



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0813699-8 B1



(22) Data do Depósito: 09/07/2008

(45) Data de Concessão: 22/06/2021

(54) Título: FORMULAÇÃO DE PROTEÍNA DE FUSÃO GLP-1-FC

(51) Int.Cl.: A61K 9/08; A61K 47/26; A61K 38/26.

(30) Prioridade Unionista: 10/07/2007 US 60/948,855.

(73) Titular(es): ELI LILLY AND COMPANY.

(72) Inventor(es): KINGMAN NG.

(86) Pedido PCT: PCT US2008069473 de 09/07/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/009562 de 15/01/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/01/2010

(57) Resumo: FORMULAÇÃO DE PROTEÍNA DE FUSÃO GLP-1-FC. A presente invenção refere-se a uma formulação de solução estável compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de fusão GLP-1-FC a cerca de pH 6,5 em tampão de citrato com polis- sorbato-80 e manitol. A formulação é útil para tratar diabetes e obesidade como também uma variedade de outras condições ou distúrbios.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"FORMULAÇÃO DE PROTEÍNA DE FUSÃO GLP-1-Fc".

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se a uma formulação comercial de um análogo de peptídeo tipo glucagon fundido a uma porção de Fc de uma imunoglobulina. Essa formulação pode ser usada para tratar diabetes e obesidade como também uma variedade de outras condições ou distúrbios.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] Análogos e derivados de peptídeo-1 tipo Glucagon (GLP-1), em testes clínicos, se mostram promissores para o tratamento de diabetes tipo 2. O GLP-1 induz numerosos efeitos biológicos tais como estimular a secreção de insulina, inibir a secreção de glucagon, inibir esvaziamento gástrico, inibir motilidade gástrica ou motilidade intestinal, e induzir a perda de peso. Uma característica significativa de GLP-1 é sua capacidade de estimular a secreção de insulina sem o risco associado de hipoglicemia que é visto ao usar terapia de insulina ou alguns tipos de terapias orais que atuam aumentando a expressão da insulina.

[0003] A utilidade da terapia envolvendo peptídeos GLP-1 tem sido limitada pelo fato de que GLP-1(1-37) é pouco ativo, e os dois peptídeos truncados de ocorrência natural, GLP-1(7-37)OH e GLP-1(7-36)NH₂, são rapidamente depurados *in vivo* e têm médias de vida *in vivo* extremamente curtas. É sabido que dipeptidil-peptidase IV endogenamente produzida (DPP-IV) inativa os peptídeos GLP-1 circulantes, removendo a histidina de terminal N e os resíduos de alanina, e é a principal razão para a média de vida curta *in vivo*.

[0004] Várias abordagens têm sido empreendidas para prolongar a média de vida de eliminação de um peptídeo GLP-1 ou reduzir a depuração do peptídeo do corpo enquanto mantém a atividade

biológica. Uma abordagem envolve fundir um peptídeo GLP-1 a uma porção Fc de uma imunoglobulina. As imunoglobulinas, tipicamente, têm meia de vida de circulação *in vivo* longa.

[0005] Por exemplo, as moléculas de IgG podem ter uma média de vida em seres humanos de até 23 dias. A porção Fc da imunoglobulina é responsável, em parte, por essa estabilidade *in vivo*. As proteínas de fusão de GLP-1-Fc levam vantagem da estabilidade provida pela porção Fc de uma imunoglobulina, enquanto preservam a atividade biológica da molécula de GLP-1.

[0006] Embora essa abordagem seja viável para a terapêutica de GLP-1 (vide WO 02/46227), existe uma preocupação geral a respeito da antigenicidade de várias proteínas de fusão, quando administradas repetidamente durante períodos de tempo prolongados. Isso é especialmente uma preocupação para a terapêutica de fusão de GLP-1-Fc quando um paciente com diabetes deve ser tratado durante sua vida inteira uma vez diagnosticado com a doença. Além disso, a terapêutica de proteína de fusão de Fc pode ser uma preocupação se a porção Fc reter funções indesejáveis. Essa abordagem é o foco de PCT/US 04/15595 (WO2005/000892), em que os problemas associados com a atividade de imunogenicidade e efector potencial associados com a administração de proteínas de fusão de GLP-1-Fc são superados através da identificação de proteínas de fusão de GLP-1-Fc específicas, que têm um risco reduzido de induzir uma resposta imune depois da administração repetida e prolongada e não mais tem a função de efector.

[0007] As proteínas de fusão dessa natureza são tecnicamente muito grandes e complexas para se produzir sinteticamente ou recombinantemente em células bacterianas. Essas proteínas de fusão são tipicamente produzidas em células de mamíferos, tais como CHO, 293, ou NS0. Foi observado que as proteínas de fusão produzidas em células de mamíferos eram mais prontamente susceptíveis à

degradação por proteases endógenas e alteração química do que as proteínas de não-fusão produzidas em células bacterianas. Esse problema foi pesquisado para ser superado em PCT/US 2005/045376 (WO2006/068910) em que foi descoberto que uma formulação compreendendo uma proteína de fusão de GLP-1-Fc tamponada entre cerca de pH 6 e cerca de pH 8,5 proveram estabilidade química aumentada.

