó mediante la adición de metionina para evitar la oxidación, a la composición que comprende tampón citrato a un pH de 5,2, cloruro de sodio, manitol, y polisorbato 20, que se seleccionaron en los Ejemplos anteriores. Las formulaciones se almacenaron a 25±2 °C durante 4 semanas y a 40±2 °C durante 4 semanas, y después se analizó la estabilidad de estas.

La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada, con mayor preferencia el conjugado de CA exendina–4 de acción prolongada, se preparó en las siguientes composiciones que se muestran en la Tabla 10 y se analizó la estabilidad de estas. La RP–HPLC (%) y la SE–HPLC (%) en las Tablas 11 a 14 representan las proporciones de conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada e impurezas en cada punto de tiempo. La Tabla 11 muestra los resultados de la prueba de estabilidad acelerada mediante RP–HPLC (25±2 °C) y la Tabla 12 muestra los resultados de la prueba de estabilidad acelerada mediante SE–HPLC (25±2 °C). La Tabla 13 muestra los resultados de la prueba de severidad de inestabilidad mediante RP–HPLC (40±2 °C) y la Tabla 14 muestra los resultados de la prueba de severidad de inestabilidad mediante SE–HPLC (40±2 °C). La impureza #3 representa la forma oxidada del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada. Sin embargo, dado que la SE–HPLC separa la muestra por peso molecular y la diferencia en el peso molecular entre la forma oxidada y la forma no oxidada es menor, fue difícil aislar la forma oxidada del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a través de SE–HPLC.

[tabla 10]

No. Formulación	Concentración (µg/ml)	Tampón	Tensioactivo	Alcohol de azúcar	Agente Isotónico
1	200	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	Polisorbato 20 0.005 %	Manitol 5 %	NaCl 150 mM
2	200	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	Polisorbato 20 0.005 %	Manitol 5 % Metionina 0.01 %	NaCl 150 mM

[tabla 11]

No. Formulación	Duración de almacenam.	Proporción de conjugado e impurezas (Área %)							
		#1	#2	#3	Conjugado	#4	#5	#6	Otros
1	Semana 0	0.1	0.1	**0.8**	**93.5**	3.2	1.7	0.4	0.1
	Semana 1	0.1	0.2	**1.0**	**92.8**	3.8	1.8	0.3	< 0.1
	Semana 2	0.2	0.2	**1.4**	**92. 7**	3. 2	2.0	0.3	< 0.1
	Semana 4	0.1	0.3	**1.8**	**90.8**	4. 6	1.7	0.3	0.6
2	Semana 0	0.1	0.2	**0.7**	**93.7**	3.5	1.4	0.4	< 0.1
	Semana 1	0.1	0.2	**0.7**	**93.2**	3.8	1.6	0.3	< 0.1
	Semana 2	0.1	0.2	**0.8**	**93.5**	3.2	1.8	0.3	< 0.1
	Semana 4	0.1	0.3	**0.6**	**92.2**	4.3	2.0	0.4	0.2

[tabla 12]

No. Formulación	Duración de almacenam.	Proporción de conjugado e impurezas (Área %)						
		#1	#2	#3	Conjugado	#4	#5	Otros
1	Semana 0	0.2	0.3	0.0	**99.5**	0.0	0.0	0.0
	Semana 1	0.2	0.5	0.0	**99.3**	0.0	0.0	0.0
	Semana 2	0.2	0.2	0.0	**99.6**	0.0	0.0	0.0
	Semana 4	0.1	0.2	0.0	**99.7**	0.0	0.0	0.0
2	Semana 0	0.3	0.2	0.0	**99.5**	0.0	0.0	0.0
	Semana 1	0.3	0.3	0.0	**99.4**	0.0	0.0	0.0
	Semana 2	0.2	0.1	0.0	**99.7**	0.0	0.0	0.0
	Semana 4	0.2	0.1	0.0	**99.7**	0.0	0.0	0.0

[tabla 13]

No. Formulación	Duración de almacenam.	Proporción de conjugado e impurezas (Área %)						
		#1	#2	#3	Conjugado	#4	#5	Otros
1	Semana 0	0.1	0.1	**0.8**	**93.5**	3.2	1.7	0.1
	Semana 1	0.2	0.3	**1.5**	**90.3**	5.0	1.8	< 0.1
	Semana 2	0.2	0.5	**2.1**	**87.6**	6.2	2.0	< 0.1
	Semana 4	0.1	1.1	**3.7**	**82.3**	8.6	1.7	0.2
2	Semana 0	0.1	0.2	**0.7**	**93.7**	3.5	1.4	< 0.1
	Semana 1	0.1	0.4	**0.7**	**90.8**	4.9	1.6	0.1
	Semana 2	0.1	0.5	**0.7**	**89.2**	5.9	1.8	0.0
	Semana 4	0.1	1.0	**0.8**	**84.9**	8.5	2.0	0.5

[tabla 14]

No. Formulación	Duración de almacenam.	Proporción de conjugado e impurezas (Área %)						
		#1	#2	#3	Conjugado	#4	#5	Otros
1	Semana 0	0.2	0.3	0.0	**99.5**	0.0	0.0	0.0
	Semana 1	0.2	0.3	0.0	**99.5**	0.0	0.0	0.0
	Semana 2	0.2	0.0	0.0	**98.3**	1.3	0.3	0.0
	Semana 4	0.1	0.0	0.0	**96.7**	2.7	0.4	0.0
2	Semana 0	0.3	0.2	0.0	**99.5**	0.0	0.0	0.0
	Semana 0	0.1	0.3	0.0	**99.5**	0.0	0.0	0.0
	Semana 0	0.1	0.0	0.0	**98.5**	1.1	0.3	0.0
	Semana 4	0.1	0.0	0.0	**96.7**	2.8	0.5	0.0

Como resultado de la prueba de estabilidad acelerada y de la prueba de severidad de inestabilidad y como se muestra en la Figura 2, se observó que la proporción del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada oxidado (Impureza #3 en el análisis RP–HPLC) aumentó en la formulación líquida sin metionina, pero no aumentó en la formulación líquida que comprende metionina 0,01 % (Figura 2). Por lo tanto, se confirmó que la formulación líquida que contiene metionina puede proporcionar estabilidad al conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de manera más efectiva.

Ejemplo 6: Evaluación de la estabilidad de almacenamiento a largo plazo de la formulación líquida seleccionada finalmente del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada

En el presente ejemplo, la formulación líquida que se seleccionó finalmente mediante los ejemplos anteriores se evaluó para la estabilidad de almacenamiento a largo plazo y la estabilidad acelerada. La formulación líquida seleccionada finalmente comprende tampón citrato a un pH de 5,2, cloruro de sodio, manitol, polisorbato 20, y metionina. Para este propósito, las formulaciones se almacenaron a 5±3 °C durante 6 meses y a 25±2 °C durante 6 meses y se analizó la estabilidad de estas. Los resultados se muestran en las Tablas 15 y 16, y la RP–HPLC (%), la SE–HPLC (%), el contenido de proteína (%), y la prueba de actividad específica (%) representan la pureza residual del conjugado en comparación con la pureza inicial. La Tabla 15 muestra los resultados de la evaluación de la estabilidad de almacenamiento a largo plazo de la formulación después de almacenarla a 5±3 °C, y la Tabla 16 muestra los resultados de la prueba de estabilidad acelerada después de almacenarla a 25±2 °C.

[tabla 15]

Evaluación de la estabilidad a largo plazo (almacenada a 5±3 °C)										
Duración de almac.	Color	PH	Prueba de confirmación		Prueba de Pureza				Contenido de proteína (%)	Actividad específica (%)
			RP-HPLC	Transferencia Western	SDS-PAGE	RP-HPLC (%)	SE-HPLC (%)	Endotoxina		
Inicio	Sin color/ Transparente	5.2	Coincide	Aceptable	Aceptable	100.0	100.0	Aceptable	100.0	100.0
1 mes	Sin color/ Transparente	5. 2	Coincide	Aceptable	Aceptable	100.1	99.7	Aceptable	105.8	114.3
3 meses	Sin color/ Transparente	5. 2	Coincide	Aceptable	Aceptable	100.1	99.6	Aceptable	100.0	115.7
6 meses	Sin color/ Transparente	5.2	Coincide	Aceptable	Aceptable	100.0	99.5	Aceptable	100.0	97.0

[tabla 16]

Prueba de estabilidad acelerada (almacenada a 25±2 °C)										
Duración de almac.	Color	PH	Prueba de confirmación		Prueba de Pureza				Contenido de proteína (%)	Actividad específica (%)
			RP-HPLC	Transferencia Western	SDS-PAGE	RP-HPLC (%)	SE-HPLC (%)	Endotoxina		
Inicio	Sin color/ Transparente	5.2	Coincide	Aceptable	Aceptable	100.0	100.0	Aceptable	100.0	100.0
1 mes	Sin color/ Transparente	5. 2	Coincide	Aceptable	Aceptable	99.6	99.4	Aceptable	105.8	116.4
3 meses	Sin color/ Transparente	5. 2	Coincide	Aceptable	Aceptable	98.0	98.6	Aceptable	103.8	95.8
6 meses	Sin color/ Transparente	5.2	Coincide	Aceptable	Aceptable	95.4	97.7	Aceptable	103.8	90.5

Como resultado de la prueba de estabilidad de almacenamiento a largo plazo, el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada fue estable durante más de 6 meses en la formulación líquida de la presente invención. Además, incluso cuando se almacenó en condiciones aceleradas durante 6 meses, los resultados del análisis de RP–HPLC mostraron que el 95,4 % o más del conjugado peptídico permaneció intacto en la formulación, lo que confirma que la presente formulación líquida proporciona una excelente estabilidad de almacenamiento a largo plazo al conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada.