[0008] Ainda, mesmo quando as instabilidades causadas por proteases de células hospedeiras são mantidas em verificação, a formulação pode não ser apropriada se ela é fisicamente instável. Outro problema observado pelo presente inventor é a formação de agregados solúveis e partículas insolúveis, mediante armazenagem a longo prazo de uma formulação de solução. Esse problema é pesquisado para ser superado por uma combinação específica de excipientes e uma concentração específica de uma proteína de fusão GLP-1-Fc.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0009] A fim de superar o problema de agregados solúveis e partículas insolúveis sob armazenagem a longo prazo, de uma formulação de solução de uma proteína de fusão GLP- 1-Fc, o presente inventor desenvolveu uma formulação de solução fisicamente e quimicamente estável compreendendo cerca de 0,5 a cerca de 10 mg/mL de uma proteína de fusão GLP-1-Fc, 5 a 20 mM de tampão de citrato, 0,01 a 0,05% (p/v) de polissorbato-80, e 4,0 a 5,3% (p/v) de manitol, e tendo um pH de 6 a 7. Essa formulação proveu inesperadamente e consideravelmente menos agregados solúveis e partículas insolúveis sob armazenagem a longo prazo. Além disso, o presente inventor descobriu que essa formulação de solução é mais estável em uma seringa do que em um frasco depois de armazenagem de validade prolongada.

[00010] A presente invenção também inclui métodos de tratar

pacientes que sofrem de diabetes e obesidade, como também de uma variedade de outras condições ou distúrbios compreendendo administrar a formulação da proteína de fusão GLP-1-Fc.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00011] A proteína de fusão GLP-1-Fc da presente invenção compreende um composto GLP-1 fundido com seu C-terminal através de um ligante de peptídeo para o N-terminal de um análogo de uma porção Fc de uma imunoglobulina. A proteína de fusão é biologicamente ativa como um monômero ou como um homodímero e tem uma média de vida aumentada em comparação à GLP-1 nativa. A proteína de fusão GLP-1-Fc preferida compreende a sequência de aminoácidos dada por (SEQ ID NO:1). A proteína de fusão GLP-1-Fc mais preferida consiste essencialmente de uma sequência de aminoácidos dada por (SEQ ID NO:1). A proteína de fusão GLP-1-Fc mais preferida consiste na sequência de aminoácidos dada por (SEQ ID NO:1).

[00012] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys₅₅-Pro-Pro-Cys₅₈-Pro-Ala-Pro-Glu-Ala-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys₉₀-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Phe-Asn-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys₁₅₀-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys₁₉₆-Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-

Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys₂₅₄-Ser-Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu-Gly (SEQ ID NO:1)

[00013] Ligações de dissulfeto podem existir intracadeia (ou cadeia - A ou B) e/ou intercadeia (entre ambas as cadeias - A e B). Exemplos de ligações de dissulfeto de intracadeia são: Cys90A – Cys150A, Cys196A – Cys254A, Cys90B – Cys150B, Cys196B – Cys254B. Exemplos de ligações de dissulfeto de intercadeia são: Cys55A – Cys55B, Cys58A – Cys58B.

[00014] Atividade biológica refere-se à capacidade da proteína de fusão para ligar-se à e ativar o receptor de GLP-1 *in vivo* e extrair uma resposta. Respostas incluem, mas não são limitadas a secreção de insulina, supressão de glucagon, inibição do apetite, perda de peso, indução de saciedade, inibição de apoptose, indução de proliferação de células beta pancreáticas, e diferenciação de células beta pancreáticas.

[00015] A formulação da proteína de fusão GLP-1-Fc compreende cerca de 0,25 a cerca de 10 mg/mL de uma proteína de fusão GLP-1-Fc. A concentração preferida da proteína de fusão, em mg/mL, é na faixa de cerca de 0,5 a 10, 0,5 a 5, 0,5 a 2,5, 0,5 a 2, 0,5 a 1,67, 0,5 a 1,5, 0,5 a 1,25, 0,5 a 1, 0,5 a 0,9, 0,5 a 0,8, 0,5 a 0,75, 0,6 a 2, 0,7 a 2, 0,8 a 2, 0,9 a 2, 0,5 a 3, 0,6 a 3, 0,7 a 3, 0,8 a 3, 0,9 a 3, 0,5 a 4, 0,6 a 4, 0,7 a 4, 0,8 a 4, 0,9 a 4, 1 a 2, 1,1 a 2, 1,2 a 2, 1,3 a 2, 1,4 a 2, 1,5 a 2, 1,6 a 2, 0,7 a 1,67, 0,9 a 1,1, 1 a 4, 1,0 a 4,0, 0,5 a 5, 0,25 a 7, 0,25 a 5, 0,25 a 4, 0,25 a 3, 0,25 a 2, 0,25 a 1,5, 0,25 a 1, 0,25 a 0,5. A concentração preferida de proteína de fusão GLP-1-Fc, em mg/mL, é cerca de 0,25, cerca de 0,42, cerca de 0,5, cerca de 0,6, cerca de 0,67, cerca de 0,7, cerca de 0,75, cerca de 0,8, cerca de 0,83, cerca de 0,9, cerca de 1, cerca de 1,1, cerca de 1,2, cerca de 1,25, cerca de 1,3, cerca de 1,4, cerca de 1,5, cerca de 1,6, cerca de 1,67, cerca de 1,7, cerca de 1,8, cerca de 1,9, cerca de 2, cerca de 2,5, cerca de 3, cerca de 3,33,

cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6,67, ou cerca de 10.

[00016] A formulação da proteína de fusão GLP-1-Fc é tamponada na faixa de cerca de 5 a 20 mM de citrato. A concentração de citrato preferida, em mM, é na faixa de cerca de 5 a 15, 5 a 12,5, 5 a 10, 7,5 a 20, 7,5 a 15, 7,5 a 12,5, 7,5 a 10, 8 a 20, 8 a 15, 8 a 12,5, 8 a 11, 8 a 10, 9 a 20, 9 a 15, 9 a 12,5, 10 a 20, 10 a 17,5, 10 a 15, 10 a 12,5, 6 a 14, 7 a 13, 8 a 12, 9 a 11, 12 a 20, 14 a 20, 16 a 20, e 18 a 20. A concentração de citrato particularmente preferida é na faixa de cerca de 9 a cerca de 11, e cerca de 8 a cerca de 12 mM. A concentração de citrato preferida particularmente é cerca de 10 ou cerca de 10,0.

[00017] O pH é ajustado na faixa de cerca de 6 a 7 para prover estabilidade aceitável, para manter a atividade de solubilidade e insulínica da proteína de fusão GLP-1-Fc e ser aceitável para administração parenteral. O pH pode ser ajustado pela adição de ácido, tal como HCl, ou base tal como NaOH, para o pH desejado ou uma combinação de tampão de citrato e ácido cítrico e pode ser adicionada para alcançar a concentração de tampão desejada e o pH desejado. O valor de pH preferido é na faixa de cerca de 6,3 a 6,7, 6,25 a 6,75, 6,2 a 6,8, 6,15 a 6,85, 6,1 a 6,9. O valor de pH preferido é cerca de 6,5.

[00018] A formulação da proteína de fusão GLP-1-Fc ainda compreende manitol como um agente de isotonicidade. A concentração de manitol é na faixa de 4,0 a 5,3% (peso/volume). A unidade "(p/v)" significa massa do constituinte por volume da formulação final. Dessa maneira, uma formulação tendo uma concentração de manitol de 4,6 % (p/v) tem 46 mg de manitol por mL de formulação, ou expresso de outra maneira, ela tem 4,6 gramas de manitol dissolvidas em um volume total de 100 mL de formulação. A concentração de manitol preferida, em % de (p/v) é na faixa de cerca de 4,0 a cerca de 4, 1, cerca de 4, 1 a cerca de 4,2, cerca de 4,2 a cerca de 4,3, cerca de 4,3 a cerca de 4,4, cerca de 4,4 a cerca de 4,5, cerca de 4,5 a cerca de 4,6, cerca de 4,6 a cerca

de 4,7, cerca de 4,55 a cerca de 4,75, cerca de 4,5 a cerca de 4,8, cerca de 4,4 a cerca de 4,9, cerca de 4,3 a cerca de 5,0, cerca de 4,2 a cerca de 5,1, cerca de 4,1 a cerca de 5,2, cerca de 4,7 a cerca de 4,8, cerca de 4,8 a cerca de 4,9, cerca de 4,9 a cerca de 5,0, cerca de 5,0 a cerca de 5,1, cerca de 5,1 a cerca de 5,2, cerca de 5,2 a cerca de 5,3. A concentração de manitol preferida, em % de (p/v) é cerca de 4,3, cerca de 4,5, cerca de 4,55, cerca de 4,6, cerca de 4,65, cerca de 4,64, cerca de 4,7, cerca de 4,75, cerca de 4,8, cerca de 4,9, cerca de 5,0, cerca de 5,1, cerca de 5,2, ou cerca de 5,3.

[00019] A formulação da proteína de fusão GLP-1-Fc ainda compreende polissorbato-80 como um solubilizador e/ou estabilizador. A concentração de polissorbato-80 é na faixa de cerca de 0,01 a 0,05% em (p/v) (ou expressa em termos de mg/mL, cerca de 0,1 a 0,5 mg/mL). Essa concentração de polissorbato-80 foi determinada em combinação com a proteína de fusão GLP-Fc e manitol para minimizar a formação de agregados solúveis e partículas insolúveis. A concentração de polissorbato-80 preferida, de % em (p/v) é na faixa de cerca de 0,01 a 0,04, 0,01 a 0,03, 0,015 a 0,025. Uma concentração preferida de polissorbato-80 é na faixa de cerca de 0,018 a cerca de 0,022% em (p/v). Outra concentração de polissorbato-80 preferida é na faixa de cerca de 0,015 a cerca de 0,025% em (p/v). Uma concentração de polissorbato-80 particularmente preferida é cerca de 0,02% em (p/v).