Ejemplo 7: Evaluación de la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada dependiendo de la concentración de proteína

Se examinó el efecto de la alta concentración del conjugado para la formulación líquida seleccionada finalmente, que comprende tampón citrato a un pH de 5,2, cloruro de sodio, manitol, polisorbato 20, y metionina para evitar la oxidación. Para este propósito, se monitoreó la precipitación en la formulación, a simple vista, a 40 °C y a diversas concentraciones de conjugado que se muestran en la Tabla 17. Después de 72 horas de monitoreo, se produjo precipitación en todas las formulaciones presentes a alta concentración (4 mg/ml o más). Además, a medida que aumentó la concentración, también aumentó la ocurrencia de precipitación.

[tabla 17]

No.	Concentración	Tampón	Sal	Alcohol de azúcar y otros	Tensioactivo
1	0.52 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	NaCl 150 mM	Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
2	4. 0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	NaCl 150 mM	Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
3	5.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	NaCl 150 mM	Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
4	8.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	NaCl 150 mM	Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
5	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	NaCl 150 mM	Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
6	13.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 3.2)	NaCl 150 mM	Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %

Ejemplo 8: Evaluación de la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración dependiendo de la concentración de una sal y un alcohol de azúcar, y la presencia de metionina

Se examinó el efecto de la concentración de NaCl y manitol, como un alcohol de azúcar, en la prevención de la precipitación para la formulación líquida seleccionada finalmente del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración. Las formulaciones se prepararon en las siguientes composiciones que se muestran en la Tabla 18 y se monitorearon para detectar la ocurrencia de precipitación, a simple vista, a 40 °C durante 48 horas. La duración de la ausencia de precipitación que se muestra en la Figura 3 demuestra el tiempo durante el cual no se produjo precipitación de proteínas después del almacenamiento.

[tabla 18]

No.	Concentración	Tampón	Sal	Alcohol de azúcar y otros	Tensioactivo
1	5.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	NaCl 150 mM	Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
2	5.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	NaCl 150 mM	Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
3	5.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	NaCl 150 mM	Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
4	5.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	NaCl 150 mM	Manitol 5 %	Polisorbato 20 0.005 %

Como se muestra en los resultados anteriores, se confirmó que la concentración de NaCl no afectó significativamente la ocurrencia de precipitación y la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico a alta concentración, basado en la observación a simple vista. Sin embargo, cuando la concentración de manitol, como un alcohol de azúcar, se aumentó de 5 % a 10 %, la precipitación pudo suprimirse significativamente (Figura 3). Además, cuando no se añadió metionina a la formulación, también pudo suprimirse la precipitación.

Ejemplo 9: Evaluación de la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración dependiendo de la presencia de una sal y a diversos pH

Con un 10 % de manitol como se seleccionó en el Ejemplo 8, se examinó el efecto del pH sobre la supresión de la precipitación y la promoción de la estabilidad del conjugado insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración. El tampón citrato se usó como un tampón, y el polisorbato 20 se usó como un tensioactivo no iónico. De acuerdo con el Ejemplo 8, la precipitación podría suprimirse mediante la exclusión de metionina de la formulación. Sin embargo, todavía se añadió metionina a la formulación con el propósito de evitar la oxidación de la proteína. Además, para confirmar el efecto sinérgico de NaCl y el pH, en la formulación se añadió o excluyó NaCl 150 mM. El conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración se preparó en las siguientes composiciones que se muestran en la Tabla 19 y se monitoreó la ocurrencia de precipitación a 40 °C durante 7 días. Después de 7 días de almacenamiento, las muestras se analizaron mediante RP–HPLC y SE–HPLC.

La duración de la ausencia de precipitación que se muestra en la Figura 4 indica el tiempo durante el cual no se produjo precipitación de proteína después del almacenamiento. La RP–HPLC (%) de la Tabla 20 y la SE–HPLC (%) de la Tabla

21 indican la pureza residual del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

[tabla 19]

No.	Concentración	Tampón	Sal	Alcohol de azúcar y otros	Tensioactivo
1	5.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)		Manitol 10 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
2	5.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)	NaCl 150 mM	Manitol 10 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
3	5.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.4)		Manitol 10 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
4	5.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.4)	NaCl 150 mM	Manitol 10 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
5	5.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.6)		Manitol 10 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
6	5.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.62)	NaCl 150 mM	Manitol 10 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %

[tabla 20]

No	**RP-HPLC (Área %)**					
	0D	**1D**	**2D**	**3D.**	**4D**	**7D**
1	98.5	Precipitación	Precipitación	Precipitación	Precipitación	**Precipitación**
	98.4	98.0	Precipitación	Precipitación	Precipitación	**Precipitación**
3	98.4	97. 9	97.7	97. 6	97.3	**96.8**
4	98.3	98. 0	97. 7	97.6	97.2	**96.3**
5	98.2	97.8	97.8	97.5	97.4	**96.5**
6	98.3	98.1	9 7.9	97.5	97.2	**96.5**

[tabla 21]

No	**SE-HPLC (Área %)**					
	0D	**1D**	**2D**	**3D.**	**4D**	**0D**
1	98.3	Precipitación	Precipitación	Precipitación	Precipitación	**Precipitación**
2	98.3	95.6	Precipitación	Precipitación	Precipitación	**Precipitación**
3	98.3	98.0	97.8	97.5	97.4	**97.4**
4	98.4	98.1	97.9	97.4	97.3	**97. 6**
5	98.5	98.0	98.0	97.9	9'/. 8	**97.6**
6	98.5	98.1	98.1	98.0	97.9	**97.8**

Como se muestra anteriormente, la precipitación se suprimió mejor al pH alto de 5,4 y 5,6 que con respecto al pH de 5,2. Después de 7 días de almacenamiento, se observó precipitación en todas las formulaciones. Sin embargo, en la

composición que comprende manitol 10 % y NaCl 150 mM a un pH de 5,6 (Composición núm. 6), la cantidad de impurezas generada fue menor. Con un pH de 5,4 y 5,6, la presencia de NaCl no tuvo un efecto significativo sobre la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración, excepto por la precipitación (Tablas 20 y 21, y Figura 4).

Ejemplo 10: Evaluación de la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración dependiendo de la concentración de alcohol de azúcar y a diversos pH

Basado en los ejemplos anteriores, se examinó el efecto de la concentración de alcohol de azúcar y el pH sobre la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración. El tampón citrato se usó como un tampón, y el polisorbato 20 se usó como un tensioactivo no iónico. Además, a la formulación se añadió metionina con el propósito de evitar la oxidación. Además, basado en los resultados observados en el Ejemplo 9, se excluyó NaCl en la formulación del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración. El conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración se formuló en las siguientes composiciones como se muestra en la Tabla 22 y se almacenó a 40 °C durante 5 días y se cambió a la temperatura de 25 °C y se almacenó durante 4 semanas más. Cada semana, la estabilidad de la proteína se analizó mediante SE–HPLC, IE–HPLC, y RP–HPLC. La SE–HPLC (%) de la Tabla 23, el IE–HPLC (%) de la Tabla 24 y la RP–HPLC (%) de la Tabla 25 representan la pureza residual del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada.

[tabla 22]

No.	Concentración	Tampón	Sal	Alcohol de azúcar y otros	Tensioactivo
1	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.6)		Manitol 10 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
2	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.2)		Manitol 10 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
3	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 6.0)		Manitol 10 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
4	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 6.0)		Manitol 2 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
5	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 6.4)		Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
6	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 6.0)		Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
7	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 6.4)		Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %

[tabla 23]

No.	SE-HPLC (Área %)				
	0W	1 W	2W	3W	4W
1	99.4	98.3	98.3	98.2	98.0
2	99.3	98.0	98.0	97.8	97.6
3	99.3	98.1	98.1	98.0	97.9
4	99.3	97.8	97.8	97.8	97.7
5	99.0	97.7	97.7	97.6	97.5
6	99.3	98.1	98.0	98.0	97.7
7	99.0	97.7	97.7	97.6	97.5

[tabla 24]

No.	IE-HPLC (Área %)				
	0W	1 W	2W	3W	4W
1	95. 6	81.7	78.2	75.7	65.3
2	95.7	73.8	69.0	64.6	53.3
3	95.7	81.7	79.9	77.1	69.1
4	95. 6	80.3	78.0	75.3	66.4
5	95. 6	72.7	70.8	68. 3	60.2
6	95.7	80.6	77.1	72.3	61.6
7	95.7	74.1	72. 0	69.8	62.7

[tabla 25]