[00020] Uma formulação particularmente preferida compreende a proteína de fusão GLP-Fc tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 em uma concentração na faixa de cerca de 0,25 a cerca de 10 mg/mL, tampão de citrato em uma concentração de cerca de 10 mM, polissorbato-80 em uma concentração de cerca de 0,02% em (p/v), manitol em uma concentração de cerca de 4,6% em (p/v), e um pH de cerca de 6,5. Outra formulação particularmente preferida compreende a proteína de fusão GLP-Fc que tem a sequência de aminoácidos de SEQ

ID NO: 1 em uma concentração na faixa de cerca de 0,25 a cerca de 5 mg/mL, tampão de citrato em uma concentração de cerca de 10 mM, polissorbato-80 em uma concentração de cerca de 0,02% em (p/v), manitol em uma concentração de cerca de 4,6% em (p/v), e um pH de cerca de 6,5. Outra formação particular compreende a proteína de fusão GLP-Fc tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 em uma concentração na faixa de cerca de 0,25 a cerca de 10 mg/mL, tampão de citrato em uma concentração na faixa de cerca de 5 a cerca de 20 mM, polissorbato-80 em uma concentração de cerca de 0,02 % em (p/v), manitol em uma concentração na faixa de cerca de 4,5 a cerca de 4,8% (p/v), e um pH na faixa de cerca de 6,3 a cerca de 6,7. Outra formulação particular compreende a proteína de fusão GLP-Fc que tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 em uma concentração na faixa de cerca de 0,25 a cerca de 5 mg/mL, tampão de citrato em uma concentração na faixa de cerca de 5 a cerca de 20 mM, polissorbato-80 em uma concentração de cerca de 0,02% em (p/v), manitol em uma concentração na faixa de cerca de 4,5 a cerca de 4,8% em (p/v), e um pH na faixa de cerca de 6,3 a cerca de 6,7.

[00021] A administração das formulações pode ser através de qualquer via conhecida como para ser eficaz pelo médico de conhecimento comum. Um desse tal método é parenteral periférico. A administração parenteral é comumente entendida na literatura médica como a injeção de uma forma de dosagem no corpo, através de uma seringa estéril ou algum outro dispositivo mecânico tal como uma bomba de infusão. Vias parenterais periféricas podem incluir vias de administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. A administração subcutânea é a via preferida.

[00022] A formulação da presente invenção pode ser usada para tratar sujeitos com diabetes não-dependente de insulina ou em risco de desenvolver diabetes não-dependente de insulina, diabetes dependente

de insulina, ou obesidade. Uma quantidade eficaz da proteína de fusão GLP-1-Fc, no contexto da formulação descrita, é a quantidade que resulta no efeito terapêutico e/ou profilático desejado sem causar efeitos colaterais inaceitáveis quando administrada a um sujeito com necessidade de estímulo do receptor GLP-1.

[00023] É preferido que as proteínas de fusão sejam administradas uma vez a cada duas semanas ou uma vez por semana. Dependendo da doença que está sendo tratada, pode ser necessário administrar a proteína de fusão mais frequentemente, tal como duas ou três vezes por semana.

[00024] A presente invenção será agora descrita somente a título de exemplo não-limitante com referência aos exemplos a seguir.

EXEMPLOS

Ensaio de ativação de receptor de GLP-1 *in vitro*

[00025] As células HEK-293 expressando estavelmente o receptor GLP-1 de ser humano, usando um sistema de CRE-Luciferase, são semeadas em 30.000 células/poços/80 µl em meio DMEM F12 sérico, em 96 placas de poços. O dia seguinte a semeadura, 20 µl alíquotas de proteína de teste dissolvidas em 0,5% de BSA são misturadas e incubadas com as células por 5 horas. Geralmente 12 diluições contendo de 3 pM a 3 nM são preparadas em uma concentração de 5X para cada proteína de teste antes da adição às células para gerar uma curva de resposta de dose a partir da qual os valores de EC₅₀ são determinados. Após a incubação, 100 µl de reagente Luciferase é adicionada diretamente em cada placa e misturados suavemente por 2 minutos. As placas são colocadas em um luminômetro Tri-lux e a potência de luz resultante da expressão de luciferase é calculada.

Teste analítico de formulação de fusão de GLP-Fc

[00026] A estabilidade da formulação de fusão GLP-Fc é avaliada usando os métodos a seguir: espectrometria ultravioleta visível (UV),

cromatografia de fase reversa (RP), cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de troca de ânion, fragmentação limitada com cromatografia de RP, absorvância a 550 nm, dispersão dinâmica de luz, instron, HIAC e calorimetria de varredura diferencial (microDSC). A cromatografia de fase reversa (RP) é usada para monitorar a formação de GLP-Fc de forma grampeada, oxidação na região de Fc e perda correspondente de pico principal intacto. Exclusão de tamanho (SE) HPLC é usada para monitorar formação de polímero (agregado solúvel) e perda de monômero correspondente. A troca de ânion (AEX) HPLC é usada para monitorar a heterogeneidade da carga, particularmente a formação de variantes acídicas (AV), que usualmente corresponde à deamidação, e a perda correspondente de pico principal. A fragmentação limitada é usada para monitorar produtos de degradação específicos da porção (GLP-1) do peptídeo da molécula de GLP-Fc, tal como deleção grampeada do N-terminal de H1 (His na posição 1 de SEQ ID NO: 1) e/ou G2 (Gly na posição 2 de SEQ ID NO: 1), grampos de protease em F22 (Phe na posição 22 de SEQ ID NO: 1) e/ou W25 (Trp na posição 25 de SEQ ID NO: 1), piruvilação no N-terminal, oxidação em W25 (Trp na posição 25 da SEQ ID NO: 1), e fosforilação em S46 (Ser na posição 46 da SEQ ID NO: 1). Absorvância a 550 nm para monitorar a turbidez da solução devido à formação de partículas insolúveis. A dispersão dinâmica de luz é usada para medir agregados solúveis grandes. Instron é usado para medir a resistência à filtração, que é um método semi-quantitativo desenvolvido inicialmente para medir a formação de gel – como estruturas em solução de glucagon. Essa técnica tem sido largamente usada para avaliar a instabilidade física da solução de peptídeo GLP – 1. Uma vez que a fusão GLP-Fc é uma combinação de uma GLP – 1 análogo com uma cadeia de IgG4 Fc, o teste de resistência à filtração pode prover uma percepção adicional na natureza da instabilidade física. O teste é realizado para tornar a

medir a pressão de inserir a solução na seringa através de um filtro de 13 mm de diâmetro de membrana de PVDF com um tamanho de poro de 0,2 µm. O gráfico de realimentação da pressão não tem inclinação se não há resistência ou agregação. As inclinações aumentando no decorrer do tempo indicam aumento das quantidades de agregação e/ou gelação. A fim de simplificar a comparação de execuções, somente os valores de resistência máxima são reportados aqui. HIAC é uma técnica de obstrução de luz largamente usada no desenvolvimento da formulação parenteral para monitorar a formação de substâncias de particulado insolúvel. A calorimetria de varredura diferencial é usada para monitorar as características de desdobramento como indicado pela temperatura de transição térmica, quando a proteína começa a sofrer transição estrutural.

[00027] As formulações de fusão GLP-Fc são preparadas de acordo com a tabela a seguir:

Formulação GLP-Fc 1 mg/mL	pH	Tampão
1	6	10 mM Citrato
2	6,5	10 mM Citrato
3	7	10 mM Citrato
4	6	10 mM Histidina
5	6,5	10 mM Histidina
6	7	10 mM Fosfato
7	7,5	10 mM Fosfato
8	7,5	10 mM Trometamina
9	8	10 mM Trometamina

[00028] As formulações de fusão GLP-Fc estéreis filtradas através de uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,22 µm. As soluções são armazenadas em frascos de vidro de 5 mL a 5, 15, 25, 37 e 45°C até serem analisadas ou até 20 semanas.

Efeitos do pH sobre a estabilidade de GLP-Fc:

[00029] A tabela a seguir mostra as constantes da taxa para a formação de formas grampeadas de proteína de fusão GLP-Fc a 37°C como determinado pela cromatografia de RP.

Formulação Nº	Taxa de primeira ordem constante a 37°C (semana ⁻¹)
1	4,84 E-03
2	5,22 E-03
3	7,01 E-03
4	3,83 E-03
5	5,05 E-03
6	1,28 E-02
7	1,85 E-02
8	6,43 E-03
9	8,89 E-03

[00030] A tabela a seguir mostra as constantes de taxas para formação de variante acídica de variantes acídicas de proteína de fusão GLP-Fc a 37°C como determinado por AEX HPLC.

Formulação Nº	Taxa de primeira ordem constante a 37°C (semana ⁻¹)
1	4,25 E-02
2	4,05 E-02
3	4,73 E-02
4	2,36 E-02
5	4,18 E-02
6	4,31 E-02
7	5,06 E-02
8	5,27 E-02
9	6,46 E-02

[00031] A tabela a seguir mostra a formação de agregados solúveis

(% de polímero) de proteína de fusão GLP-Fc depois de 20 semanas armazenada a 37°C como determinado por SE HPLC.

Formulação Nº	% de polímero após 20 semanas a 37°C
1	4,6
2	2,4
3	1,4
4	2,6
5	1,4
6	2,2
7	1,1
8	0,6
9	0,3

[00032] A tabela a seguir mostra as taxas constantes para grampear o N-terminal (des H1/H1G2) a 37°C através de fragmentação limitada.