No.	RP-HPLC (Área %)				
	0W	1 W	2W	3W	4W
1	97.5	87.2.	84.1	81.0	75.7
2	97. 6	80.0	77.6	67.5	60.3
3	97.5	87.5.	84.9	81,.0	76.0
4	97.5	86. 6	83.4	79. 2	72. 9
5	96.5	84.5	79.5	76 .2	72.9
6	97.5	86.	82. 8	77.1	69.7
7	96. 6	82.9	80.1	77.2	71.9

Como se mostró anteriormente, cuando el pH fue bajo, la estabilidad fue, además, disminuida en comparación a cuando el pH fue alto. La estabilidad del conjugado fue la mayor al 10 % de manitol, mientras que el 2 % y el 5 % de manitol no afectaron la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración.

Ejemplo 11: Evaluación de la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración dependiendo del tipo y concentración del alcohol de azúcar

Para desarrollar una formulación líquida isotónica, se examinó el efecto del tipo y la concentración de un alcohol de azúcar, que afecta la presión osmótica de la formulación de manera más significativa, sobre la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico bajo la misma condición que en los Ejemplos anteriores. El tipo de alcohol de azúcar se cambió a sacarosa. Basado en la Formulación núm. 1 del Ejemplo 10, se sustituyó el manitol 10 % por sacarosa al 5 % y al 7 % (Tabla 26). Las formulaciones se almacenaron a 25 °C durante 4 semanas y cada semana se analizó la estabilidad de estas mediante SE–HPLC, IE–HPLC, y RP–HPLC. La SE–HPLC (%) de la Tabla 27, el IE–HPLC (%) de la Tabla 28 y la RP–HPLC (%) de la Tabla 29 representan la pureza residual del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada.

[tabla 26]

No.	Concentración	Tampón	Sal	Alcohol de azúcar y otros	Tensioactivo
1	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.6)		Manitol 10 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
2	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.6)		Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %
3	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.6)		Manitol 7 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %

[tabla 27]

No.	SE-HPLC (Área %)				
	0W	1 W	2W	3W	4W
1	99.4	98.3	98.3	98.2	98. 0
2	99.5	98.4	98.3	98. 2	98. 0
3	99.5	98.5	98.4	98.3	98.1

[tabla 28]

No.	IE-HPLC (Área %)				
	0W	1 W	2W	3W	4W
1	95. 6	81.7	78.2	75.7	65.3
2	95. 6	83. 1	79.9	76.5	68.8
3	95.7	83. 8	81.3	78.1	69.6

[tabla 29]

No.	RP-HPLC (Área %)				
	0W	1 W	2W	3W	4W
1	97.5	87.5	84.1	81.0	75.3
2	97.5	88.5	85.0	80.9	75.3
3	97.5	90.1	85.8	82.5	76.0

Como se mostró anteriormente, cuando se usó sacarosa en lugar de manitol, se mantuvo la estabilidad del conjugado, y la estabilidad del conjugado aumentó ligeramente en sacarosa 7 % en lugar de sacarosa 5 %, pero no hubo diferencia significativa.

Ejemplo 12: Evaluación de la estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada a alta concentración dependiendo del tipo de tampón, ajuste de la presión osmótica, y adición de conservante

Para desarrollar una formulación líquida isotónica, se ajustó la concentración de alcohol de azúcar, que tiene el mayor efecto sobre la presión osmótica, y se evaluaron diferentes tipos de tampones para proporcionar la estabilidad del conjugado en las condiciones de los Ejemplos anteriores. Además, bajo la misma condición, se añadió m–cresol 0,22 % como un conservante, y también se evaluó el efecto de este sobre la estabilidad del conjugado. El conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada se formuló en las siguientes composiciones que se muestran en la Tabla 30 y se almacenó a 25 °C durante 2 semanas. Después, cada semana, la estabilidad de las muestras se analizó mediante SE–

HPLC, IE–HPLC y RP–HPLC. La SE–HPLC (%) de la Tabla 31, el IE–HPLC (%) de la Tabla 32, y la RP–HPLC (%) de la Tabla 33 representan la pureza residual del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada.