Formulação Nº	Taxa de ordem zero constante a 37°C (% semana ⁻¹)
1	0,42
2	0,32
3	0,32
4	0,39
5	0,36
6	0,43
7	0,52
8	0,31
9	0,29

Solubilidade e viscosidade

[00033] A tabela a seguir mostra o efeito do pH sobre a solubilidade e viscosidade da formulação de fusão de GLP-Fc. A solução é primeiro preparada no tampão apropriado, o pH é ajustado e depois a solução é

concentrada por centrifugação usando um concentrador Centricon. A solução é verificada visualmente para sinais de alcançar o limite de solubilidade da solução. A concentração é determinada por absorvância de UV. A viscosidade é medida em Poise (P) em que $1 P = 1 \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A água a 20°C tem uma viscosidade de aproximadamente $0,01 \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ que é a mesma de 1 centi-Poise (cP).

Tampão	pH	Solubilidade (mg/mL)	Viscosidade (cP)
10 mM citrato	5,5	27,1	Não medida
10 mM citrato	5,8	146,2	Não medida
10 mM citrato	6,0	179,4	8,3
10 mM citrato	6,5	156,9	5,9
10 mM citrato	7,0	158,1	7,7

Comparação de estabilidade de formulação da solução

[00034] Um estudo de Projeto de Experimento (DoE) é preparado para elucidar o relacionamento entre os parâmetros chave da formulação e as propriedades de estabilidade química / física da molécula. Com base nos dados, um modelo quantitativo é desenvolvido para (i) definir uma formulação alvo ideal com respeito às propriedades de estabilidade química e física; (ii) explorar o espaço do projeto de formulação para definir a variação de parâmetro para o produto com desempenho aceitável, e (iii) estabelecer a robustez adequada do desempenho da formulação dentro do espaço do projeto explorado no estudo.

[00035] Todas as formulações testadas no estudo de DoE são sumarizadas na tabela a seguir. As várias formulações são preparadas e filtradas estéreis através de uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de $0,22 \mu\text{m}$. As formulações são armazenadas em frascos de vidro de 3 mL a 5, 25 e 40°C até serem analisadas ou até 3 meses.

	Tampão	pH	GLP-Fc (mg/mL)	Polissorbato 80 (mg/mL)	Agente de Tonicidade de Manitol (50mg/mL) NaCl (150mM)	EDTA (%)
1	10 mM Citrato	6,5	10	0,05	Manitol	0
2	10 mM Citrato	7,0	10	0,35	NaCl	0
3	10 mM Citrato	7,0	10	0,05	Manitol	0
4	10 mM Citrato	7,0	10	0,35	Manitol	0
5	10 mM Citrato	7,0	10	0,05	NaCl	0
6	10 mM Citrato	6,5	10	0,35	Manitol	0
7	10 mM Citrato	6,0	10	0,35	NaCl	0
8	10 mM Citrato	6,0	10	0,05	NaCl	0
9	10 mM Citrato	6,0	10	0,35	Manitol	0
10	10 mM Citrato	6,5	10	0,2	Manitol	0
11	10 mM Citrato	7,0	10	0,2	Manitol	0
12	10 mM Citrato	6,0	10	0,2	Manitol	0
13	10 mM Citrato	6,5	10	0,2	NaCl	0
14	10 mM Citrato	6,0	10	0,05	Manitol	0
15	10 mM Citrato	6,5	10	0,2	Manitol	0
16	10 mM Citrato	6,5	10	0,2	NaCl	0
17	10 mM Citrato	6,5	10	0,2	Manitol	0,01
18	10 mM Citrato	6,5	10	0,2	NaCl	0,01
19	10 mM Histidina	6,5	10	0,2	Manitol	0,01
20	10 mM Histidina	6,5	10	0,2	NaCl	0,01

[00036] A estabilidade das formulações é avaliada monitorando a diminuição de % do pico principal por cromatografia de fase reversa

(RP). As taxas constantes para todas as formulações são mostradas na tabela a seguir.

Formulação Nº	Taxa de ordem zero constante a 40°C (% mês ⁻¹)
1	7,65
2	9,78
3	9,08
4	8,44
5	9,06
6	8,16
7	7,41
8	6,90
9	7,03
10	6,98
11	8,31
12	7,10
13	7,42
14	7,97
15	7,41
16	7,30
17	4,92
18	5,52
19	5,69
20	5,52

[00037] Existem dois tipos de formas de grampo que podem ser monitorados por cromatografia de RP. A primeira é a forma grampeada a F22 e/ou W25 da região de GLP através de proteases residuais. O segundo tipo é grampeado na região do ligante através de mecanismo químico. As taxas constantes para todas as formulações são mostradas na tabela a seguir como determinado pela cromatografia de RP.