[tabla 30]

No.	Concentración	Tampón	Sal	Alcohol de azúcar y otros	Tensioactivo	Conservante
1	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.6)		Manitol 10 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %	
2	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.6)		Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %	m-cresol 0.22 %
3	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.6)		Manitol 7 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %	
4	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.6)		Manitol 10 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %	m-cresol 0.22 %
5	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.6)		Manitol 5 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %	
6	10.0 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5.6)		Manitol 7 % Metionina 0.1 mg/ml	Polisorbato 20 0.005 %	m-cresol 0.22 %

[tabla 31]

No.	SE-HPLC (Área %)		
	0W	1W	2W
1	9 9.4	98. 9	97.0
2	99.3	99.2	98.6
3	99.2	98. 9	98.4
4	99.1	98. 8	98.0
5	99.3	99. 1	98.7
6	99.2	99.1	98. 4

[tabla 32]

No.	IE- HPLC (Área %)		
	1W	1W	2W
1	90.4	88.9	84.7
2	90.5	90..2	88.2
3	89.0	8 3.5	78.0
4	89.2	8 5.0	80.1
5	89.6	84.4	79.8
6	90.1	8 6.9	83. 2

[tabla 33]

No.	RP-HPLC (Área %)		
	0W	1W	2W
1	93.2	91. 3	90.1
2	93.2	91. 9	90.1
3	91.8	88.2	80.3
4	92.4	88.6	84.4
5	91.5	87.6	83.8
6	92.2	89.4	86.0

Como se mostró anteriormente, cuando se usaron diferentes tipos de tampones, el conjugado peptídico de cada formulación fue estable. Además, la adición de m–cresol no afectó la estabilidad del péptido.

Estos resultados sustentan que la composición de la formulación líquida de la presente invención podría mantener una alta estabilidad del conjugado de péptido insulinotrópico a alta concentración.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada, que comprende una cantidad con eficacia farmacéutica del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada en la que un péptido insulinotrópico, que es un péptido activo fisiológicamente, se une a una región Fc de inmunoglobulina; y un estabilizador libre de albúmina, en la que el estabilizador comprende un tampón, un alcohol de azúcar, y un tensioactivo no iónico; y
en la que el péptido insulinotrópico es exendina–3, exendina–4, o imidazo–acetil exendina–4; y
en la que el tampón es un tampón citrato, el alcohol de azúcar es manitol o sacarosa, y el tensioactivo no iónico es polisorbato.

2. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el estabilizador comprende, además, cloruro de sodio como un agente isotónico.

3. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc derivada de IgG, IgA, IgD, IgE, o IgM.

4. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 3, en la que

(a) la región Fc de inmunoglobulina es un híbrido de dominios de diferentes orígenes derivados de inmunoglobulinas seleccionadas del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE, e IgM;
(b) la región Fc de inmunoglobulina es un dímero o multímero que consiste en inmunoglobulinas monocatenarias compuestas de dominios del mismo origen; o
(c) la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4, opcionalmente en la que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4 aglicosilada humana.

5. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que un péptido insulinotrópico, que es un péptido activo fisiológicamente, se une a una región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptidílico o una proteína de fusión en la cual un péptido insulinotrópico, que es un péptido activo fisiológicamente, se une a una región Fc de inmunoglobulina.

6. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 5, en la que

(a) el polímero no peptidílico es un polietilenglicol; o
(b) el polímero no peptidílico se selecciona del grupo que consiste en un polímero biodegradable tal como un polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol y propilenglicol, un poliol polioxietilado, alcohol de polivinilo, polisacárido, dextrano, polivinil etil éter, ácido poliláctico (PLA), y ácido poliláctico–glicólico (PLGA); un polímero lipídico; quitinas; un ácido hialurónico; y una combinación de estos.

7. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que

(a) la cantidad con eficacia farmacéutica del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada tiene una concentración de 0,5 mg/ml a 150 mg/ml;
(b) el intervalo de pH del tampón es de 4 a 7, preferentemente, de 5 a 7; o
(c) el estabilizador comprende, además, una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en azúcares, polialcoholes, y aminoácidos.

8. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el agente isotónico es cloruro de sodio que tiene una concentración de 0 mM a 200 mM.

9. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración del alcohol de azúcar es del 3 % (p/v) al 15 % (p/v) en base a un volumen total de solución.

10. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tensioactivo no iónico es polisorbato 80 o polisorbato 20 y, opcionalmente, en la que el tensioactivo no iónico tiene una concentración de 0,001 % (p/v) a 0,05 % (p/v).

11. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el estabilizador comprende, además, metionina, y opcionalmente, en la que la concentración de la metionina es 0.005 % (p/v) a 0.1 % (p/v) en base a un volumen total de solución.

12. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la formulación comprende:

el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada, en la que un péptido insulinotrópico y una región Fc de inmunoglobulina se unen mediante polietilenglicol; y
el estabilizador libre de albúmina, en la que el estabilizador comprende tampón citrato como un tampón, manitol como un alcohol de azúcar, y polisorbato 20 como un tensioactivo no iónico, opcionalmente, en la que el estabilizador comprende, además, metionina.

13. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la formulación comprende:

el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada, en la que un péptido insulinotrópico y una región Fc de inmunoglobulina se unen mediante polietilenglicol; y
el estabilizador libre de albúmina, en la que el estabilizador comprende tampón citrato como un tampón, manitol como un alcohol de azúcar, polisorbato 20 como un tensioactivo no iónico, y cloruro de sodio como un agente isotónico.

14. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, además, uno o más conservantes seleccionados del grupo que consiste en m–cresol, fenol, y alcohol bencílico.

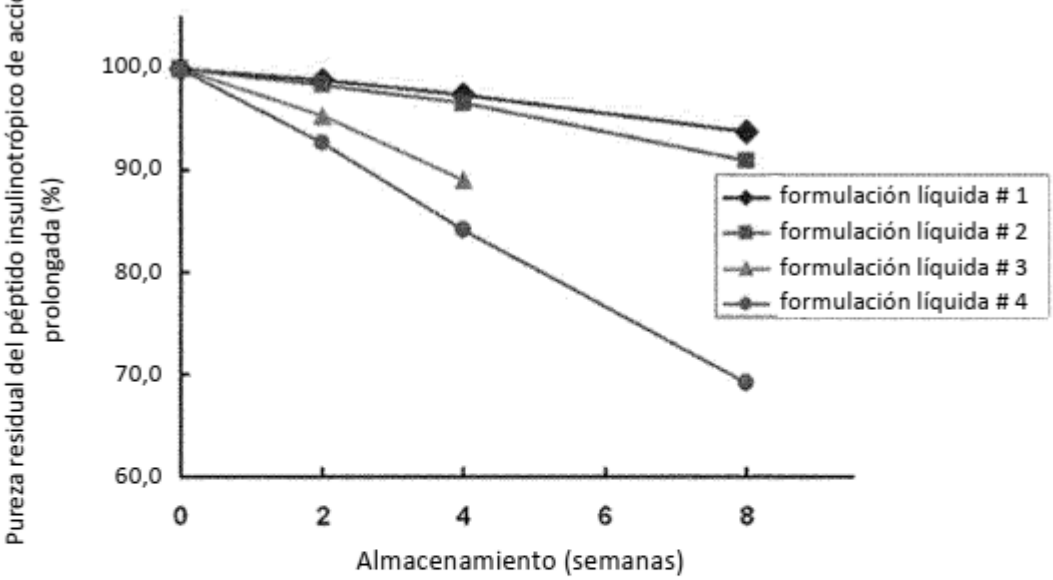
15. La formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 14, en la que

(a) la concentración del conservante es de 0,001 % a 1 % (p/v) en base a un volumen total de solución;
(b) el conservante es m–cresol; o
(c) la formulación líquida es para uso múltiple.

16. Un método para preparar la formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende (a) preparar un conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada; y (b) mezclar el conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada preparado en la etapa (a) con un estabilizador que comprende tampón, alcohol de azúcar, y tensioactivo no iónico, opcionalmente, en la que el estabilizador comprende cloruro de sodio y/o metionina.

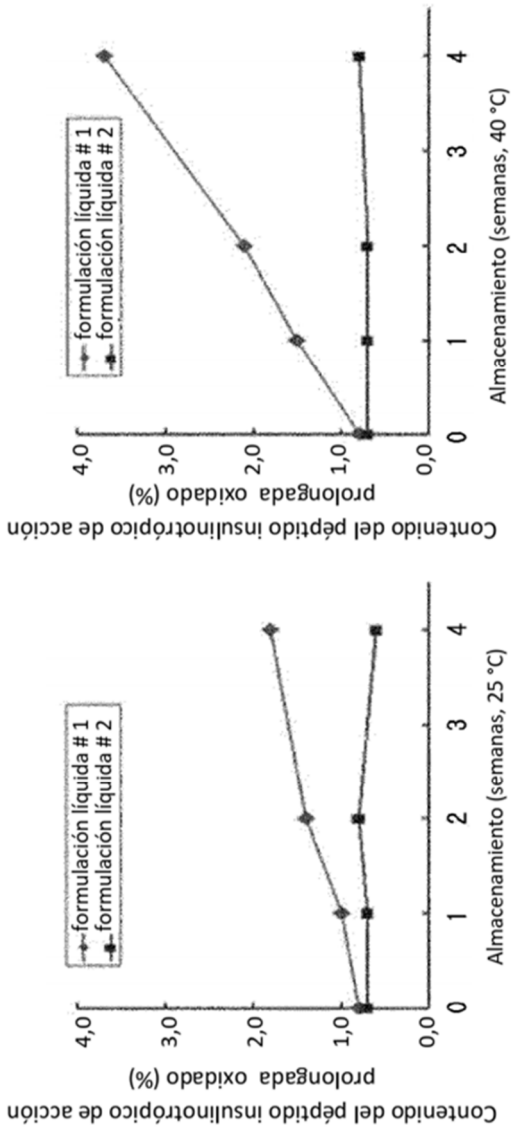
17. El método de la reivindicación 16 para preparar la formulación líquida del conjugado de péptido insulinotrópico de acción prolongada, en la que el estabilizador comprende, además, un conservante.

[Figura 1]



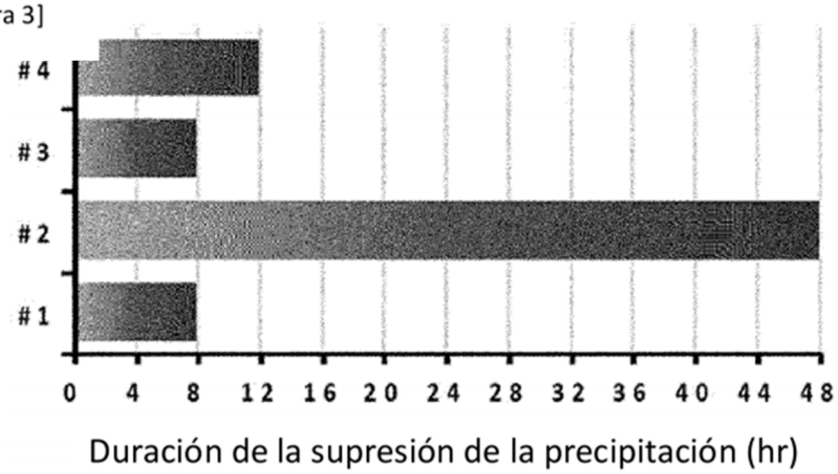
núm. de Formulación	Conc. (µg/ml)	Tampón	Tensioactivo	Alcohol de azúcar y otros	Agente isotónico
1	197,6	Na–Citrato 20 mM (pH 5,2)	Polisorbato 20 0,005 %	Manitol 5 %	NaCl 150 mM
2	197,6	Na–Acetato 20 mM (pH 4,5)	–	Manitol 5 %	–
3	197,6	Na–Fosfato 20 mM (pH 6,3)	–	Sacarosa 1 % L–arginina 25 mM	NaCl 100 mM
4	197,6	PBS	–	–	–

[Figura 2]

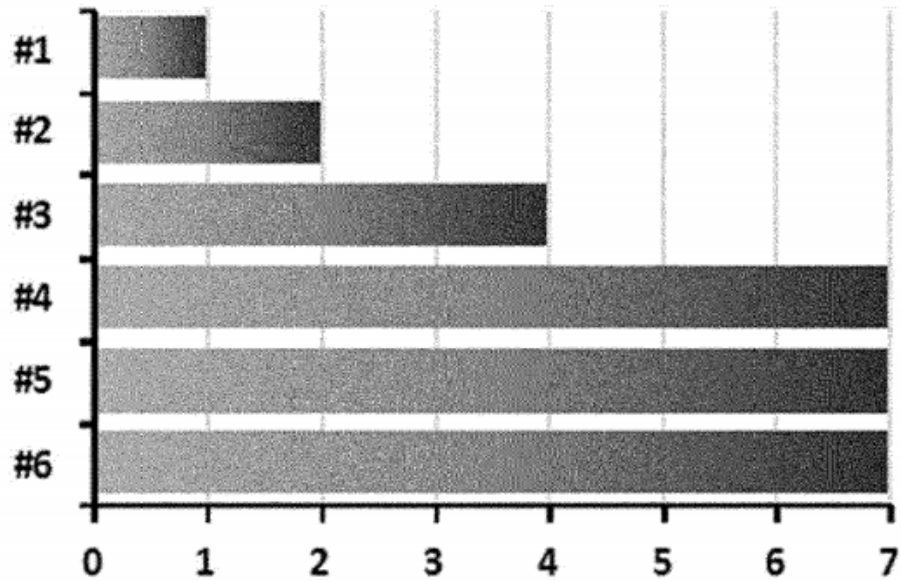


Núm. de Formu-lación	Conc. (µg/ml)	Tampón	Tensioactivo	Alcohol de azúcar y otros	Agente isotónico
1	200	Na–Citrato 200 nM (pH 5,2)	Polisorbato 20 0,005 %	Manitol 5 %	NaCl 150 mM
2	200	Na–Citrato 200 nM (pH 5,2)	Polisorbato 20 0,005 %	Manitol 5 % Metionina 0.01 %	NaCl 150 mM

[Figura 3]



[Figura 4]



Duración de la supresión de la precipitación (días)