Formulação Nº	Taxa de ordem zero constante a 40°C (% mês ⁻¹)
1	2,02
2	3,27
3	3,02
4	2,79
5	3,29
6	2,07
7	1,77
8	1,73
9	1,75
10	1,83
11	2,81
12	1,75
13	2,02
14	1,90
15	1,92
16	1,97
17	1,51
18	1,61
19	1,52
20	1,45

[00038] A formação de agregado solúvel é monitorada por HPLC de exclusão de tamanho. As taxas constantes para diminuição de monômero a 40°C são mostradas na tabela a seguir.

Formulação Nº	Taxa de ordem zero constante a 40°C (% mês ⁻¹)
1	1,08
2	2,18
3	1,19
4	1,21

Formulação Nº	Taxa de ordem zero constante a 40°C (% mês ⁻¹)
5	1,63
6	1,38
7	2,39
8	1,93
9	2,11
10	1,01
11	1,04
12	2,25
13	1,66
14	2,35
15	1,14
16	1,69
17	0,54
18	1,15
19	0,53
20	1,00

[00039] O grampeamento do N-terminal por fragmentação limitada dentro da região de GLP é monitorado por análise de fragmentação limitada. As taxas constantes para Des H1/H1G2 são mostradas na tabela a seguir.

Formulação Nº	Taxa de ordem zero constante a 40°C (% mês ⁻¹)
1	2,39
2	2,77
3	2,45
4	2,47
5	2,35
6	2,72

Formulação Nº	Taxa de ordem zero constante a 40°C (% mês ⁻¹)
7	2,84
8	2,51
9	2,83
10	2,37
11	2,38
12	2,86
13	2,37
14	2,64
15	2,48
16	2,44
17	1,82
18	2,17
19	1,66
20	2,17

[00040] A formação de agregação solúvel após agitação por agitação orbital a 400 RPM por 24 horas foi monitorada por SE HPLC. Os resultados de % de monômero são mostrados na tabela a seguir.

Formulação Nº	% de Monômero
1	94,5
2	98,0
3	96,1
4	98,1
5	97,8
6	98,2
7	97,9
8	97,3
9	98,0

Formulação Nº	% de Monômero
10	98,0
11	98,2
12	97,9
13	98,1
14	94,4
15	98,1
16	98,1
17	98,2
18	98,1
19	98,5
20	98,3

[00041] A preocupação principal para a estabilidade da agitação é a formação de substâncias de particulado insolúvel, que podem ser monitoradas por medições de HIAC. Os resultados de HIAC depois da agitação por agitação orbital a 400 RPM por 24 horas são mostrados na tabela a seguir.

Formulação Nº	HIAC 10 µm contagem de partícula
1	400
2	10
3	361
4	5
5	918
6	7
7	205
8	1251
9	17
10	4
11	10

Formulação Nº	HIAC 10 µm contagem de partícula
12	26
13	29
14	1218
15	24
16	2
17	14
18	16
19	9
20	2

Comparação de NaCl vs. Formulação de manitol em Seringa e Frasco

Formulação	Composição
1	1 mg/mL GLP-Fc, 10 mM Citrato pH 6,5, 150 mM NaCl, 0,02 % em (p/v) de Polissorbato 80
2	1 mg/mL GLP-Fc, 10 mM Citrato pH 6,5, 5% (p/v) manitol, 0,02 % de (p/v) em Polissorbato 80

[00042] A comparação da estabilidade a 5°C das duas formulações acima comparando manitol e NaCl e armazenagem em seringa e frasco.

5C	% de Pico Principal			
Tempo (mo)	Formulação 1 Seringa	Formulação 2 Seringa	Formulação 1 Frasco	Formulação 2 Frasco
0	77,4	77,1	77,4	77,1
1	ND	ND	77,1	77,4
3	76,9	77,2	76,7	76,5
6	76,4	76,4	75,8	75,9
5C	% de Grampeado			
Tempo (mo)	Formulação 1 Seringa	Formulação 2 Seringa	Formulação 1 Frasco	Formulação 2 Frasco

0	0,3	0,2	0,3	0,2
1	ND	ND	0,3	0,2
3	0,3	0,2	0,2	0,3
6	0,4	0,4	0,4	0,4
5C	% de Monômero			
Tempo (mo)	Formulação 1 Seringa	Formulação 2 Seringa	Formulação 1 Frasco	Formulação 2 Frasco
0	98,1	97,1	98,1	97,1
1	96,6	95,3	ND	ND
3	97,9	97,9	97,6	97,8
6	97,7	98	96,6	97,1

ND = Não-Determinado

[00043] A comparação da estabilidade a 25°C das duas formulações acima comparando manitol e NaCl e armazenagem em seringa e frasco

25C	% de Pico Principal			
Tempo (mo)	Formulação 1 Seringa	Formulação 2 Seringa	Formulação 1 Frasco	Formulação 2 Frasco
0	77,4	77,1	77,4	77,1
1	ND	ND	72,9	73,5
3	64,0	68,0	53,8	64,1
6	46,7	59,6	39,3	41,9
25C	% Grampeado			
Time (mo)	Formulação 1 Seringa	Formulação 2 Seringa	Formulação 1 Frasco	Formulação 2 Frasco
0	0,3	0,2	0,3	0,2

25C	% de Pico Principal			
Tempo (mo)	Formulação 1 Seringa	Formulação 2 Seringa	Formulação 1 Frasco	Formulação 2 Frasco
1	ND	ND	1,0	0,8
3	2,4	1,8	4,9	2,5
6	7,1	3,4	10,1	9,1
25C	% Monômero			
Tempo (mo)	Formulação 1 Seringa	Formulação 2 Seringa	Formulação 1 Frasco	Formulação 2 Frasco
0	98,1	97,1	98,1	97,1
1	95,0	95,0	ND	ND
3	91,8	94,1	85,4	92,9
6	82,2	91,7	76	81,7

ND = Não-Determinado

[00044] A comparação da estabilidade a 40°C das duas formulações acima comparando manitol e NaCl e armazenagem em seringa e frasco

40C	% de Pico Principal			
Tempo (mo)	Formulação 1 Seringa	Formulação 2 Seringa	Formulação 1 Frasco	Formulação 2 Frasco
0	77,4	77,1	77,4	77,1
1	ND	ND	37,6	39
3	24,2	30,2	24,4	22,5

40C	% de Grampeado			
Tempo (mo)	Formulação 1 Seringa	Formulação 2 Seringa	Formulação 1 Frasco	Formulação 2 Frasco
0	0,3	0,2	0,3	0,2
1	ND	ND	10,5	9,7
3	17,3	14,9	17,1	16,8
40C	% de Monômero			
Tempo (mo)	Formulação 1 Seringa	Formulação 2 Seringa	Formulação 1 Frasco	Formulação 2 Frasco
0	98,1	97,1	98,1	97,1
1	86,3	91,3	ND	ND
3	82,2	86,5	80,5	85,2

ND = Não-Determinado

Determinação da Concentração de Manitol

[00045] A concentração de manitol necessária para alcançar a tonicidade alvo de 290 mili-Osmolaridade/Kg para uma formulação de solução de proteína de fusão GLP-Fc é determinada por experimento de titulação. A tabela a seguir resume a osmolalidade resultante como uma função da concentração de manitol. Baseada na análise de regressão linear dos resultados da osmolalidade para a concentração de manitol com um valor p estatístico de $< 0,01$, a concentração de manitol é determinada para ser 46,4 mg/mL ou 4,64%.

Volume (mL) 10 mM tampão de citrato	Volume (mL) 10 mM citrato/tampão com 50 mg/mL de manitol	Concentração Final de manitol (mg/mL)	Osmolalidade (mOsm/Kg)		
			Rep1	Rep2	Ave.
1,0	0	0	34	34	34
0,2	9,8	49,0	308	302	305

Volume (mL) 10 mM tampão de citrato	Volume (mL) 10 mM citrato/tampão com 50 mg/mL de manitol	Concentração Final de manitol (mg/mL)	Osmolalidade (mOsm/Kg)		
			Rep1	Rep2	Ave.
0,4	9,6	48,0	300	304	302
0,5	9,5	47,5	301	301	301
0,7	9,3	46,5	293	291	292
0,8	9,2	46,0	284	284	284
0,9	9,1	45,5	283	286	285
1,0	9,0	45,0	280	281	281

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação de solução estável, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de fusão GLP-1-Fc em tampão de citrato com polissorbato-80 na faixa de 0,01% a 0,05% (p/v) de manitol na faixa de 4,3 a 5,0 % (p/v), e em que a solução tem um pH na faixa de pH 6 a 7.

2. Formulação de solução estável de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de fusão GLP-1-Fc está na faixa de 0,25 a 10 mg/mL.

3. Formulação de solução estável de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de fusão GLP-1-Fc está na faixa de 0,25 a 5 mg/mL.

4. Formulação de solução estável de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a concentração de tampão de citrato está na faixa de 5 a 20 mM.

5. Formulação de solução estável de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a concentração de tampão de citrato é 10 mM.

6. Formulação de solução estável de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a concentração de polissorbato-80 é 0,02% (p/v).

7. Formulação de solução estável de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que a concentração de manitol está na faixa de 4,5 a 4,8% (p/v).

8. Formulação de solução estável de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a concentração de manitol é 4,6% (p/v).

9. Formulação de solução estável de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácido da proteína de fusão GLP-1-Fc é aquela dada pela SEQ ID NO: 1

10. Formulação de solução estável de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que a concentração da proteína de fusão GLP-1-Fc está na faixa de 0,25 a 5 mg/mL, a concentração de citrato é 10 mM, a concentração de polissorbato-80 é 0,02 % (p/v), a concentração de manitol é 4,6 % (p/v) e o pH é na faixa de 6,3 a 6,7.

11. Formulação de solução estável de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que a concentração de proteína de fusão GLP-1-Fc é 1 mg/mL.

12. Formulação de solução estável de qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que o pH é 6,5.

13. Formulação de solução estável de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que a formulação é armazenada em uma seringa estéril.